



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL *guishe* DE *Agave lechuguilla*
SOBRE LA CALIDAD DE AGUA EN UN CULTIVO INTENSIVO
DE CAMARÓN.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Selena Karina Hernández Rascón

La Paz, Baja California Sur, enero de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 7 del Mes de Diciembre del 2022, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL *guishe* DE *Agave lechuguilla* SOBRE LA CALIDAD DE AGUA EN UN CULTIVO INTENSIVO DE CAMARÓN "

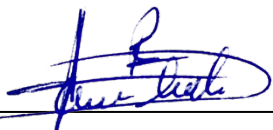
Presentada por la alumna:

Selena Karina Hernández Rascón

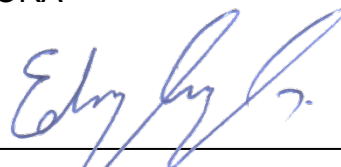
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



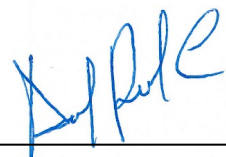
Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Co-Director de Tesis



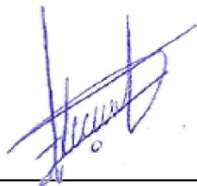
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis



Dra. Thelma Karina Morales Martínez
Co-Tutora de Tesis



Dr. Angel de la Cruz Pech Canul
Co-Tutor de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 09 de Dic de 2022.

Los miembros del comité de tesis de la estudiante Selena Karina Hernández Rascón del Programa de Maestría en Ciencias del Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
 - Citas excluidas
 - Bibliografía excluida
- Porcentajes de similitud:
12%

12%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	cibnor.repositorioinstitucional.mx <small>Internet</small>	256 palabras — 1%
2	repositoriodigital.ipn.mx <small>Internet</small>	82 palabras — < 1%
3	biblioteca.inifap.gob.mx:8080 <small>Internet</small>	51 palabras — < 1%
4	repositorio.xoc.uam.mx <small>Internet</small>	51 palabras — < 1%
5	es.scribd.com <small>Internet</small>	46 palabras — < 1%
6	sistemas.cibnor.mx <small>Internet</small>	41 palabras — < 1%
7	eprints.uanl.mx <small>Internet</small>	39 palabras — < 1%
8	botanicalsciences.com.mx <small>Internet</small>	37 palabras — < 1%
9	pesquisa.bvsalud.org <small>Internet</small>	37 palabras — < 1%

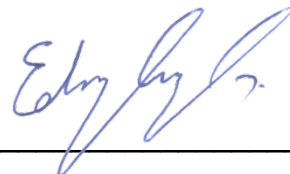
Firmas del comité



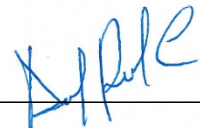
Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado



Dra. Thelma Karina Morales Martínez



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán



Dr. Ángel de la Cruz Pech Canul

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Thelma Karina Morales Martínez
Universidad Autónoma de Coahuila
Co-Tutora de Tesis

Dr. Ángel de la Cruz Pech Canul
Healthy Life Importadora, Exportadora y Productora de Alimentos y Bebidas S. de R.L de C.V.
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dra. Thelma Karina Morales Martínez
Dr. Ángel de la Cruz Pech Canul

Jurado de Examen

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dra. Thelma Karina Morales Martínez

Suplente

Dr. Ángel de la Cruz Pech Canul

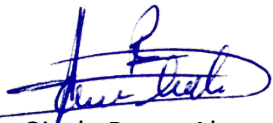
Resumen

El *Agave lechuguilla* está ampliamente distribuida en México. Comúnmente, se usa para obtener fibras de *ixtle*. Las fibras representan únicamente el 15% del total de la cosecha y el 85% restante llamado *guishe* se desecha ocasionando graves problemas ambientales. Estudios recientes, demostraron que el *guishe* contiene saponinas, flavonoides y azúcares. Las saponinas han sido estudiadas por su capacidad de reducir el contenido de amonio y productos nitrogenados en el agua. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del *guishe* sobre la calidad de agua en cultivos de camarón, para proponer estrategias de valorización para este desecho, que además representen una opción sustentable para la acuicultura del camarón. Durante este trabajo se realizó un análisis de expresión diferencial de tres regiones productivas de *A. lechuguilla* para determinar la región en la que el *guishe* contiene la mayor concentración de saponinas. Con la región seleccionada, se obtuvieron dos extractos ricos en saponinas, uno crudo y otro hidrolizado (J y H), y se cuantificaron con cromatografía líquida. También se determinó su contenido de azúcares. Después se realizaron bioensayos con juveniles de camarón a los que se les adicionaron diferentes concentraciones de los extractos, 18 mg/L, 36 mg/L y 72 mg/L, se monitoreó la concentración de NH_4^+ y el comportamiento microbiológico ambiental durante 36 días. Los resultados mostraron que al añadir el tratamiento J2 (36 mg/L) los camarones tuvieron menor ganancia en peso y que al añadir el tratamiento H3 (72 mg/L) al agua del cultivo se puede mantener la calidad de agua dentro de los parámetros establecidos sin comprometer la salud y talla de los organismos. Además, se observó que la adición del extracto H3 promueve la propagación de bacterias benéficas para el cultivo de camarón. En conclusión, altas concentraciones de hidrolizado enzimático procedente del *guishe* tienen un efecto sobre la calidad del agua, al disminuir significativamente la concentración de NH_4^+ y la carga bacteriana de *Vibrios* totales.

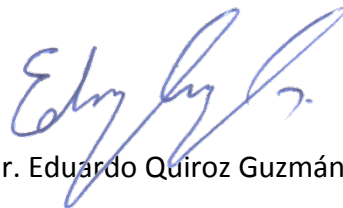
Palabras clave: saponinas, amonio, transcriptómica, bacterias benéficas, prebióticos.

ORCID: 0000-0003-2398-5909

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Summary

Agave lechuguilla is wide distributed in Mexico. Commonly, it is used to obtain *ixtle* fibers. The fibers represent only 15% of the total harvested while 85% called *guishe* is discarded, causing serious environmental problems. Recent studies have shown that *guishe* contains saponins, flavonoids y sugars. Saponins have been studied for their ability to reduce the content of ammonia y nitrogenous products in water. For this reason, the objective of this work is to evaluate the effect of *guishe* on water quality in shrimp farming, to propose valorization strategies for this waste, y a sustainable option for shrimp aquaculture. During this work, a differential expression analysis of three productive regions of *A. lechuguilla* was carried out to determine the region in which the *guishe* contains the highest concentration of saponins. With the selected region, two extracts rich in saponins were obtained, one raw y another hidrolized (J y H). Both extracts were quantified with liquid chromatography. Its sugar content was also determined. Subsequently, bioassays were carried out with juvenile shrimp, different concentrations of the extracts were added, 18 mg/L, 36 mg/L y 72 mg/L, y the NH₄⁺ concentration y environmental microbiological behavior were monitored for 36 days. The results showed that by adding J2 treatment (36 mg/L) shrimps had a lower weight gain although adding the H3 treatment (72 mg/L) to the culture water, quality can be maintained in the parameters established without compromising the health y size of the organisms. In addition, it was observed that the addition of the H3 extract promotes the propagation of beneficial bacteria in water. In conclusion, high concentrations of enzymatic hydrolysate from *guishe* influence water quality, by significantly decreasing the concentration of NH₄⁺ y the bacterial load of total *Vibrios*.

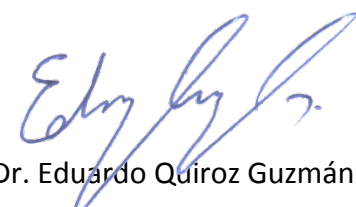
Key words: *saponins, ammonia, transcriptomic, benefical bacteria, prebiotics.*

ORCID: 0000-0003-2398-5909

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Dedicatoria

A mi Mamá por enseñarme que no hay problema que no pueda superar y por demostrarme una vez más que es una guerrera y seguiremos acompañándonos en nuestros logros.

A mi Papá por siempre estar presente, darme amor, palabras de aliento y consejos para continuar preparándome y estudiando para lograr ser una gran profesionalista.

A mi Abuelo Beto que desde el cielo sé que se está sintiendo orgulloso.

“En la vida no hay que temer, solo hay que comprender”

-Marie Curie

Agradecimientos

A CONACyT por la beca otorgada (CVU.1039210) para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por permitirme llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A la Dra. Ana Reyes por permitirme ser parte de este proyecto, por brindarme su amistad, compartir conmigo este camino y enriquecerlo con muchos conocimientos nuevos e impulsarme a siempre mejorar muchas gracias por todos sus consejos y por compartirme el entusiasmo por la ciencia.

Al Dr. Eduardo Quiroz por todo el conocimiento compartido y el apoyo durante este proyecto, sobre todo por su ayuda, acompañamiento y paciencia durante el bioensayo.

A la Dra. Thelma Morales Martínez por los conocimientos compartidos, por su ayuda en la cuantificación de saponinas, al Dr. Leopoldo Ríos González por el apoyo para la realización de este proyecto y el acercamiento con la comunidad de lechuguilleros.

Al Dr. Ángel Pech por acompañarme en una aventura más, por todos los conocimientos y pláticas compartidas.

Al Dr. Alberto Peña Rodríguez por todo el apoyo brindado durante este proyecto y sobre todo por el acompañamiento durante el cultivo.

A la Dra. Zoé P. Morreeew por siempre brindarme su apoyo, amistad y hacer más fácil este proceso, por contagiarme con esa chispa de curiosidad y entusiasmo.

A la Dra. Cristina Landa por todo su apoyo durante los análisis estadísticos, por la paciencia y todo el conocimiento compartido.

Al Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Autónoma de Coahuila por el apoyo durante este proyecto, a Gustavo y Josue.

Al equipo del INIFAP Coahuila por el acercamiento con los lechuguilleros, al Dr. Castillo por compartirme ese amor por la lechuguilla.

A las cDr. Diana Bajas y Clara Py por todo su apoyo durante la realización del bioensayo, por todas las pláticas y comidas compartidas.

A mis Papás por apoyarme en cada paso y decisión que he tomado, por impulsarme siempre a crecer y no caer en el conformismo sin ustedes no sería posible cumplir este sueño.

A Axel mi compañero de aventuras, por seguir presente en cada paso de mi vida, ser mi apoyo incondicional e impulsarme en los momentos de quiebre a nunca rendirme.

A mi hermano Noé por apoyarme a la distancia y darme un muy bello motivo más para seguir adelante.

A la Familia González Juárez por acogerme y tratarme como una hija más, por hacerme sentir el amor de familia y facilitarme toda la estadía en La Paz.

A Banni por seguir siempre presente, por todas las pláticas y risas compartidas a pesar de la distancia.

A Rosa por brindarme su amistad, por todo el apoyo durante la maestría, por todas las pláticas risas y por enseñarme un poquito de la vida paceña.

GRACIAS.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
Abreviaturas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 <i>Agave lechuguilla</i>	5
2.1.1 Fibra de ixtle.....	6
2.1.2 <i>Guishe</i>	8
2.2 Pretratamiento del <i>guishe</i>	8
2.3 Saponinas.	9
2.4 Clasificación de las saponinas.	9
2.5 Plantas con alto contenido en saponinas.....	11
2.6 HPLC.....	12
2.7 Extracción y cuantificación de saponinas.....	12
2.8 Hidrolisis enzimática.....	14
2.9 Ómicas	15
2.9.1 Transcriptómica	15
2.9.2 Transcriptoma <i>de novo</i> <i>Agave lechuguilla</i>	16
2.10 Acuicultura	16
2.11 Cultivos de camarón.....	17
2.12 Acuicultura sostenible.....	19
2.12.1 Inclusión de extractos ricos en saponinas a cultivos acuícolas	19
2.13 El microbioma en la salud de los organismos.	20
2.13.1 Probióticos y prebióticos.	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Selección de la región con mayor abundancia en saponinas.....	26
6.2 Muestreo.	27
6.3 Procesamiento del <i>guishe</i> de <i>Agave lechuguilla</i>	28
6.3.1 <i>Guishe</i> fresco.....	28
6.3.2 Jugo de <i>guishe</i>	29
6.3.3 Hidrolizado enzimático	29
6.4 Extracción y Cuantificación de saponinas.	31
6.4.1 Extracción.....	31

6.4.2 Extracción Hidrolizado enzimático.....	32
6.5 Cuantificación por HPLC-UV.....	32
6.5.1 Acondicionamiento del equipo y columna.....	33
6.5.2 Método de cuantificación.....	33
6.6 Bioensayo.....	34
6.6.1 Análisis estadístico Bioensayo.....	36
6.6.2 Dieta de los camarones.....	36
6.7 Análisis de calidad de agua.....	37
6.7.1 Análisis estadístico calidad de agua.....	38
6.8 Análisis microbiológicos.....	38
6.8.1 Análisis estadístico comunidades microbianas.....	38
6.9 Cuantificación de azúcares en los extractos.....	39
7. RESULTADOS.....	40
7.1 Analisis transcripcionales <i>in silico</i>	40
7.1.1 Ruta de biosíntesis de saponinas.....	40
7.2 Cuantificación de saponinas.....	46
7.3 Bioensayo.....	47
7.3.1 Análisis cualitativo de amonio.....	47
7.3.2 Análisis cuantitativo de Amonio.....	48
7.3.3 Efecto del <i>guishe</i> en el pH.....	50
7.3.4 Parámetros zootécnicos.....	51
7.3.5 Análisis microbiológico.....	53
7.4 Cuantificación de azúcares en los extractos.....	54
8. DISCUSIÓN.....	55
8.1 Transcriptómica.....	55
8.2 Cuantificación de saponinas.....	57
8.3 Parámetros zootécnicos.....	58
8.4 Calidad de agua.....	58
8.4.1 Análisis microbiológicos.....	60
8.5 Selección del mejor extracto.....	61
9. CONCLUSIONES.....	63
10. LITERATURA CITADA.....	64
11. ANEXOS.....	70
Anexo A. Enzimas empleadas para el análisis de expresión diferencial.....	70
Anexo B. Ruta biosíntesis de saponinas con nombres.....	73
Anexo C. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-UV para la cuantificación de saponinas en jugo de <i>guishe</i>	74
Anexo D. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-UV para la cuantificación de saponinas en hidrolizado enzimático del <i>guishe</i>	75

Lista de figuras

Figura 1. <i>Agave lechuguilla</i> . Ejido Cosme Coahuila. Fotografía tomada durante un recorrido en campo por Selena Karina Hernández Guzmán.....	1
Figura 2. Estructura de las saponinas. En rojo se muestra la aglicona o sapogenina. A) Dioscina saponina esteroideal B) Soyasaponina I saponina triterpenoide. Tomado y modificado de (Cheok <i>et al.</i> , 2014, Vincken <i>et al.</i> , 2007).....	3
Figura 3. Cogollos recolectados en Ejido Cosme. Transportados en huajaca elaborada con varas de la planta gobernadora. Fotografía tomada en campo por Selena Karina Hernández	5
Figura 4. Fibras obtenidas en Ejido Cosme Coahuila. A) Cogollo en proceso de despulpe B) Fibra fresca. Fotografía tomada en campo por Selena Karina Hernández	7
Figura 5. Clasificación de las saponinas basado en la ciclación del oxidoescualeno. Recuperado de (Vincken <i>et al.</i> , 2007).	11
Figura 6. Producción mundial de especies acuícolas. A) crecimiento mundial a través del tiempo de la acuicultura y pesquería en millones de toneladas B) porcentaje de producción pesquera y acuícola en 2020. Tomado de (FAO, 2022).	17
Figura 7. Recolección del guishe y prensado hidráulico del guishe, Ejido Fraustro Coah. Fotografía tomada en campo por Selena Karina Hernández.....	27
Figura 8. Secado del <i>guishe</i> en deshidratador KOLLEFF. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández	28
Figura 9. Espuma de jugo de guishe Fotografía tomada por Selena Karina Hernández	29
Figura 10. Espuma de jugo de guishe seco Fotografía tomada por Selena Karina Hernández	29
Figura 11. Espuma Hidrolizado enzimático. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández....	30
Figura 12. Hidrolizado enzimático Secador KOLEFF. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández	30
Figura 13. Muestra de <i>guishe</i> en ultrasonido de punta. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández	32
Figura 14. Acuarios de fibra de vidrio en laboratorio húmedo de nutrición acuícola CIBNOR. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández.....	35
Figura 15. Diseño experimental del bioensayo REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de guishe, J2 = 32 mg/L jugo de guishe.	35
Figura 16. Ruta de biosíntesis de saponinas. A) inicio de la ruta biosíntesis de fitosteroles, B) continuación de la ruta biosíntesis de brassinosteroides y saponinas esterodales C) continuación de la ruta Biosíntesis de saponinas triterpénicas. En rojo se encuentran las enzimas faltantes. .	44
Figura 17. Heatmap de abundancias de enzimas. La abundancia representada por los TPM.	45
Figura 18. Efecto de los tratamientos con jugo de <i>guishe</i> sobre las concentraciones de amonio. REF = control, J1= 18 mg/L jugo de <i>guishe</i> , J2 = 32 mg/L jugo de <i>guishe</i>	47
Figura 19. Efecto sobre las concentraciones de amonio de los tratamientos con el hidrolizado enzimático. REF= control, H1= 18 mg/L, H2= 36 mg/L, H3= 72 mg/L hidrolizado enzimático.	48
Figura 20. Curva de calibración 1 obtenida, Vol reacción: 1 ml, tiempo de centrifugación: 3 minutos 5000 RPM.	49
Figura 21. Curva de calibración No.2, Volumen de reacción: 1 ml, tiempo de centrifugación: 5 minutos 5000 RPM.	49

Figura 22. Análisis cuantitativo de amonio mediante espectrofotometría. REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de <i>guishe</i> , J2 = 32 mg/L jugo de <i>guishe</i>	50
Figura 23. Efecto del <i>guishe</i> sobre el pH del agua. REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de <i>guishe</i> , J2 = 32 mg/L jugo de <i>guishe</i>	51
Figura 25. Crecimiento de <i>Vibrio</i> totales (a, b) y Bacterias Ácido-Lácticas (c, d) en unidades experimentales con hidrolizado enzimático y jugo de <i>guishe</i>	54
Figura 26. Ruta de biosíntesis de diosgenina propuesta por Ciura <i>et al.</i> recuperado de (Ciura <i>et al.</i> , 2017).....	56

Lista de tablas

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos en México para el cultivo de camarón. Recuperado de (INAPESCA, 2018).	18
Tabla 2. Acondicionamiento de la columna.....	33
Tabla 3. Método de gradiente 6saponinas.M HPLC-UV	34
Tabla 4. Contenido nutricional de la dieta del camarón.....	36
Elemento	36
Tabla 5. Cuantificación de saponinas por HPLC-UV en jugo de guishe.	46
Tabla 6. Cuantificación de saponinas por HPLC-UV en hidrolizado enzimático.	46
Tabla 7. Parámetros zootécnicos medianas de los tratamientos. REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de <i>guishe</i> , J2 = 32 mg/L jugo de <i>guishe</i>	52

Abreviaturas

µm	Micrómetros
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CAM	<i>Crassulacean Acid Metabolism</i>
CFU	Unidades formadoras de colonias
Cm	Centímetros
Coah	Coahuila
FCR	Tasa de conversión alimentaria
FI	Alimento consumido
G	Gramos
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
Ha	Hectáreas
HPLC	Cromatografía de alta eficacia
ID	Identificador
L	Litros
Mg	Miligramos
Min	Minutos
MI	Mililitros
Mm	Milímetros
Nm	Nanómetros
PL	Postlarva
ppm	Partes por millón
Rpm	Revoluciones por minuto
SGR	Rango específico de crecimiento
TAN	Nitrógeno amoniacal total
TCBS	Agar tiosulfato, citrato, sal biliar y sacarosa
TLABC	Recuento Total de Bacterias Ácido-Lácticas
TPM	Transcritos por millón
TRA	Tasa de recambio de agua
TSV	Síndrome Taura
TVC	Recuento Total de <i>Vibrio</i>
WG	Peso ganado
WSSV	Síndrome de la mancha blanca
YUPE	Extracto comercial de <i>Yucca Schidigera</i>

1. INTRODUCCIÓN

El *Agave lechuguilla* es un agave silvestre, y se encuentra clasificado dentro de la familia *Asparagaceae* y subfamilia *Agavaceae* (fig. 1) (Reyes *et al.*, 2000). Y aunque no existen cultivos domesticados, se ha descrito una amplia distribución geográfica de más de 20 millones de hectáreas en zonas áridas y semiáridas del sur de Estados Unidos y noroeste de México. En México, los estados con mayor producción son: Coahuila, Chihuahua, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Zacatecas y Durango (Carmona *et al.*, 2017). El cultivo y recolección de este agave se encuentra regulado por la NOM-008-SEMARNAT-1996, en ella se establece que únicamente se podrán recolectar aquellos cogollos cuya altura sea mayor a 25 cm con el fin de evitar la sobreexplotación de la planta y con ello promover el uso sustentable de este recurso (Alcázar-Medina *et al.*, 2014, SEMARNAT, 1996, Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). La lechuguilla es utilizada principalmente para la obtención de fibras de *ixtle* conocidas internacionalmente como *Tampico fiber*. Estas fibras, se obtienen del tallado de las hojas más tiernas y centrales conocidas como cogollo, y se utilizan para la fabricación de cepillos, estropajos, y cuerdas. La mayor parte de este recurso es exportado para la elaboración de cepillos industriales o tapetes de automóviles de alta calidad. Sin embargo, únicamente el 15% del cogollo es aprovechable, mientras que el otro 85% es un residuo vegetal o bagazo conocido por la comunidad como “*guishe*”.



Figura 1. *Agave lechuguilla*. Ejido Cosme Coahuila. Fotografía tomada durante un recorrido en campo por Selena Karina Hernández Guzmán

Según los registros, por cada hectárea de lechuguilla cultivada se obtienen 32 kg de fibras y 180 kg de *guishe* (Reyes *et al.*, 2000, Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). A pesar de que el aprovechamiento del *Agave lechuguilla* está regulado por una norma oficial, en ella no se esclarece como se debe desechar el *guishe* o alguna medida de control para el mismo. Con esto, se estima que anualmente se producen más de 147,000 ton (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). Actualmente los lechuguilleros incineran el *guishe* o juntan grandes cantidades en el campo provocando consecuencias graves en el medio ambiente y erosión de los suelos. (Reyes, 2011). Sin embargo estudios recientes han descrito biomoléculas de alto valor agregado como saponinas, flavonoides, azúcares y micronutrientes contenidas en el *guishe* (Peña-Rodríguez *et al.*, 2020). Y se ha estimado que por cada tonelada de *guishe* procesado es posible obtener 260 kg de saponinas, 104 kg de fitoquímicos, 7.6 L de etanol, 24 m³ de hidrogeno, 15kg de biocarbón y 32 m³ de metano (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). Entonces, la obtención de estas moléculas es una alternativa prometedora que permitiría valorizar al residuo, con el establecimiento de una biorrefinería (Pelletier-Morreeuw *et al.*, 2021). En el caso de las saponinas que son metabolitos secundarios, descritos en su mayoría en plantas con estructuras complejas y alto peso molecular. Son glucósidos unidos por un enlace glucosídico a una aglicona conocida como sapogenina. La aglicona consta de 27 átomos de carbono organizados en 5 o 6 anillos aromáticos (fig. 2) lo que permite la primera clasificación de las saponinas ya que esta puede ser de carácter triterpénico o esteroidal (Paray *et al.*, 2021). Su nombre deriva del latín *sapo* que significa jabón haciendo referencia a su capacidad de formar espuma (Francis *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2008, Paray *et al.*, 2021, Jiménez *et al.*, 2021). Se ha demostrado que las saponinas sirven como un mecanismo de defensa a las plantas contra microorganismos patógenos y algunos insectos ya que interactúan con las hormonas encargadas del crecimiento, además de modificar la permeabilidad y el equilibrio hidrofóbico-lipofílico de las membranas celulares debido a la formación de complejos con moléculas de colesterol, que afectan las tasas de absorción de las membranas (Moghimpour y Hyali, 2015). Por otra parte, son moléculas de interés para la industria farmacéutica debido a su capacidad de actuar como antioxidante, actividad hemolítica, actividad anti-inflamatoria, anti-tumoral, anti-protozoaria e incluso se ha utilizado como estimulante inmunológico (Cheok *et al.*, 2014, Yi, 2021).

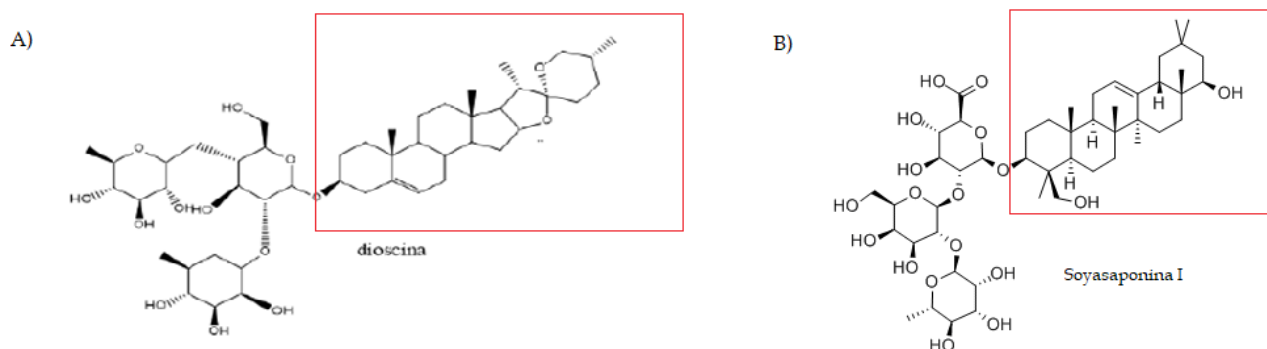


Figura 2. Estructura de las saponinas. En rojo se muestra la aglicona o sapogenina. A) Dioscina saponina esteroidal B) Soyasaponina I saponina triterpenoide. Tomado y modificado de (Cheok *et al.*, 2014, Vincken *et al.*, 2007).

Por otra parte, la acuicultura representa un sector importante para la producción de alimentos, en 2018 contribuyó en un 46% a la producción pesquera mundial. En el mismo año, se produjeron 5,997 mil toneladas de crustáceos de los cuales el 53% corresponde al camarón blanco *Penaeus vannamei*. Mientras que en México la producción de camarón anual fue de 228 mil toneladas (FAO, 2018, FAO, 2020). Sin embargo, a pesar de su importancia, esta industria ha sido ampliamente criticada por el impacto que genera en el medio ambiente, principalmente por las altas concentraciones de nitrógeno y fósforo que son desechadas a los cuerpos de agua (Ahmed y Thompson, 2019, Hukom *et al.*, 2020). La exposición a altas concentraciones de NH_4^+ aunado a las fluctuaciones en el pH, promueven la acumulación de NH_3 , lo que compromete la salud de organismos acuáticos, que presentan daño en branquias principalmente, alteración en vasos sanguíneos, daño en hígado y riñones, estrés oxidativo, así como un sistema inmunológico comprometido. Además, los iones NH_4^+ contribuyen a la reducción de Na^+ , lo que aumenta la toxicidad por NH_3 . Las principales medidas para contención de estos compuestos son recambios constantes de agua, adición de bacterias nitrificantes, y el aumento en la oxigenación (Paray *et al.*, 2021). Actualmente, existe una búsqueda de alternativas naturales como la inclusión de probióticos y prebióticos que contribuyen a la proliferación de bacterias benéficas para el cultivo, así como la adición de extractos de plantas como *Yucca Schidigera* y *Quillaja saponaria*, que tienen un alto contenido en saponinas esteroidales y triterpénicas respectivamente. Los

extractos de *Y. schdigera* se aplican principalmente para reducir concentraciones de amonio en los estanques, esta capacidad es conferida por su alto contenido en saponinas esteroideas, que determinan su capacidad tensioactiva, y la facilidad de unirse al amoniaco mediante fracciones glicol. Por su parte, en *Q.saponaria* predomina el contenido de saponinas triterpénicas con una pequeña fracción de saponinas esteroidales (Paray *et al.*, 2021, Ng'ambi *et al.*, 2016, Pen *et al.*, 2006). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de extractos del *guishe* en la calidad de agua de cultivos de camarón como propuesta de valorización del bagazo.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Agave lechuguilla*.

El *Agave lechuguilla* Torr., es una planta nativa de zonas áridas y semiáridas del noroeste de México y sur de Estados Unidos, siendo la planta predominante en el desierto de Chihuahua (Nobel y Quero, 1986). La lechuguilla es un arbusto rosetófilo acaule, que llega a medir de 30 – 40 cm de ancho y hasta 70 cm de alto con un promedio de 10 a 30 hojas, que se forman a partir de una yema apical conocida como cogollo. Los cogollos son conos formados por las hojas más jóvenes (fig. 3) (Reyes *et al.*, 2000).



Figura 3. Cogollos recolectados en Ejido Cosme. Transportados en huajaca elaborada con varas de la planta gobernadora. Fotografía tomada en campo por Selena Karina Hernández

El *A. lechuguilla* es una de las especies de agave con distribución natural de mayor abundancia, variando de entre 4300 a 56,000 individuos/ha abarcando el 10% del territorio nacional, se localiza en distintos tipos de clima abarcando desde secos hasta templados subhúmedos con temperaturas promedio de -8°C a 44°C, prefiere suelos franco – arenosos calizos y arcillosos en

donde la precipitación pluvial ronda los 150 – 500 mm anuales, ubicados en altitudes de 200 a 2400 msnm (Reyes *et al.*, 2000, Castillo-Quiroz *et al.*, 2012, Hernández *et al.*, 2005). Se ha descrito que la lechuguilla lleva a cabo metabolismo tipo CAM por sus siglas en inglés *Crassulacean Acid Metabolism* lo que le permite sobrevivir en climas áridos (Nobel y Quero, 1986).

La lechuguilla es un recurso forestal no maderable, utilizado para la obtención de fibras de *ixtle*, mediante la recolección y tallado de los cogollos siguiendo los procesos establecidos en la NOM-008-SEMARNAT-1996 (Castillo-Quiroz *et al.*, 2005). La norma establece que únicamente se deben recolectar aquellos cogollos cuya altura sea mayor a 25 cm para evitar la sobreexplotación de la planta, ya que al recolectar solo ciertas hojas permite que la planta se siga desarrollando para ser cosechada en años posteriores, se estima que el tiempo promedio de crecimiento va de los 14 -22 meses dependiendo la precipitación pluvial de la zona. Para recolectar los cogollos se debe utilizar una herramienta que no dañe la zona de crecimiento final y los hijuelos (SEMARNAT, 1996, Castillo Quiroz *et al.*, 2020). Es por ello que los lechuguilleros utilizan una “cogollera” la cual está compuesta por un aro o anillo de metal unido a una vara de madera, en donde el aro se introduce en el cogollo y mediante un movimiento ondulatorio se logra desprender de la planta sin comprometerla, posteriormente los cogollos se colocan en “huajacas” (fig. 3) con capacidad de 20 kg de cogollos (Castillo-Quiroz *et al.*, 2005).

2.1.1 Fibra de ixtle.

Las fibras de la lechuguilla son altamente comercializadas debido a su resistencia y durabilidad frente a solventes químicos y algunos otros factores físicos como el calor y humedad, son utilizadas para la elaboración de cepillos industriales, forros automotrices y algunos utensilios domésticos como sogas, estropajos, entre otros (Castillo-Quiroz *et al.*, 2012). El comercio de las fibras es destinado mayormente a exportación, en donde cerca del 93% de la producción nacional se envía a países como Estados Unidos, Países Bajos, Suiza y Honduras. México es el único productor (Carmona *et al.*, 2017). Las fibras pueden ser obtenidas mediante el tallado mecánico o manual de los cogollos, y únicamente el 15% del material recolectado es

aprovechable. En el caso del tallado manual se utiliza un “tallador” que es un utensilio puntiagudo sin filo y un banco (trozo de madera) con el que se ejerce presión en la hoja para separar el parénquima de la fibra, obteniendo fibras de mayor calidad y más limpias, posteriormente se ponen a secar al sol por alrededor de 3 horas (Castillo-Quiroz *et al.*, 2005). Por otra parte, en el tallado mecánico se utiliza una maquina con un considerable número de clavos incrustados en un cilindro giratorio accionado con un motor eléctrico o de gasolina. En cuanto a rendimiento, durante la talla manual se obtiene alrededor de 1.87 kg de fibra por hora, mientras que en el tallado mecánico se obtienen 15 kg de fibra por hora, sin embargo, la fibra obtenida es de menor calidad, y precio ya que en ocasiones llega a mancharse durante la talla (Castillo-Quiroz *et al.*, 2005, Elesban *et al.*, 2004). Mayorga *et al* demostraron que el tallado mecánico afecta la calidad de la fibra respecto al tallado manual, pero no se afectan las propiedades físico-mecánicas de la fibra. Se puede observar la fibra durante el despulpe y las fibras obtenidas (fig. 4).



Figura 4. Fibras obtenidas en Ejido Cosme Coahuila. A) Cogollo en proceso de despulpe B) Fibra fresca. Fotografía tomada en campo por Selena Karina Hernández

2.1.2 *Guishe*

El *guishe* es el residuo pulposo que se obtiene después de la talla de los cogollos, se encontró que el peso promedio de un cogollo es de 356.54 g en peso fresco, y contiene 14.6% de fibra y el 85.43% de bagazo, comúnmente conocido como *guishe*, palabra proveniente del Otomí “guixi” o “guizo” asociado a la irritación o escozor que causa el jugo del agave en la piel al ser tallado (Reyes *et al.*, 2000). Actualmente, el *guishe* es considerado un residuo que representa graves problemas ecológicos en las comunidades en donde se aprovecha el *Agave lechuguilla* ya que anualmente se producen más de 147,000 toneladas que se acumulan en campo abierto o son incineradas (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019, Morreeuw *et al.*, 2021). Es por ello que diversos grupos de investigadores han tratado de encontrar estrategias de valorización. Durante el proceso se han reportado altas concentraciones de fitoquímicos de interés como saponinas, flavonoides, alcaloides y fructanos (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019, Peña-Rodríguez *et al.*, 2020). Se ha nombrado al *A. lechuguilla* como una especie con potencial biotecnológico. Algunas de las propuestas de valorización son: su uso como fuente para la obtención de flavonoides, aditivo en alimentos de especies acuícolas, posible fármaco para el tratamiento de dislipidemias e incluso como materia prima para la producción de bioetanol e hidrogeno (Pelletier-Morreeuw *et al.*, 2021, Peña-Rodríguez *et al.*, 2020, Reyna Martinez *et al.*, 2019, Morales *et al.*, 2019, Esquivel *et al.*, 2021).

2.2 Pretratamiento del *guishe*.

Con el fin de conceptualizar un esquema de biorefinería se establecieron los parámetros de almacenamiento y secado del *guishe*, en dicho trabajo se estableció que el bagazo debe reservarse de la luz inmediatamente después de ser cosechado para su traslado, para el secado se deben de mantener condiciones de oscuridad en un horno de convección a 45 °C para evitar la pérdida de fitoquímicos cerca de 16 horas, una vez seco el *guishe* se muele con un molino de corte a un tamaño de partícula de 2 mm, lo obtenido se somete a un tratamiento de hidrólisis enzimática con el mix comercial Ultraflo max (Novozymes) por 2.5 h de incubación a 40 °C con un buffer de fosfatos pH 4.0 (Pelletier-Morreeuw *et al.*, 2021).

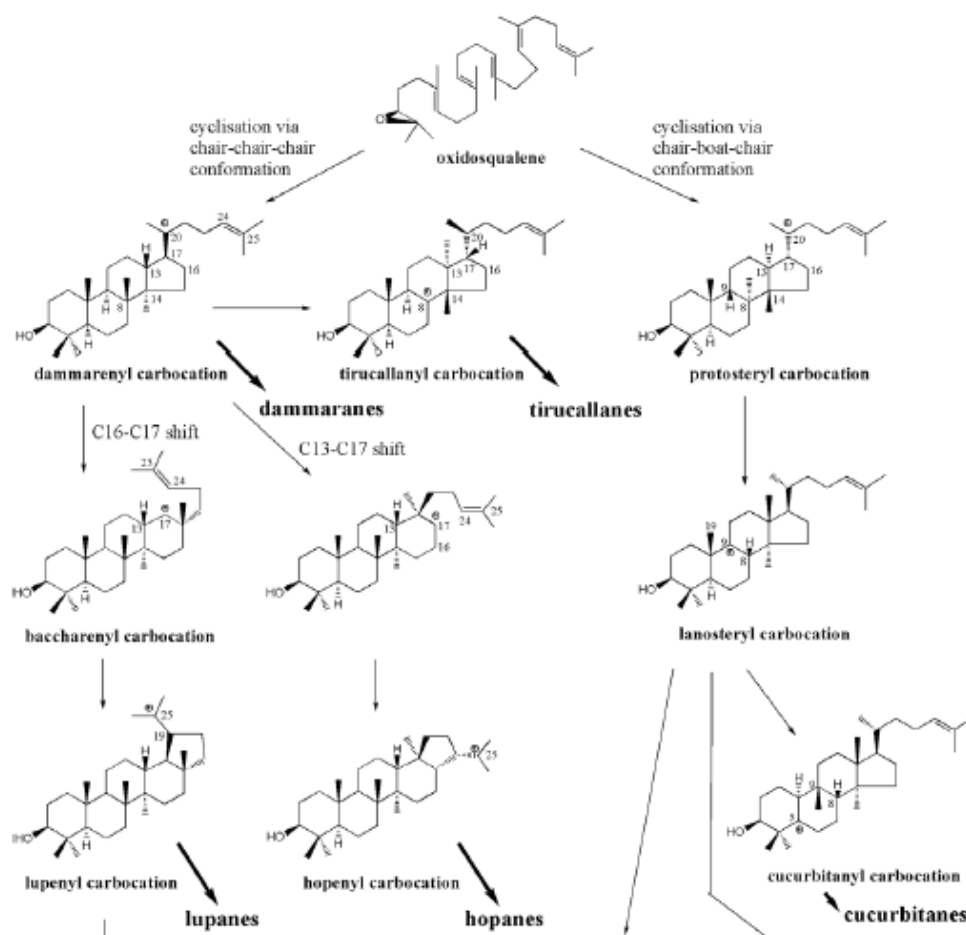
2.3 Saponinas.

Son un amplio grupo de metabolitos secundarios descritos principalmente en plantas, son glucósidos tensoactivos que están unidos a un núcleo lipofílico, una característica distintiva es la capacidad de formación de espuma al estar en contacto con agua, en la planta en donde se encuentran son un sistema de defensa en contra de patógenos y herbívoros (Vincken *et al.*, 2007, Desai *et al.*, 2009). Están compuestas por una aglicona y una parte glucosídica (glicona). Los azúcares encontrados comúnmente son la glucosa, arabinosa, xilosa y ácido glucorónico. La combinación de una fracción hidrofóbica con la fracción hidrofílica potencian la capacidad de formación de espuma (Desai *et al.*, 2009). La ruta de biosíntesis de saponinas empieza siguiendo la ruta del mevalonato comenzado con Acetil Co-A hasta obtener mevalonato, posteriormente se obtiene farnesil pirofosfato, que es el precursor del escualeno, posteriormente la enzima escualeno monooxidasa se encarga de ciclar el compuesto dando pie a la formación del 2-3 epoxiescualeno, precursor de las saponinas esteroidales y triterpénicas (Vincken *et al.*, 2007, Desai *et al.*, 2009). Se ha reportado que las saponinas tienen actividad antioxidante, actividad hemolítica, actividad anti-inflamatoria, anti-tumoral, anti-protozoaria, inmunoestimulante, actividad hipoglucémica, efectos en el metabolismo del colesterol, actividad hipolipidémica e incluso la capacidad de formar complejos con productos nitrogenados (Cheek *et al.*, 2014, Yi, 2021, Desai *et al.*, 2009, Cheeke, 2000).

2.4 Clasificación de las saponinas.

La principal clasificación de las saponinas está dada por el carácter de la aglicona o sapogenina ya sea triterpénica o esteroideal, en el caso de las saponinas esteroidales tienen la ausencia de 3 grupos metilo son estructuras de 27 átomos C, en comparación con las saponinas triterpénicas cuentan con 30 átomos de C. A partir del número de cadenas de azúcares unidos a la aglicona se pueden clasificar como monodesmosídicas (C-8) o bidesmosídicas las que cuentan con dos cadenas de azúcares (C-26 o C-28). Las saponinas esteroidales pueden clasificarse con base al precursor y el tipo de unión en el carbono C-22 en saponinas espirostánicas o furostánicas. Las saponinas espirostánicas tienen una estructura de 27 átomos de carbono distribuidos en seis

anillos mientras que el tipo furostano tienen un enlace glicosilado en el C-26 y la estructura es pentacíclica. Otra forma de clasificación es con base a la ciclación del oxidosqualeno y se resumen en la fig. 5 (Vincken *et al.*, 2007, Desai *et al.*, 2009, Paray *et al.*, 2021, Valle, 2016).



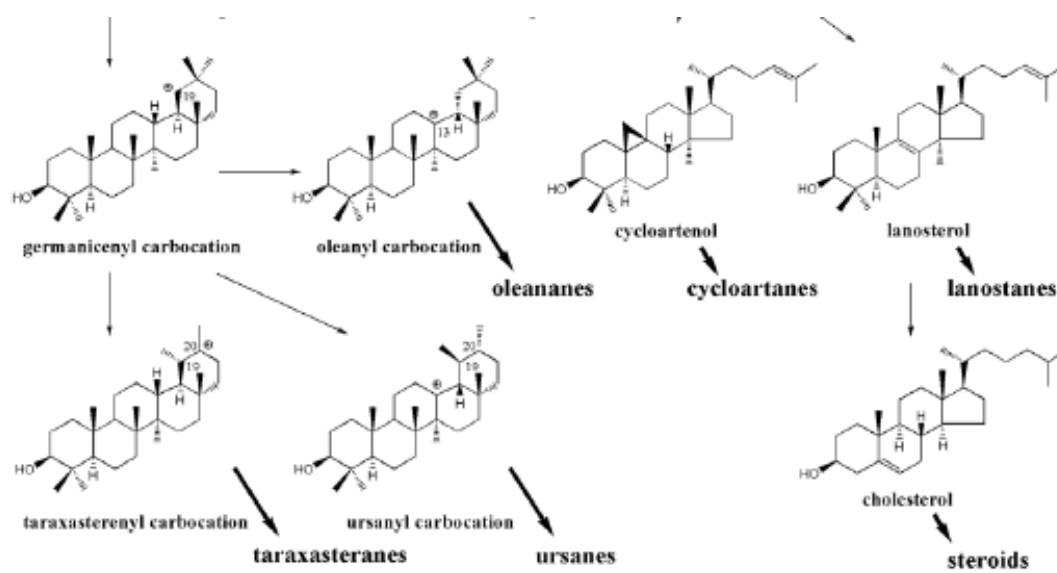


Figura 5. Clasificación de las saponinas basado en la ciclación del oxidoescualeno. Recuperado de (Vincken *et al.*, 2007).

2.5 Plantas con alto contenido en saponinas.

Se ha descrito una gran diversidad de plantas con importantes concentraciones de saponinas, principalmente en plantas monocotiledóneas, entre las que se encuentran *Saponaria officinalis* (jabonera), *Koelreuteria paniculata* (sombrilla japonesa), *Asparagus officinalis* (esparrago), *Chenopodium quinoa*, *Medicago sativa* (alfalfa), histórica y comercialmente destacan las plantas *Quillaja saponaria* y *Yucca schidigera* (Ahumada *et al.*, 2016, Jaramillo-Jaramillo *et al.*, 2016, Santacruz-Reyes y Chien, 2010). *Quillaja saponaria* es un árbol encontrado en zonas áridas de Chile en donde es utilizado como fuente de obtención de saponinas principalmente triterpénicas a partir de la corteza y tronco, las partes del árbol son colocadas en agua a altas temperaturas hasta obtener un líquido espumoso, después el extracto se concentra por rotoevaporación para ser utilizado en la minería, en la industria cosmética, como biorremediador de suelos contaminados con PCB (bifenilos policlorados), para disminuir las emisión de metano en animales de granja entre otros (Pen *et al.*, 2006, Cheeke, 2000, Fleck *et al.*, 2019). Por otra parte, *Y. schidigera* es una especie de la familia de las *Asparagaceae* con distribución en zonas áridas y semiáridas del sudeste de California y Baja California principalmente, es conocida por su alta concentración de saponinas esteroidales. Para elaborar

los extractos de *Yucca* se utilizan partes del tronco, que son secados y molidos hasta obtener un polvo, o el tronco fresco es sometido a prensado mecánico para obtener un jugo. En la actualidad existen distintos productos comerciales a partir de los extractos de *Yucca*, que son utilizados como aditivo en la dieta o agua de especies acuícolas para mejorar la salud y calidad de agua, como reductor de amonio y urea en suero, como antioxidante y antimicrobiano, algunos géneros y extractos de *Yucca* se encuentran clasificados como GRAS por sus siglas en inglés *Generally Recognized As Safe* por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) (Cheeke, 2000, Paray *et al.*, 2021, Jiménez *et al.*, 2021).

2.6 HPLC.

La cromatografía de alta eficacia por sus siglas en inglés (*high performance liquid chromatography HPLC*). Es utilizada para la separación y análisis de los componentes químicos de una muestra, el método consiste en dos fases; la fase móvil la cual es un líquido bombeado a alta presión encargado de transportar la muestra a través de la fase estacionaria, los disolventes más utilizados son agua, acetonitrilo y metanol, la fase móvil puede emplearse con un método Isocrático, es decir, sin variaciones en el flujo, o por gradiente, en donde se emplean dos disolventes variando la relación de los mismos en el tiempo. Por otra parte, la fase estacionaria comúnmente es sólida y se encuentra en la columna, mayormente se utiliza silicio (Dhurba *et al.*, 2022). Distintas fuerzas químicas y físicas interactúan entre la muestra y las dos fases del método, los componentes con mayor afinidad a la fase estacionaria se desplazan con menor velocidad que los que tienen una menor afinidad dando lugar a la diferencia en la separación y retención de los compuestos de la muestra (Suarez y Morales, 2018, Malviya *et al.*, 2010).

2.7 Extracción y cuantificación de saponinas.

Se demostró que existe variabilidad en el contenido de saponinas dependiendo de la región geográfica de donde se obtenga el *guishe*, en dicho estudio se tomaron muestras de los ejidos; Tortugas en Ramos Arizpe Coahuila, El Porvenir en Parras de la Fuente Coahuila, Buñuelos Coahuila. Las muestras de *guishe* fueron prensadas para obtener el jugo de *guishe*, posteriormente se cuantificó el contenido de saponinas en dichas regiones utilizó el método de

Miller, en el que se interpoló la curva de dextrosa de *Quillaja saponaria*. Determinaron que las muestras de El Porvenir tienen un mayor contenido en saponinas (100.33 g L^{-1}) en comparación con Ejido tortugas (98.43 g L^{-1}) y Buñuelos (23.76 g L^{-1}). No solo se demostró que la distribución geográfica y el tipo de suelo tiene una influencia en la concentración de estos metabolitos secundarios, también demostraron la influencia de las condiciones climáticas como la precipitación pluvial. Tomaron muestras en dos épocas distintas del año; marzo y junio. La baja precipitación impacta de forma positiva la concentración de saponinas en el *guishe*, debido a que estos metabolitos secundarios están relacionados con el estrés de las plantas, por lo que recomiendan recolectar el *guishe* en épocas de sequía (Juarez *et al.*, 2014).

Lie *et al.*, (2005) lograron extraer y cuantificar 6 saponinas en Ginseng chino (*Panax notoginseng*) mediante HPLC-UV; notoginsenosido R1, ginsenosido Rg1, Rb1, Rg2, Rh1 y Rd. En dicho trabajo se utilizó Astragalosido IV como estándar interno, la extracción se llevó a cabo mediante un baño ultrasónico con metanol al 80%. El análisis por HPLC requirió de una columna de fase reversa C18, la fase móvil consistió en un gradiente de elución de acetonitrilo y ácido fórmico al 0.01% en 30 minutos a una longitud de onda de 203 nm.

Por otra parte, Careri *et al.*, (2001) cuantificaron dos fitosteroles; sitosterol y stigmasterol en aceite de soya utilizando nuevamente HPLC-UV (0.52 y 0.54 mg/ml), se usó una columna C18 150 x 2.1 mm, 5 μ m, con una fase móvil de condición Isocrático utilizando acetonitrilo y agua 86:14 v/v a una longitud de onda de 208 nm. Las concentraciones encontradas de sitosterol y stigmasterol fueron de 0.52 y 0.54 mg/ml respectivamente. Mediante HPLC acoplado a detector UV se logró optimizar una metodología para la cuantificación simultánea de la saponina protodioscina y el flavonoide rutina en extractos de esparrago (*Asparagus officin* *Asparagus officinalis* L.), también se concluyó que el solvente más eficiente para la extracción es etanol con 0.1 % de H₃PO₄ en comparación a los utilizados comúnmente (metanol y acetonitrilo). Para la extracción se utilizaron 50 ml del solvente para 1 g de muestra durante 1 min, posteriormente los extractos se pasaron por un microfiltro. Para la cuantificación se utilizó la columna marca Spherisorb ODS-2 (5 μ m, 150 x 4.6 mm, Alltech) con protector de cartucho, la fase móvil se

llevó a cabo en gradiente de acetonitrilo y agua ambos con 0.5 % de H_3PO_4 , a una longitud de onda de 210 nm (Lee *et al.*, 2010).

Así mismo, se buscó obtener extractos ricos en saponinas a partir de semillas de quinoa, fenogreco, lenteja roja y soya. Los extractos se consiguieron con metodología de extracción asistida por ultrasonido, en este estudio también buscaron determinar la biodisponibilidad de las saponinas presentes en las distintas semillas. Los extractos con mayor contenido en saponinas fueron obtenidos utilizando etanol como solvente en fenogreco y lenteja roja con un 12% y 10% respectivamente, además demostraron que la extracción asistida por ultrasonido es una técnica eficiente para la extracción de estos compuestos (Navarro del Hierro *et al.*, 2020).

2.8 Hidrolisis enzimática.

El pretratamiento del bagazo de *A. lechuguilla* se optimizó con el uso de hidrolisis enzimática, para ello se probaron distintas mezclas enzimáticas, la primera mezcla consistió en una celulasa con actividad endo-1,4- β -D-glicosidasa, pectinasa con actividad poligalacturonasa y lacasa en distintas concentraciones y con variación en el pH, así mismo se probaron las mezclas comerciales de Viscozyme© y Ultraflo© en donde concluyeron que las condiciones óptimas para la hidrólisis fue utilizar el mix comercial Ultraflo© por 2.5 horas a 40 °C y pH 4.0 para recuperar un mayor contenido de glucósidos de flavonoides (Pelletier-Morreeuw *et al.*, 2021). A pesar de que el estudio está enfocado a la obtención de flavonoides los resultados coinciden con lo reportando con Peng *et al.* en donde el objetivo fue incrementar la obtención de saponinas espirostánicas precursoras de diosgenina, y con ello sustituir el uso de hidrolisis ácida en la industria en donde se utiliza la planta medicinal *Dioscorea zingiberensis*. Durante dicho trabajo se probaron las enzimas; α -Amilasa, exo-1,4- α -glucosidasa, celulasa y endo-1,4- α -xilanas. Se sometió a hidrólisis enzimática el polvo del rizoma de la planta conforme al inserto de cada una de las enzimas, posteriormente se realizó la extracción de las saponinas (5mg/5ml) con metanol en baño ultrasónico por 20 minutos a 35°C para llevar a cabo la cuantificación mediante HPLC con detector de longitud de onda variable a una longitud de onda de 230 nm, la fase móvil consistió en metanol y agua (90:10, v:v), se lograron cuantificar tres saponinas

espirostánicas, la primera nombrada como *zingiberensis* nueva saponina, deltonina y prosapogenina A de dioscina, reportando un incremento de un 212% de las saponinas en los tratamientos con hidrolisis con xilanasas (Peng *et al.*, 2010). Lo que contribuye al uso del mix Ultraflo® utilizado por Morreew *et al.* (2021) para obtener no solo extractos ricos en flavonoides si no también ricos en saponinas a partir del *guishe* ya que el mix es una combinación de xilanasas y beta-glucanasas.

2.9 Ómicas

Las ómicas son las ciencias que permiten el estudio de un gran número de moléculas involucradas en el funcionamiento de un organismo. Se encuentran dentro de estas ciencias, la genómica encargada del estudio de secuencias de ADN (genes), la transcriptómica refiriéndose al estudio de múltiples transcritos (ARN), la metabolómica encargada del estudio de múltiples metabolitos y la proteómica refiriéndose al estudio y secuenciación de proteínas, todas combinando tecnologías *in silico* (Vela y Gutiérrez-Aguilar, 2017).

2.9.1 Transcriptómica

Se encarga de estudiar la expresión de los transcritos en una célula o tejido, las metodologías más utilizadas son microarreglos o secuenciación del ARN (RNA-seq), el micro ARN o miRNA son secuencias pequeñas (21-25 nt) no codificantes que regulan la expresión de múltiples genes, el RNA-seq consiste en secuenciar todos los transcritos presentes en la célula o tejido, haciendo posible encontrar nuevos transcritos y nuevos genes involucrados en rutas metabólicas, también permite el ensamblaje *de novo* para plantas no modelo, el uso de RNA-seq ha permitido describir un gran número de rutas metabólicas, también el estudio de transcriptomas ha permitido generar diversas bases de datos que permiten realizar análisis comparativos entre especies (Vela y Gutiérrez-Aguilar, 2017, Rai *et al.*, 2017). En un estudio se comparó el transcriptoma de la planta *Panax japonicus* con otras especies del género *Panax* lo que permitió identificar genes involucrados en la biosíntesis de los esqueletos triterpénicos de saponinas encontrando 24 unigenes anotados como citocromo P450 (CYP) y 48 unigenes de

glicosiltransferasas (GT) todos involucrados en la biosíntesis y regulación de ginsenósidos (Rai *et al.*, 2016).

2.9.2 Transcriptoma *de novo* *Agave lechuguilla*.

Utilizando herramientas de transcripómica se realizó el ensamble del primer transcriptoma *de novo* del *Agave lechuguilla* a partir de hojas sin procesar y de *guishe*, durante dicho trabajo también se propuso la ruta de biosíntesis de flavonoides en donde se encontraron 33 enzimas y 8 factores de transcripción involucrados en la misma, a su vez se realizó un análisis de expresión diferencial para conocer los niveles de expresión en la hoja y el *guishe* del agave, por último se realizaron predicciones en el contenido de metabolitos mediante transcripómica los cuales también fueron cuantificados por HPLC-UV-MS en donde se relacionó lo obtenido mediante química analítica y por análisis *in silico*, por lo que proponen la bioprospección por transcripómica como una alternativa confiable (Morreeuw *et al.*, 2021). Por otra parte, se llevó a cabo la segunda versión del reporte de anotación del transcriptoma *de novo* para el agave (datos no publicados).

2.10 Acuicultura

La acuicultura ha mostrado un crecimiento más acelerado que la pesca de captura en los últimos años, en 2020 la producción total de especies acuícolas fue de 178 millones de toneladas, el 51% fue obtenido mediante pesca de captura mientras que los cultivos acuícolas lograron suministrar el 49% (fig. 6). Los principales grupos de exportación fueron peces de aleta (67%), moluscos (11%) y crustáceos (23%). En el caso específico de los crustáceos, un 16% corresponde a la exportación de camarones y langostinos. Mediante cultivos acuícolas se produjeron 5,812.2 mil toneladas de camarón blanco (*P.vannamei*) representando un 51.7% del total de los crustáceos. En México la producción anual de camarón fue de 228 mil toneladas (FAO, 2020, FAO, 2022).

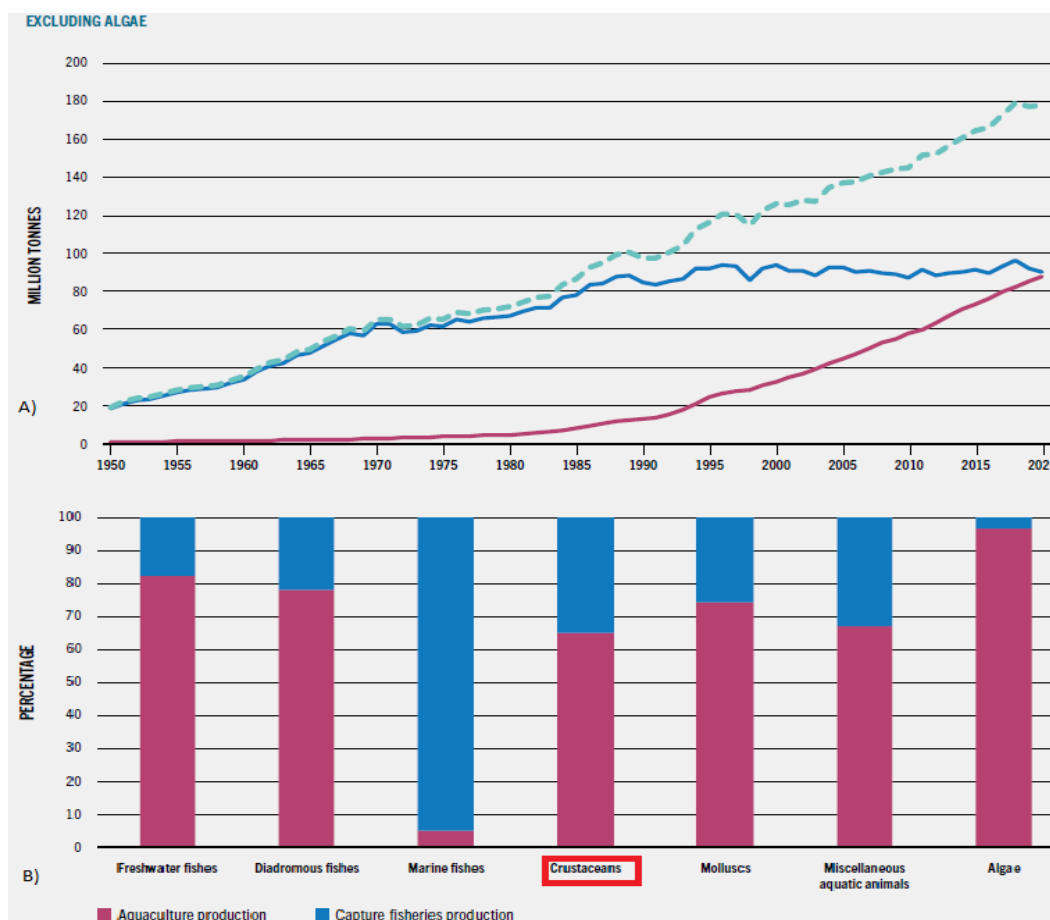


Figura 6. Producción mundial de especies acuícolas. A) crecimiento mundial a través del tiempo de la acuicultura y pesquería en millones de toneladas B) porcentaje de producción pesquera y acuícola en 2020. Tomado de (FAO, 2022).

2.11 Cultivos de camarón.

Existen diversos sistemas de cultivos clasificados con base en la densidad de siembra, tecnificación y porcentaje de recambio de agua. En los cultivos extensivos se siembra de 4-10 PL/m³, sin aireación y con tasas de recambio de agua (TRA) de 5-10% diario, en sistemas semi-intensivos la siembra va de las 10-30 PL/m³, TRA del 10-20% con aireación por periodos, en sistemas intensivos se siembran de 60- 300 PL/m³, con aireación constante y TRA > 20% diario, se opta por utilizar sistemas intensivos debido a que la supervivencia es mayor a 75% y los lapsos del cultivo son más cortos, los parámetros físico-químicos se observan en la tabla 1 (INAPESCA, 2018, CONAPESCA, 2018b).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos en México para el cultivo de camarón. Recuperado de (INAPESCA, 2018).

Parámetro	min	Max
Temperatura (°C)	20	35
Salinidad (ups)	5	40
Oxígeno disuelto (mg/L)	4	10
pH	7	9
Nitrito (mg/L)	<0.1	
Nitrato (mg/L)	0.4	08
Amonio (mg/L)	0.1	1
Turbidez (cm)	35	45

En México 16 estados son productores de cultivos de camarón; Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Veracruz, entre otros, destacando como mayor productor del país Sinaloa (CONAPESCA, 2018a). A lo largo de la historia de los cultivos de camarón en el país se han reportado graves pérdidas económicas relacionadas con enfermedades por patógenos, los más eminentes han sido el virus de la mancha blanca (WSSV), Síndrome Taura (TSV) y Vibriosis causada por *Vibrio parahaemolyticus*, es por esto que se deben implementar buenas prácticas de manejo, además de la inclusión de probióticos y prebióticos para mejorar la salud de los organismos y con ello evitar el uso de antibióticos (INAPESCA, 2018, FAO, 2009). Otro problema que amenaza los cultivos de camarón son las altas concentraciones de productos nitrogenados que afectan la calidad del agua comprometiendo la salud de los organismos y con ello provocando graves pérdidas económicas (Paray *et al.*, 2021, Carroza *et al.*, 2012).

2.12 Acuicultura sostenible.

La alta demanda de especies acuícolas ha llevado a la intensificación de los cultivos para poder satisfacer las necesidades de la población mundial, lo que ha generado una mayor acumulación de residuos en el medio ambiente por las grandes cantidades de efluentes que genera la acuicultura. También se ha incrementado la prevalencia de enfermedades en los organismos, es por ello que se busca implementar técnicas más sostenibles (Paray *et al.*, 2021, Toledo *et al.*, 2018). La FAO propone “la transformación azul” en donde se menciona que para expandir la acuicultura de forma sostenible se necesita de innovaciones técnicas, apoyo político e incentivos durante toda la cadena de valor, en donde es necesario el acceso al agua y a su vez la optimización del recurso, la identificación adecuada de las zonas de acuicultura, licencias de buenas prácticas ambientales con seguimiento, mano de obra capacitada, regulación sobre el uso de antibióticos y productos químicos y protocolos de bioseguridad, uno de los puntos a resaltar propuestos en el control ambiental y regulación es la implementación de sistemas heterotróficos, sistemas de bajo o cero recambio de agua y sistemas de recirculación para disminuir el impacto ambiental.

Por otra parte, en la aplicación de tecnologías más sustentables se menciona el uso de aditivos alimenticios como los probióticos para incrementar la resistencia de los organismos contra patógenos (FAO, 2022).

2.12.1 Inclusión de extractos ricos en saponinas a cultivos acuícolas

A lo largo del tiempo se han probado distintos métodos para disminuir la concentración de productos nitrogenados en el agua de los cultivos en donde han encontrado que las saponinas son una alternativa prometedora (Paray *et al.*, 2021). Es por ello que Santa Cruz- Reyes *Et al.*, 2010. Probaron un extracto de comercial de la planta *Yucca Schidigera* (YUPE) en agua de un cultivo de camarón *Marsupenaeus japonicus* proveniente de maricultura. El extracto fue probado en 3 densidades de postlarvas (30, 50 y 100 PL L⁻¹), y demostraron la capacidad del extracto de reducir las concentraciones de amoníaco acumulado, también se verificó que el

extracto es inocuo para esta especie de camarón en particular. Adicionalmente, probaron el extracto comercial YUPE de dos formas, la primera adicionándolo a la dieta del camarón y la segunda, añadiéndolo al agua para tratar los efluentes del cultivo con el fin de reducir la contaminación por amonio. La adición de YUPE a la dieta fue de 300, 600 y 1200 mg kg⁻¹ y se mostró una reducción de 50 - 83% de TAN, también reportaron que no solo las concentraciones de amonio excretadas por el camarón se redujeron, sino también las producidas por la materia orgánica es decir por el alimento no consumido. En el caso de los efluentes se probaron tres concentraciones de YUPE de 18, 36 y 72 mg L⁻¹, las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (TAN) fueron determinadas; 0.592, 0.672, y 0.718 mg L⁻¹, en dichas condiciones se reportó una reducción de TAN de 71-72% a las 6 horas posteriores a la inoculación y de un 86- 87% a las 24 horas. (Santacruz-Reyes y Chien, 2012).

Por otro lado, se probó la adición de un extracto crudo de *Agave lechuguilla* directamente en la dieta de juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei*. Además, en este mismo estudio se reportó un análisis del extracto por HPLC-MS, donde se encontró la presencia de saponinas esteroidales; diosgenina, esmilagenina, hecogenina, manogenina, tigogenina hexosa, yucagenina, clorogenina, diglucosido, también flavonol y quercetina. Se probaron cuatro tratamientos añadiendo los siguientes porcentajes del extracto de lechuguilla 0%, 0.1%, 0.3% y 0.6%. En este estudio no se midieron parámetros de calidad de agua. Sin embargo demostraron que el extracto de lechuguilla no tiene ningún efecto tóxico en la especie de camarón estudiada, incluso se mostraron beneficios, tales como un mayor crecimiento de los organismos en las dietas en las que se incluyó el extracto, en mayor medida en el tratamiento de 0.3% (Peña-Rodríguez *et al.*, 2020).

2.13 El microbioma en la salud de los organismos.

Uno de los principales problemas en la producción de crustáceos son las enfermedades infecciosas, en su mayoría causadas por patógenos oportunistas como especies del género *Vibrio* cuyo ocurren desequilibrios en el microbioma del sistema acuícola. Es por esto, que se ha reportado que un buen equilibrio en el microbioma está relacionado con la salud de los

camarones, algunas de las estrategias para mitigar desbalances son la inclusión de probióticos, prebióticos y simbióticos en los cultivos para mejorar el estado de salud de forma sostenible (Rajeev *et al.*, 2021, Quiroz-Guzmán *et al.*, 2023). En *P.vanameii* se ha observado aumento en el filo *Proteobacteria* y *Fusobacteria* en cultivos sanos, mientras que decrementos en el filo *Bacteroidetes* y *Tenericutes* en organismos enfermos con WSSV (Wang *et al.*, 2019). A su vez se ha reportado alta presencia de los filos *Alphaproteobacteria* y *Actinobacteria* en microbiomas sanos. Este tipo de organismos, son capaces de producir sustancias con efecto antimicrobiano y potenciar el crecimiento. Mientras que, en microorganismos enfermos hubo un incremento significativo del filo *Gammaproteobacteria*, en donde se clasifican patógenos como *Vibrio sp.* y *Pseudoalteromonas* (Rajeev *et al.*, 2021). Por otra parte, se encontró que al incluir extractos del *guishe* de *A.lechuguilla* en dietas del camarón blanco, se puede prevenir la Vibriosis ya que el *guishe* contiene diversos metabolitos secundarios como polifenoles y flavonoles, que han sido reportados como moduladores de la microbiota intestinal (Quiroz-Guzmán *et al.*, 2023).

2.13.1 Probióticos y prebióticos.

Los probióticos son microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de patógenos a través de diversos mecanismos; modificación de la microbiota intestinal, inmunoestimulación, adherencia competitiva en las células epiteliales o mediante la excreción de biocompuestos como enzimas, ácidos orgánicos entre otros, los microorganismos más utilizados son bacterias ácido lácticas (Alonso *et al.*, 2019, Kaktcham *et al.*, 2018). La inclusión de probióticos permite mejorar la calidad del agua de los cultivos, aumentando el número de bacterias desnitrificantes en biofiltros lo que permite la disminución de la concentración de amonio y sus derivados los cuales pueden llegar a ser letales o comprometer la salud de los camarones, también se han reportado aumentos en la FCR y crecimiento, efecto inmunoestimulante contra patógenos (Rajeev *et al.*, 2021, Toledo *et al.*, 2018). Por otra parte los prebióticos son compuestos no digeribles que se descomponen en sustancias más simples, promueven el crecimiento y actividad de microorganismos benéficos que promueven la salud de los organismos en donde se incluyen (Rajeev *et al.*, 2021). Se ha reportado que al incluir manano oligosacáridos que actúan como prebióticos se promueve el crecimiento de bacterias benéficas capaces de producir

metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, factores del crecimiento y promotores de la salud intestinal (Rajeev *et al.*, 2021). Los probióticos y prebióticos pueden ser utilizados solos o en combinación, ya que han demostrado múltiples beneficios en la salud de organismos acuáticos como estimulación de la respuesta inmunológica innata, humoral y celular (Amenyogbe *et al.*, 2020, Dawood y Koshio, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

En acuicultura es indispensable tener mecanismos de control de amonio, ya que este compuesto nitrogenado tiene una gran influencia en el desarrollo óptimo de los organismos (Caipang y Aguana, 2011). Las altas concentraciones de los compuestos nitrogenados causan estrés en el camarón y favorecen la proliferación de patógenos, provocando infecciones, lento crecimiento e incluso la muerte (Carroza *et al.*, 2012). De tal manera que el proceso de biotransformación de amonio es una eficiente estrategia para disminuir los efectos negativos que producen las elevadas concentraciones de compuestos nitrogenados tanto en los camarones como en el medio ambiente (Lawson, 2011). Por otra parte el *guishe* representa graves problemas ecológicos a pesar de tener un alto potencial de ser valorizado debido sus altas concentraciones de biocompuestos de alto valor agregado entre los que se encuentran las saponinas (Morreeuw *et al.*, 2021), que se ha demostrado tienen la capacidad de disminuir la concentración de amonio en el agua de los cultivos (Paray *et al.*, 2021) , además la valorización de este residuo podría significar una crecimiento económico para la población de lechuguilleros.

4. HIPÓTESIS

Al añadir *guishe* de *Agave lechuguilla* a un cultivo de camarón se disminuirán las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (TAN), lo que permitirá mantener la calidad de agua dentro de los parámetros aceptables.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto del *guishe* del *Agave lechuguilla* sobre la calidad de agua en cultivos de camarón de tipo intensivo.

5.2 Objetivos particulares

- Comparar el contenido en saponinas de tres regiones productivas de *Agave lechuguilla* por análisis transcripcionales *in silico*.
- Cuantificar las saponinas por HPLC en el extracto de la región con mayor abundancia.
- Probar el efecto del *guishe* de *Agave lechuguilla* sobre la calidad de agua durante el cultivo de camarón de tipo intensivo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Selección de la región con mayor abundancia en saponinas.

El grupo de trabajo obtuvo muestras de *Agave lechuguilla* de tres regiones i) Matehuala en San Luis potosí (23°39'10"N 100°38'40"W) ii) Ejido Cosme (25°52'03.6" N; 101°19'51.1" W) y Ejido Tuxtepec (26°11'29.8" N; 101°11'0.96" W) de Ramos Arizpe Coahuila. A los que se les realizaron extracciones de RNA para la construcción del reporte de anotación que fue generado previamente a partir de él se comparó el contenido en saponinas de tres regiones productoras de *Agave lechuguilla* mediante análisis transcripcionales *in silico*. Primero, se llevó a cabo la descripción de la ruta de biosíntesis de saponinas, haciendo uso de la segunda versión del reporte de anotación del transcriptoma *de novo* del *A. lechuguilla*, reportado previamente en GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), como Bioproject con número de acceso PRJNA598966. Con base en la literatura se estableció el 2,3 oxido-escualeno como el precursor de las saponinas tanto esteroidales como triterpénicas, a partir de este compuesto se inició la ruta haciendo uso de las bases de datos de KEGG y UNIPROT. Para esto, se buscó que cada enzima involucrada en la ruta estuviera presente en el reporte de anotación, se tomaron aquellas enzimas que pertenecieran al subreino *Viridiplantae*, si estas no pertenecían a este reino, las enzimas fueron buscadas en la base de datos de *Arabidopsis thaliana* TAIR, si las enzimas no eran encontradas en dicha base, se realizó un blast complementario (tblastn) para buscar homología con especies de plantas.

Una vez descrita la ruta, se realizó un análisis de expresión diferencial, en el que se utilizaron los ID's de TRINITY de cada enzima, establecidos en el reporte de anotación, estos fueron buscados y comparados en reportes de abundancias en donde se encuentran los transcritos por millón (TPM) de las tres regiones lechuguilleras, los primeros análisis estadísticos se hicieron mediante el software EXCEL en donde se compararon los TPM de las tres regiones, en el caso de ser isoformas de la enzima, estos fueron promediados, así mismo se calculó la media y desviación estándar, los resultados fueron presentados en gráficos de barras. Posteriormente se realizó el análisis estadístico en donde comprobó normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas Lilliefors y Levene respectivamente, se compararon las medianas de los tratamientos a través de

la prueba Kruskal wallis y la prueba Post hoc de Wilcox. Por último, se realizó un heatmap mediante el software R studio.

6.2 Muestreo.

Mediante los análisis transcripcionales *in silico* se seleccionó la región con mayor abundancia en saponinas. Se procedió a visitar la comunidad de Ejido Cosme, Coah. En donde se acompañó a los talladores a recolectar los cogollos de *Agave lechuguilla* cumpliendo con la NOM-008-SEMARNAT-1996, para que posteriormente fueran sometidos a tallado mecánico, inmediatamente se recolectó el bagazo (*guishe*). Se almacenaron alrededor de 262 kg en tambos de plástico, cubiertos con bolsas plásticas negras para proteger el *guishe* de la luz, ya que este factor afecta el contenido de fitoquímicos, posteriormente se transportó el *guishe* hasta Ejido Frausto, Coahuila (25° 54' 5.3" N; 101° 8' 39.2" W) en donde se prensaron de manera hidráulica alrededor de 247 kg de *guishe* (fig. 7) se obtuvieron 78.71 L de jugo de *guishe*.



Figura 7. Recolección del guishe y prensado hidráulico del guishe, Ejido Fraustro Coah. Fotografía tomada en campo por Selena Karina Hernández

6.3 Procesamiento del *guishe* de *Agave lechuguilla*

El procesamiento de las muestras de *guishe* se realizó en el laboratorio de biotecnología ambiental de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila en Saltillo, Coahuila.

6.3.1 *Guishe* fresco.

Alrededor de 40 kg de biomasa de *guishe* aun verde y fresco fueron secados en un deshidratador de charolas (KOLEFF KL-10) a 35°C durante aproximadamente 16 horas (fig. 8), en condiciones de oscuridad para evitar la pérdida de compuestos de alto valor. Una vez secó se procedió a moler la biomasa a un tamaño de partícula promedio de 2 mm con ayuda del molino de corte (Retsch SM100). El *guishe* se conservó en bolsas negras y alejado de la luz hasta su posterior uso.



Figura 8. Secado del *guishe* en deshidratador KOLLEFF. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández

6.3.2 Jugo de *guishe*.

El jugo de *guishe* se conservó en congelación hasta su uso. Para el secado del jugo se descongeló a temperatura ambiente y en oscuridad. Se estandarizó un método propuesto por el grupo de trabajo. Brevemente, el jugo se espuma por completo en volúmenes de aproximadamente 200 ml con ayuda de una batidora casera, posteriormente se agrega la espuma en charolas de aluminio en capas finas de 0.5 cm – 1 cm como máximo (fig. 9 y fig. 10), se llevan inmediatamente las charolas al secador KOLEFF a 35°C por 16 a 24 horas, hasta que la espuma está completamente seca y se rompe con facilidad. Con ayuda de una espátula se despega la espuma de las charolas. La espuma se guarda en polvo en bolsas Ziploc, reservadas de la luz. Por día fue posible secar cerca de 1.300 L, finalmente se secaron 27.82 L. Se obtuvieron 216.24 gr por cada litro de *guishe* aproximadamente.

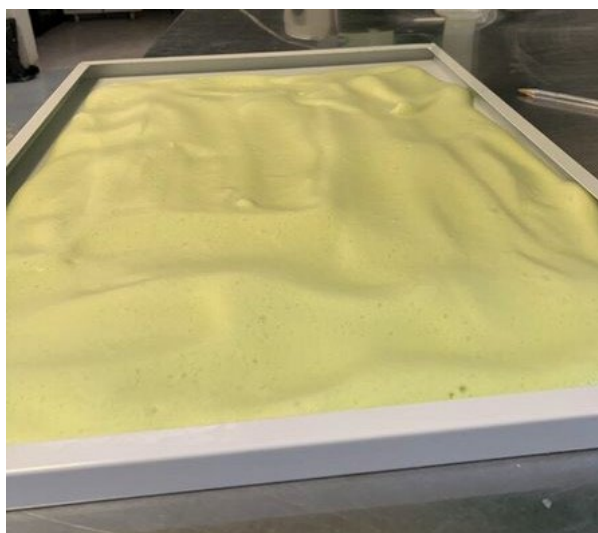


Figura 9. Espuma de jugo de *guishe*
Fotografía tomada por Selena Karina Hernández

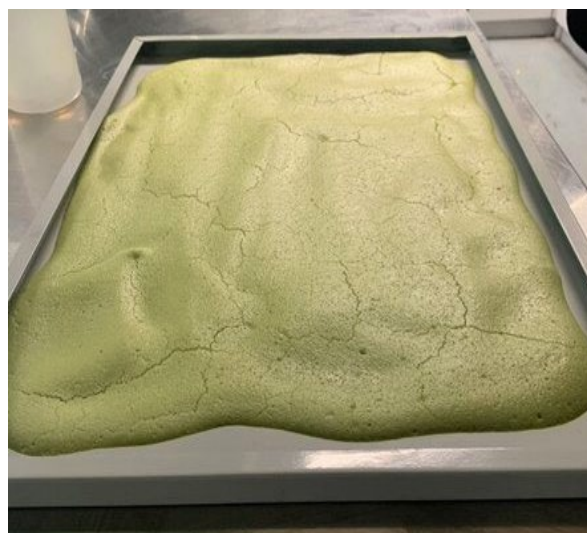


Figura 10. Espuma de jugo de *guishe* seco
Fotografía tomada por Selena Karina Hernández

6.3.3 Hidrolizado enzimático

Para la obtención del extracto se trata la biomasa del *guishe* seca. Se pesan 70 g de *guishe* en frascos Duran cilíndricos de 250 ml con 10 g cada uno, posteriormente se añaden 100 ml de Buffer de fosfatos 0.1 M (1:10 p/v) a pH 4.0 y 3.4 μ L de mix enzimático ultrafloMax de

Novozymes A/S Denmark por gramo de *guishe*. La Mezcla se incuba en agitación constante (180 rpm) por 2.5 horas a 40°C en una incubadora TECNAL TE-4200. Una vez transcurrido el tiempo se realiza un pre filtrado de la muestra con un embudo y gasas estériles para eliminar la mayor cantidad de biomasa y así facilitar el filtrado al vacío. Por último, se utiliza un embudo Buchner con papel filtro y un matraz kitazato acoplado a una bomba de vacío, la muestra se filtra lentamente, cuidando la formación de espuma para evitar pérdidas del extracto.

La muestra filtrada se somete a batido mecánico hasta espumarla en su totalidad y posteriormente se coloca en charolas de aluminio en capas de 0.5 cm (fig. 11). Posteriormente se secan en un horno KOLEFF a 35°C por 18 horas (fig. 12). Se obtuvieron 21.773 g de hidrolizado enzimático a partir de 70 gramos de *guishe*.

El buffer de fosfatos fue preparado al momento con una solución de fosfato monobásico (KH_2PO_4) 0.1 M marca Jalmek y se ajustó el pH a 4.00 ± 0.2 con una solución de ácido cítrico 5 M gota a gota, después se aforó a un volumen de 1 L.



Figura 11. Espuma Hidrolizado enzimático. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández



Figura 12. Hidrolizado enzimático Secador KOLEFF. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández

6.4 Extracción y Cuantificación de saponinas.

Para la extracción y cuantificación de saponinas se utilizó la metodología modificada propuesta por (Navarro del Hierro *et al.*, 2020).

6.4.1 Extracción.

Para la extracción de saponinas se pesaron 10 gramos de espuma de jugo de *guishe* y 20 gramos de *guishe* molido, ambos previamente secados como se describió antes, posteriormente se agregaron 100 ml de metanol (1:10 p/v y 2:10 p/v respectivamente), la muestra se sometió a un microprocesador ultrasónico SONICS Vibra cell VCX-750 por 15 minutos con los siguientes parámetros; temperatura 40°C, amplitud 0.60%, pulse ON 15 sec, pulse Off 05 sec. (fig. 13). Las muestras fueron montadas por duplicado, después de la extracción por ultrasonido se centrifugó a 5,000 rpm por 15 minutos y se recolectó el sobrenadante por decantación y se midió el volumen, se agregó el mismo volumen de Hexano y se agitó en vortex por 1 minuto para después ser centrifugado a 5,000 rpm por 10 min. La fase de hexano fue removida y la fase metanólica se pasó a un matraz bola previamente pesado, la muestra se rotoevaporó (IKA RV 10 digital) a 70°C a 150 rpm, hasta que el solvente se evaporara por completo, los matraces se dejaron reposando a temperatura ambiente hasta que se enfriaran por completo, para posteriormente pesarlos. Se agregó agua destilada en relación 1:20 (p/v) muestra solvente, las muestras re suspendidas se pasaron a tubos falcon cónicos y se les añadió 1-Butanol 1:2 (p/v), se agitó nuevamente en vortex por 1 min y se centrifugó a 5,000 rpm por 10 minutos, seguido se recogió la fase superior y se extrajo nuevamente la fase inferior con las mismas condiciones descritas a partir de la adición de agua destilada. Por último, fueron vertidos 0.5 mL de la fase butanólica extraída a viales ámbar para HPLC con ayuda de una jeringa y un filtro 0.45 µm Nylon membrane, las muestras fueron guardadas en ultracongelación para su posterior uso.



Figura 13. Muestra de *guishe* en ultrasonido de punta. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández

6.4.2 Extracción Hidrolizado enzimático

Se colocó 0.1 g de hidrolizado enzimático en 1 ml de metanol. Las muestras en ambos métodos fueron montadas por duplicados y estas fueron filtradas y almacenadas en viales ámbar para HPLC en condiciones de ultracongelación hasta su uso.

6.5 Cuantificación por HPLC-UV.

Para la cuantificación de saponinas se utilizó un detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies 1250 Infinity), del Laboratorio de Biotecnología ambiental de Universidad Autónoma de Coahuila con una columna de 250 mm x 4.6 mm (Agilent Zorbax C18 ODS). Se cuantificó el contenido en saponinas en dos tipos de muestras de cada uno de los extractos, para el hidrolizado enzimático se utilizaron las muestras sometidas a extracción e hidrólisis, tal como se describe previamente y una muestra únicamente filtrada después de llevar a cabo la

hidrólisis enzimática, lo mismo ocurrió para el extracto de jugo de *guishe* en donde el jugo fresco se filtró con ayuda de un filtro de membrana de 0.25 μm y una segunda muestra sometida a extracción, la longitud de onda utilizada fue de 203 nm.

6.5.1 Acondicionamiento del equipo y columna.

Se utilizaron únicamente dos líneas de suministro del equipo, la primera con Agua grado HPLC y la segunda con acetonitrilo previamente filtrado con una membrana de 45 μm , posteriormente se realizó una purga del equipo a un flujo de 5mL/min. El acondicionamiento de la columna se realizó por 30 minutos, esto es en proporción al tamaño de la columna (25cm). El flujo se subió en intervalos de 0.20 desde 0 a 2 ml/min en las condiciones de la tabla 2, hasta que se llevó a la condición del primer flujo del método.

Tabla 2. Acondicionamiento de la columna

Acetonitrilo (%)	Agua (%)	Tiempo (min)
80	20	10
60	40	5
40	60	5
20	80	10

6.5.2 Método de cuantificación.

La cuantificación se realizó mediante un método de gradiente (tabla 3) a 35°C, en donde la fase móvil consistió en agua y acetonitrilo. El método fue nombrado previamente por el grupo de trabajo como 6saponinas.M, el cual ya contaba con las curvas de calibración de los 6 estándares; disogenina, ginsenosido, protodioscina, gracillina, trillina y soyasaponina.

Tabla 3. Método de gradiente 6saponinas.M HPLC-UV

Tiempo (min)	Acetonitrilo (%)	Agua (%)	Flujo (ml/min)
0	20	80	1
5	30	70	1
35	40	60	1
40	60	40	1
60	85	15	1
75	100	0	1
80	100	0	1
85	20	80	1

6.6 Bioensayo.

La actividad de los extractos de *guishe* fue evaluada en un cultivo de camarón dentro de las instalaciones del laboratorio húmedo de Nutrición acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste (CIBNOR) unidad La Paz. En 22 acuarios con capacidad de 50 L (fig. 14 y fig. 15), en los cuales se colocaron 10 juveniles de camarón *Penaeus vanameii* por tanque, con peso promedio de 0.52 g, equipados con un sistema de aireación para mantener un oxígeno disuelto de $>4 \text{ mg L}^{-1}$, a una temperatura de $28 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 36 días con 20% de recambio de agua y evaluando por triplicado tres concentraciones 18 mg/L, 36 mg/L y 72 mg de hidrolizado enzimático y jugo de *guishe* seco, y un grupo control sin extractos, agregando 0.775 g, 1.55 g y 3.10 g respectivamente en 43 L de agua en el día 7 y 9 días después, monitoreando diariamente la temperatura y amonio. Simultáneamente se fijaron muestras de agua cada tercer día con fenol al 5 % para evaluar la concentración de amonio (N-NH₄), mediante colorimetría y así cuantificar la concentración de amonio en el agua de cada uno de los tratamientos, basándonos en los parámetros medibles del Kit Ammonia NH₃/NH₄⁺ de Api®. A su vez los parámetros zootécnicos fueron calculados mediante las siguientes formulas: Peso ganado (WG %) = $100 * (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}$, Rango específico de crecimiento (SGR %/ día) = $100 * (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{número de días}$, Consumo de alimento (FI (g)) = total de alimento por camarón durante el bioensayo, Tasa de conversión de alimentos

(FCR) = $FI / (\text{peso medio final} - \text{peso medio inicial})$, Tasa de supervivencia (%) = $\text{número final de camarones} / \text{número inicial de camarones} * 100$.



Figura 14. Acuarios de fibra de vidrio en laboratorio húmedo de nutrición acuícola CIBNOR. Fotografía tomada por Selena Karina Hernández

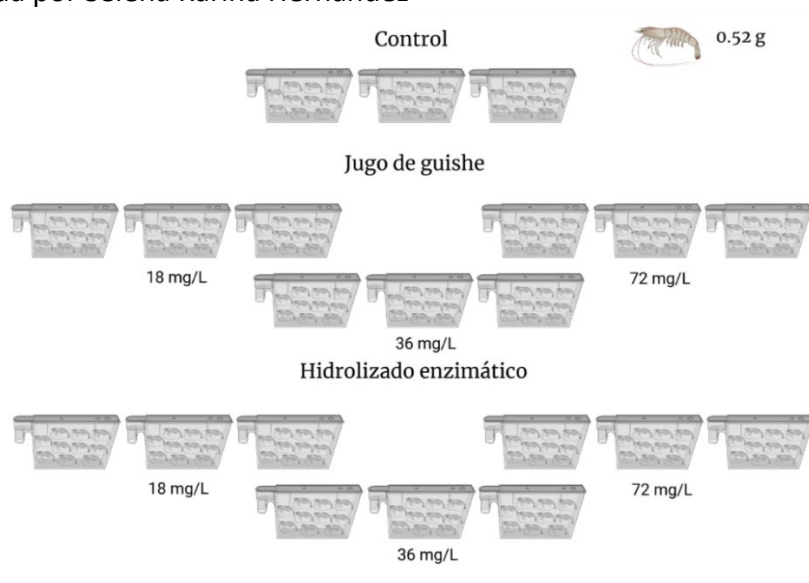


Figura 15. Diseño experimental del bioensayo REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de guishe, J2 = 32 mg/L jugo de guishe.

6.6.1 Análisis estadístico Bioensayo.

Los datos fueron analizados mediante el software R version 4.1.2. Se comprobó normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas Lilliefors y Levene respectivamente, posteriormente se realizó un análisis de varianzas con la prueba Kruskal-wallis, en caso de obtener diferencias significativas en la prueba se empleó la prueba post hoc Wilcox con corrección de Bonferroni.

6.6.2 Dieta de los camarones

Se elaboraron 8 kilos de alimento para camarón en la planta piloto de nutrición acuícola de CIBNOR unidad la Paz. Primero se tamizaron las harinas usando el tamiz No.20, posteriormente se pesaron cada uno de los ingredientes; 2,840 g de harina de trigo, 1,824 de harina de pescado (69% sardina), 2,640g harina de soya (47 solv), 320 g de lecitina de soya, 240 g de aceite de pescado, como aglutinante se utilizaron 80 g de alginato, 8 g de vitamina C, 40 g de la mezcla comercial vitamin mineral premix y 8 g de cloruro de colina, posteriormente se le añadieron 350 ml de agua purificada por cada kilogramo de alimento y se mezcló con ayuda de una batidora industrial (Thunderbird bakery ARM-30), posteriormente la mezcla obtenida se homogenizó a baja velocidad en un molino de carne industrial seguido se pasó la mezcla nuevamente por el molino para formar los pellets, dichos pellets fueron secados en horno a 40°C por 12 horas. El valor nutricional del alimento se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Contenido nutricional de la dieta del camarón.

Elemento	Contenido
DM%	91.40442
Ash%	6.46018
GE MJ/kg	12.0838
DE MJ/kg	10.6636
CP%	34.97946
Dig CP%	28.6827
Lipid%	7.88098
Fibre%	0.55536
LOA (18:2n-6)%	1.47772
LNA (18:3n-3)%	0.23487
ARA (20:4n-6)%	0.04962
EPA (20:5n-3)%	0.3168

DHA (22:6n-3)%	0.6132
Total n-3%	1.16487
Total n-6%	1.52734
n3:n6	0.76267891
Total phospholipid%	4.626
Cholesterol%	0.11553
Astaxanthin (mg/kg)	0
Arginine%	2.24194
Histidine%	0.87109
Isoleucine%	1.56964
Leucine%	2.60887
Lysine%	2.22469
Methionine%	0.73742
M+C%	1.18178
Phenylalanine%	1.60558
P+T%	2.81168
Threonine%	1.34315
Tryptophan%	0.46007
Valine%	1.70246
Ca%	1.107
Available P%	0.9783

6.7 Análisis de calidad de agua.

Se midieron las concentraciones de NH_4 mediante espectrofotometría con ayuda del lector de placas Synergy HTX de BioTek Instruments. Primero se preparó una solución madre de NH_4Cl 0.05M, (FagaLab) con agua de mar. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta obtener las concentraciones de 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0.5 ppm y 0.25 ppm a una longitud de onda de 680 nm. Por otra parte, se modificó el volumen de reacción descrito en el inserto del Kit API AMMONIA $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ en donde establece que se toman 5 ml de muestra de agua y 8 gotas de cada reactivo, se logró reducir la reacción en donde se tomó 1 ml de muestra y se agregaron 56 μl de cada uno de los reactivos en tubos Eppendorf cónicos de 1.5 ml. Posteriormente se incubaron las muestras por 5 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5000 rpm por 5 y 3 minutos para comparar si el tiempo de centrifugación puede afectar la lectura de las muestras. Finalmente se colocaron 200 μl de cada una de las reacciones en microplacas de 96 pozos por triplicado.

Adicionalmente, se realizó la construcción de las curvas de calibración en donde se utilizaron las soluciones de NH_4Cl previamente descritas con el fin de correlacionar las absorbancias obtenidas de las reacciones con la concentración de amonio mediante la ecuación de Beer-Lambert $A = \epsilon \cdot B \cdot C$ y se sustituyó con la ecuación de la recta, el método seleccionado fue aquel con un coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1.

6.7.1 Análisis estadístico calidad de agua.

Se comprobó normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas Lilliefors y Levene respectivamente. Posteriormente se realizó un análisis de varianzas con la prueba Kruskal-Wallis, en caso de obtener diferencias significativas en la prueba se empleó la prueba post hoc Wilcoxon con corrección de Bonferroni. Así mismo se compararon únicamente los dos mejores tratamientos mediante la prueba de Mann-U Whitney.

6.8 Análisis microbiológicos

Se recolectaron muestras de agua durante 36 días en intervalos de cada tercer día por unidad experimental con hidrolizado de *agave lechuguilla* y jugo de *agave lechuguilla*. Se tomaron aproximadamente 40 ml de muestra de agua en tubos falcon cónicos estériles. Todas las muestras fueron procesadas para estimar el Recuento Total de Bacterias Ácido-Lácticas (TLABC) y el Recuento Total de *Vibrio* (TVC) utilizando la técnica de placa extendida. La muestra se diluyó en serie (10^3 - 10^6) y se sembró en placas de Man Rogosa Sharpe con NaCl al 2,5 % (MRS) para determinar la TLABC. El TVC se determinó sembrando en agar tiosulfato, citrato, sal biliar y sacarosa (TCBS). Las placas se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24-48 h.

6.8.1 Análisis estadístico comunidades microbianas.

Los datos fueron analizados mediante el software R version 4.1.2. Se comprobó normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas Lilliefors y Levene respectivamente.

6.9 Cuantificación de azúcares en los extractos.

Se llevó a cabo la cuantificación de azúcares en muestras de jugo de *guishe* e hidrolizado enzimático en polvo utilizando 10 mg mL^{-1} que se disolvieron en un buffer de fosfatos ($100 \text{ }\mu\text{M}$, pH 7.2), posteriormente se cuantificó el contenido total de azúcares reductores empleando el método de DNS de Miller modificado. Brevemente se tomaron $100 \text{ }\mu\text{L}$ de cada una de las muestras fueron disueltas en $300 \text{ }\mu\text{l}$ de ácido dinitrosalicílico (DNS) (1% DNS, 7,5% tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 1,6% NaOH) y se incubaron a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se colocaron $200 \text{ }\mu\text{L}$ de la reacción en micro placas de 96 pozos y fueron medidas por espectrofotometría a 240 nm (Miller, 1959). La concentración de azúcares se determinó en base a una curva de calibración de glucosa con concentraciones de 0-6 mM, los ensayos fueron montados por triplicado.

7. RESULTADOS

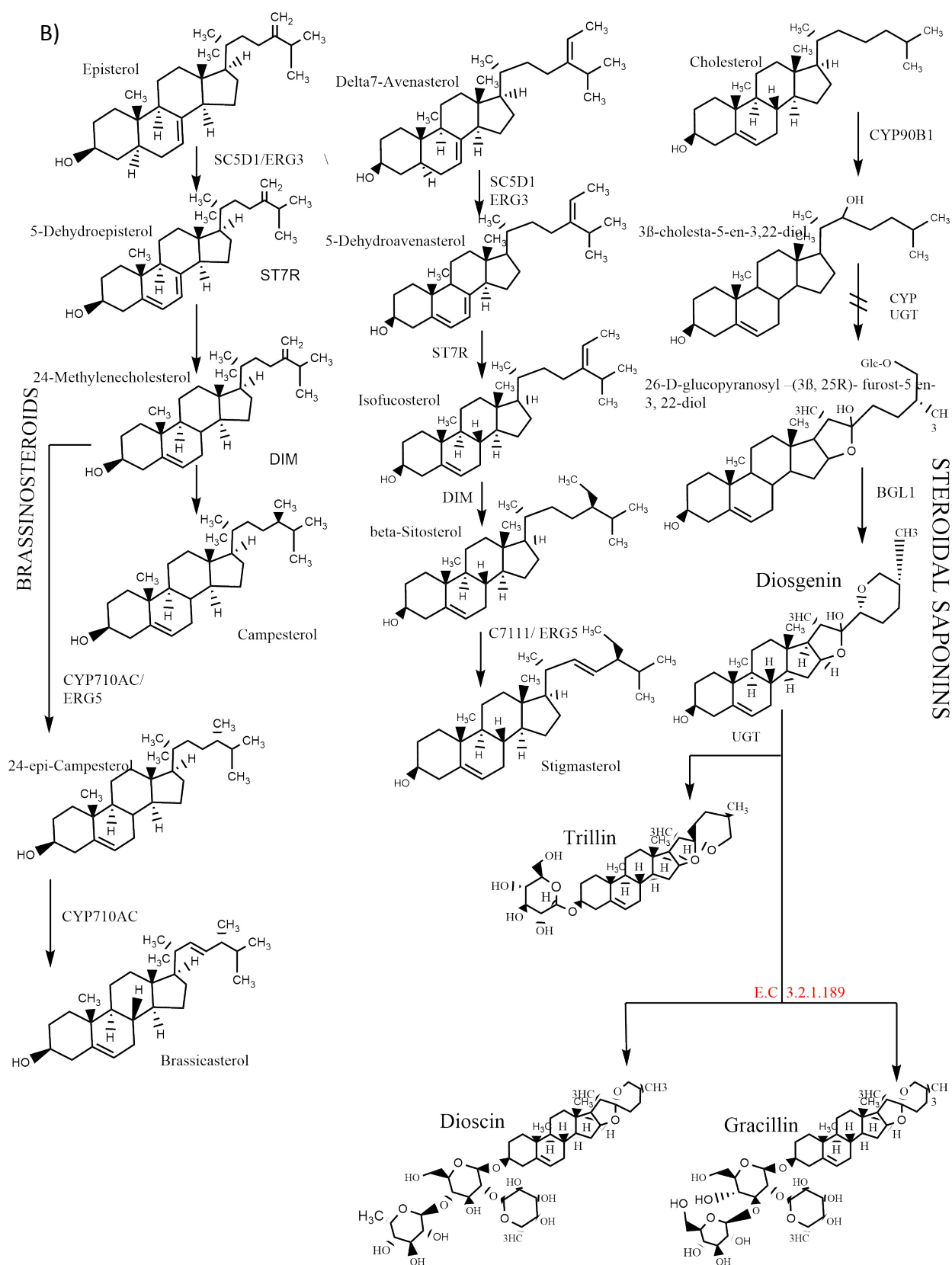
7.1 Análisis transcripcionales *in silico*.

Se encontraron 39 enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de saponinas (fig. 16) de las cuales 28 se encuentran en el reporte de anotación del transcriptoma *de novo*, asimismo se tiene conocimiento de las abundancias (TPM) de las enzimas en cada una de las tres regiones (anexo A). A partir de las enzimas encontradas en el reporte de abundancias se realizó el análisis de expresión diferencial en donde se compararon un total de 48 enzimas con sus respectivas isoformas, de las cuales cerca del 91% cuentan con una mayor abundancia en Ejido Cosme (fig. 17) en cuanto a los TPM Ejido Tuxtepec cuenta con 207.41, Ejido Matehuala 135.54 mientras que Ejido Cosme 510.14, a su vez se encontraron diferencias significativas entre las regiones ($p = 1.42e-05$), en la prueba Post hoc se encontró que Cosme es tiene una abundancia diferente a Tuxtepec y Matehuala pero no existe diferencias significativas entre estas últimas regiones, Por lo tanto se eligió Ejido Cosme como la región con mayor abundancia en saponinas.

7.1.1 Ruta de biosíntesis de saponinas.

La biosíntesis de saponinas empieza por la oxidación del escualeno obtenido de la ruta del mevalonato a 2,3 oxidoescualeno catalizado por la enzima escualeno epoxidasa (ERG14) 1. El 2-3 oxidoescualeno es el precursor de las saponinas esteroidales y triterpénicas, dependiendo de la enzima que catalice la reacción la conformación de la aglicona se diferenciará en la ruta, en el caso de las saponinas esteroidales la enzima lanosterol sintasa (ERG7) se encarga de ciclar el precursor en lanosterol. Posteriormente, se llevan a cabo una serie de reacciones como metilaciones, carboxilaciones, oxidaciones y reducciones mayormente en los carbonos C-5 y C-4 (fig. 16) hasta llegar a la síntesis del colesterol a partir de la reducción del desmosterol por la enzima Delta(24)-sterol reductasa (DIM), seguido de una serie de reacciones en donde se involucran citocromos p450 (CYP) se obtiene la primer sapogenina esteroideal diosgenina la cual va a dar pie a la formación de saponinas como trillina, gracillina y dioscina, se propone que la dioscin glucosidasa (E.C3.2.1.189) cataliza la reacción para la formación de dioscina y gracillina. Por otra parte, para la formación de saponinas triterpénicas se inicia mediante la ciclación del a

2,3 oxidosqualeno por una enzima perteneciente a las oxidosqualeno ciclasas obteniendo como producto β -amirina la cual servirá para la formación de saponinas triterpénicas como soyasaponina (Anexo B), se observa (fig. 16) la falta de un número considerable de enzimas involucradas en la biosíntesis de triterpenos por lo que es necesario crear una base complementaria para la búsqueda de dichas enzimas.



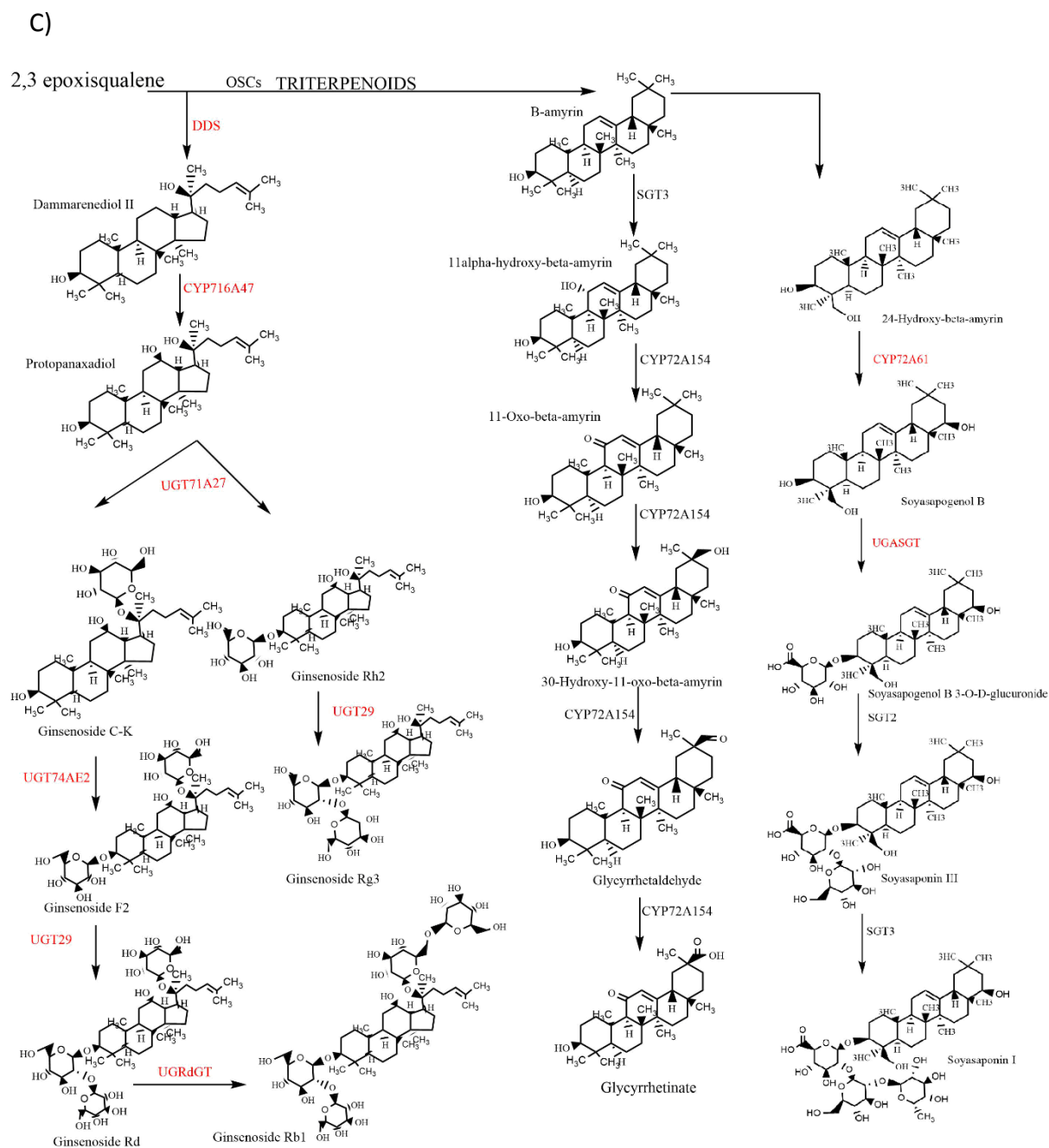


Figura 16. Ruta de biosíntesis de saponinas. A) inicio de la ruta biosíntesis de fitosteroles, B) continuación de la ruta biosíntesis de brassinosteroides y saponinas esterodales C) continuación de la ruta Biosíntesis de saponinas triterpénicas. En rojo se encuentran las enzimas faltantes.

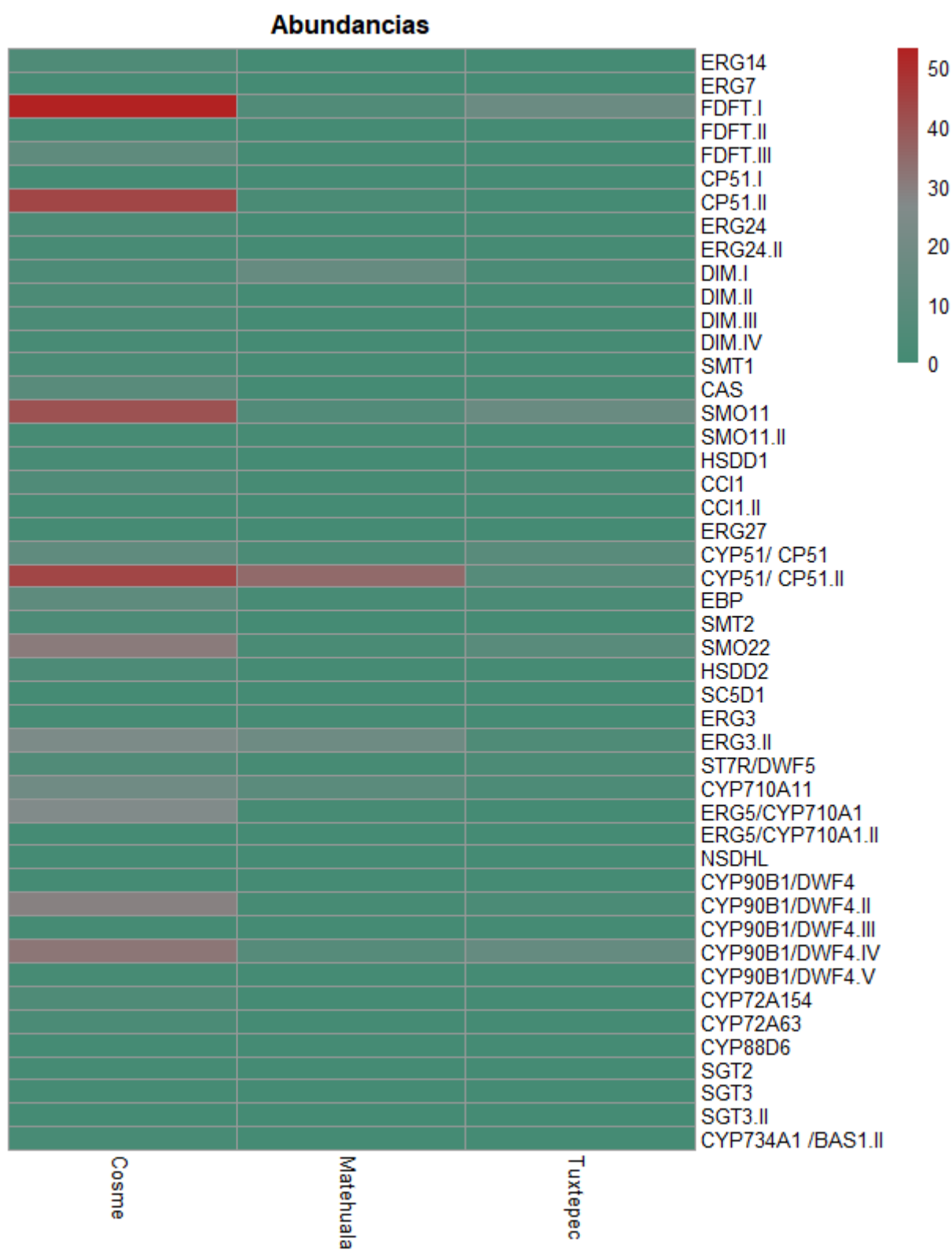


Figura 17. Heatmap de abundancias de enzimas. La abundancia representada por los TPM.

7.2 Cuantificación de saponinas.

No fue posible cuantificar el contenido de saponinas en los extractos sometido a extracción, sin embargo fue posible obtener la concentración de saponinas en los extractos que no fueron sometidos a ningún tratamiento previo a la cuantificación (Anexo C y D) encontrando que existen diferencias entre el contenido total de saponinas entre el jugo de *guishe* (513.51 ppm) y el hidrolizado enzimático (226.60 ppm) con una diferencia de más del doble de saponinas totales como se observa en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Cuantificación de saponinas por HPLC-UV en jugo de guishe.

Jugo de guishe		
Tiempo de retención	Ppm	Nombre
8.416	205.43181	Protodioscina
15.465	-	Soyasaponina
25.926	214.54614	Ginsenosido
44.989	29.72154	Gracillina
50.714	63.81327	Trillina
72.782	-	Diosgenina
Total: 513.51276		

Tabla 6. Cuantificación de saponinas por HPLC-UV en hidrolizado enzimático.

Hidrolizado enzimático		
Tiempo de retención	Ppm	Nombre
8.416	9.70230	Protodioscina
15.465	-	Soyasaponina
25.926	-	Ginsenosido
44.989	133.63910	Gracillina
50.714	42.77169	Trillina
72.782	40.49162	Diosgenina
Total: 226.60471		

7.3 Bioensayo

7.3.1 Análisis cualitativo de amonio.

Las concentraciones de amonio obtenidas durante el cultivo se observan (fig. 18 y fig. 19). Después de la primera adición de los extractos de *guishe* se generó un ambiente de hipoxia, en la que el oxígeno llegó a una concentración menor a 2 mg/L, lo que ocasionó la muerte del 50% de los camarones del tanque 31 y 60% del tanque 45 ambos pertenecientes al tratamiento J3 (72 mg/L de jugo de *guishe*), por lo que se decidió descartar este tratamiento del análisis estadístico.

Se obtuvo un valor de p de 8.87×10^{-6} ($\alpha=0.05$) por lo tanto existieron diferencias significativas entre los tratamientos en la prueba POST HOC de Tukey, y se determinó que existen diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos respecto al control, pero no existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos H3 y J1.

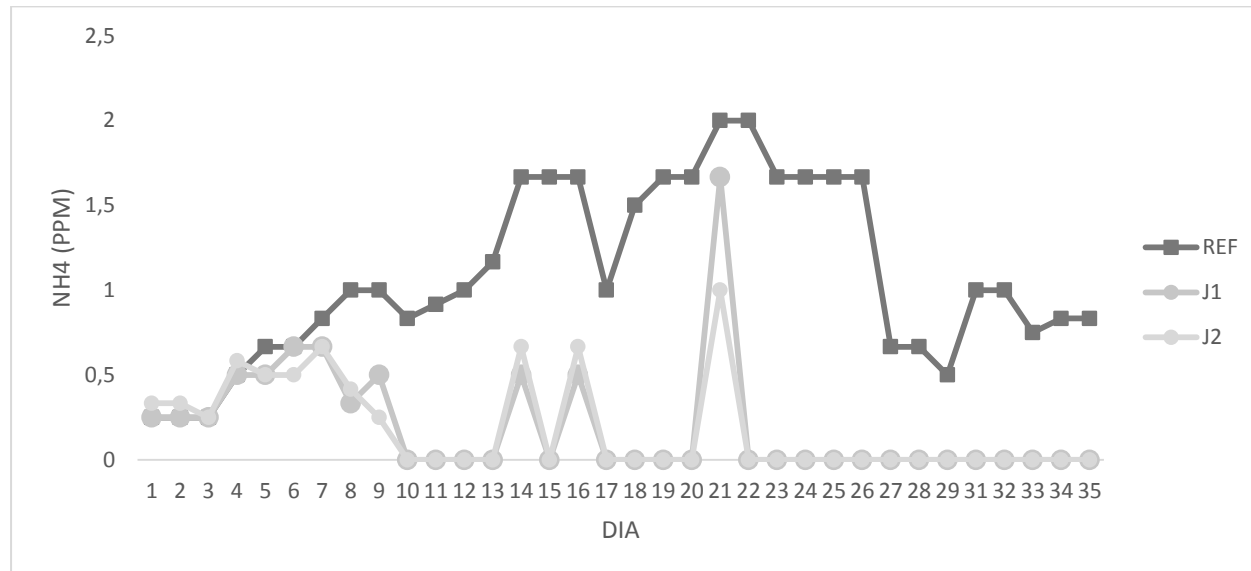


Figura 18. Efecto de los tratamientos con jugo de *guishe* sobre las concentraciones de amonio. REF = control, J1= 18 mg/L jugo de *guishe*, J2 = 32 mg/L jugo de *guishe*.

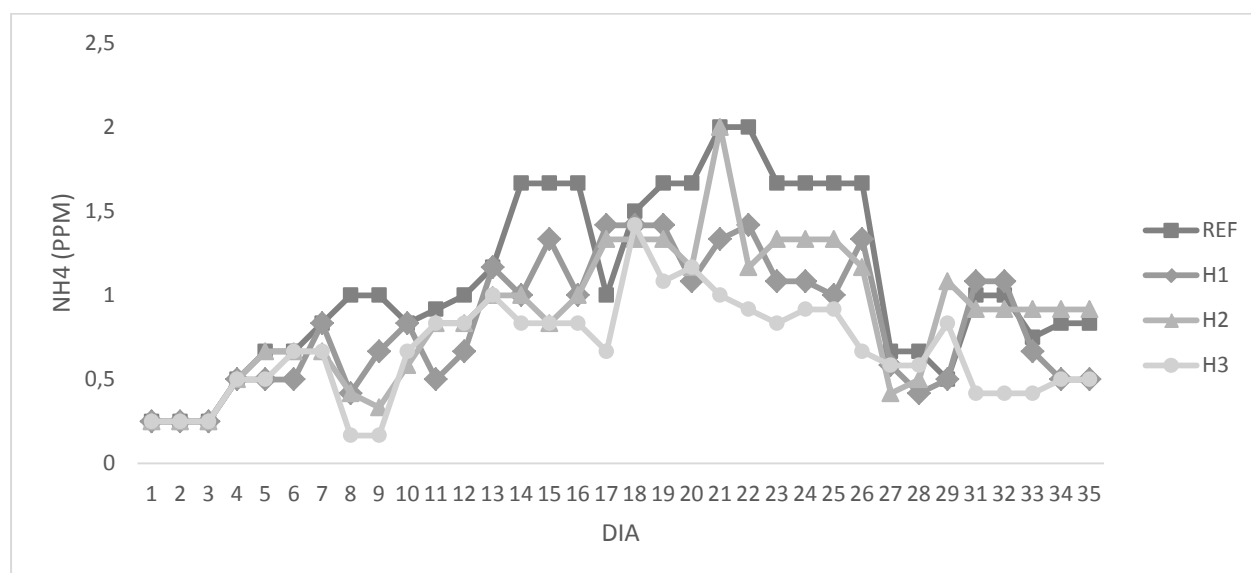


Figura 19. Efecto sobre las concentraciones de amonio de los tratamientos con el hidrolizado enzimático. REF= control, H1= 18 mg/L, H2= 36 mg/L, H3= 72 mg/L hidrolizado enzimático.

7.3.2 Análisis cuantitativo de Amonio.

Basado en las curvas de calibración mostradas (fig. 20 y fig. 21) se seleccionó la metodología a seguir en las reacciones para determinar la concentración de amonio, se optó por centrifugar por un menor tiempo (3 min) debido a que se obtuvo un $R^2= 0.9996$ en contraste con el $R^2= 0.986$ obtenido después de centrifugar por 5 minutos las muestras. Por lo tanto, se sustituyó la ecuación de la recta mostrada en la fig. 21 en la ecuación de Beer-Lambert obteniendo la siguiente ecuación: $x = \frac{y+0.0043}{0.0949}$ en donde x = concentración de amonio en ppm, y= absorbancia obtenida, lo que permitió cuantificar las concentraciones de NH_4^+ en las muestras de agua previamente fijadas con fenol durante el bioensayo.

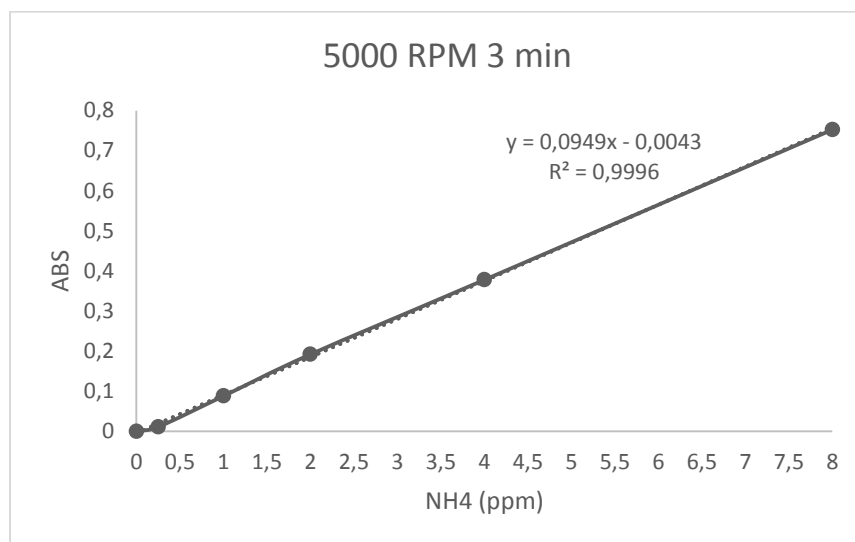


Figura 20. Curva de calibración 1 obtenida, Vol reacción: 1 ml, tiempo de centrifugación: 3 minutos 5000 RPM.

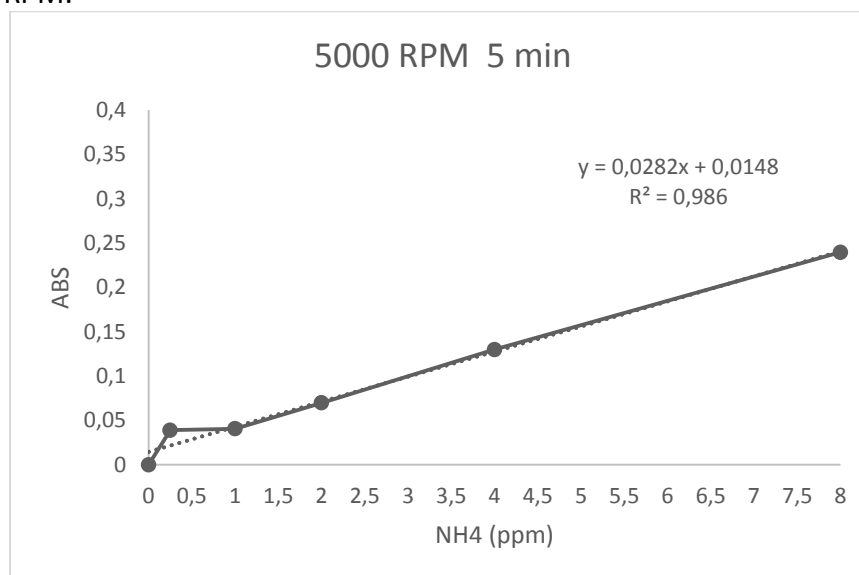


Figura 21. Curva de calibración No.2, Volumen de reacción: 1 ml, tiempo de centrifugación: 5 minutos 5000 RPM.

Una vez obtenidas las concentraciones de NH_4^+ con base en la curva de calibración 1 (fig. 20) se obtuvo un valor de $p = 0.0005368$ ($\alpha = 0.05$) en el análisis de datos. Por lo tanto, la mediana de al menos uno de los tratamientos es significativamente diferente, en la prueba post hoc se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos H3 y J2 respecto al control ($p =$

0.00037). Por último, se compararon los dos mejores tratamientos en donde no se encontraron diferencias significativas entre los mismos ($p= 0.5453$). Tomando en cuenta las medianas de los tratamientos se encontró que el tratamiento H3 logró mantener un 28.7% menor la concentración de amonio, mientras que el tratamiento J2 la disminuyó un 39.8%, el análisis estadístico se describe (fig. 22).

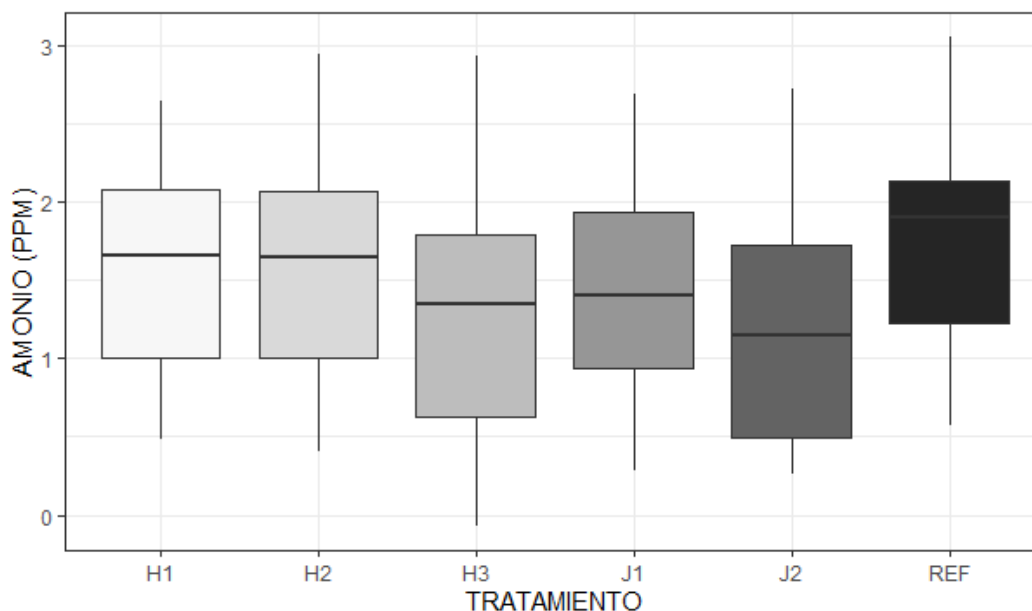


Figura 22. Análisis cuantitativo de amonio mediante espectrofotometría. REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de *guishe*, J2 = 32 mg/L jugo de *guishe*.

7.3.3 Efecto del *guishe* en el pH

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con *guishe* respecto al control ($p=0.5247$), por lo tanto, no muestra un efecto sobre el pH del agua de los tratamientos (fig. 23).

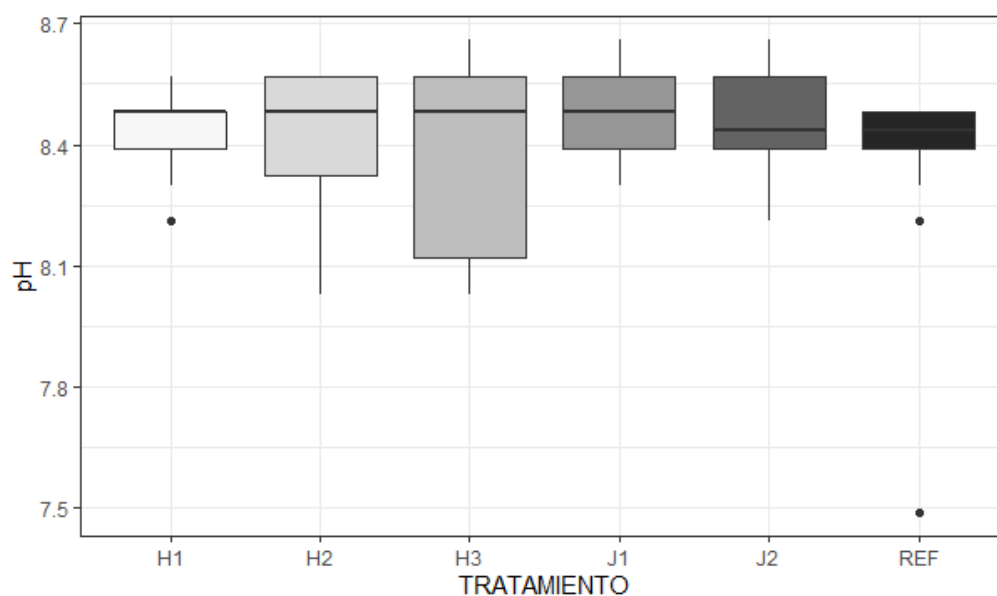


Figura 23. Efecto del *guishe* sobre el pH del agua. REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de *guishe*, J2 = 32 mg/L jugo de *guishe*.

7.3.4 Parámetros zootécnicos

Se obtuvo un valor de $p = 1.032 \times 10^{-9}$ a un valor de significancia de 0.05 por lo tanto existieron diferencias significativas entre al menos uno de los tratamientos además se encontró que existen diferencias significativas entre los tratamientos J1 y J2 respecto al control y J1 con H3 y J2 con H1, H2 y H3, encontrando un menor peso final en los tratamientos a los que se les incluyó el jugo de *guishe* (fig. 24). Por otra parte, se encontraron diferencias en la ganancia de peso de los tratamientos ($p = 0.00022$) también se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos J1 y J2 además de diferencias entre estos y aquellos a los que se les agregó el hidrolizado enzimático. En el caso del rango específico del crecimiento (SGR) se obtuvo un valor de $P = 0.02405$ con un valor de significancia de 0.05 en donde se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a los que se incluyó el hidrolizado enzimático (H1, H2, H3) respecto al control, por otra parte, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con jugo de *guishe* y el control, pero si con los del hidrolizado. Las mismas diferencias fueron encontradas para el FI Por lo tanto, los camarones de los tratamientos H1, H2 y H3 consumieron una mayor cantidad de alimento (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros zootécnicos medianas de los tratamientos. REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de *guishe*, J2 = 32 mg/L jugo de *guishe*.

Tratamiento	Peso final (g)	WG (%)	SGR (%)	FI (g)	FCR	supervivencia (%)
REF	2.94	193.70	4.69	0.61	0.25	100.00
H1	2.88	187.90	4.64	0.62	0.26	100.00
H2	2.77	176.60	4.50	0.62	0.28	100.00
H3	2.82	182.00	4.57	0.62	0.27	90.00
J1	2.57	156.89	4.33	0.61	0.30	90.00
J2	2.30	130.00	4.02	0.61	0.34	100.00
J3	1.88	88.00	3.48	0.60	0.44	30.00
<i>Kruskal-W</i>	1.03e-3	0.00022	0.024	0.0045	0.024	0.014

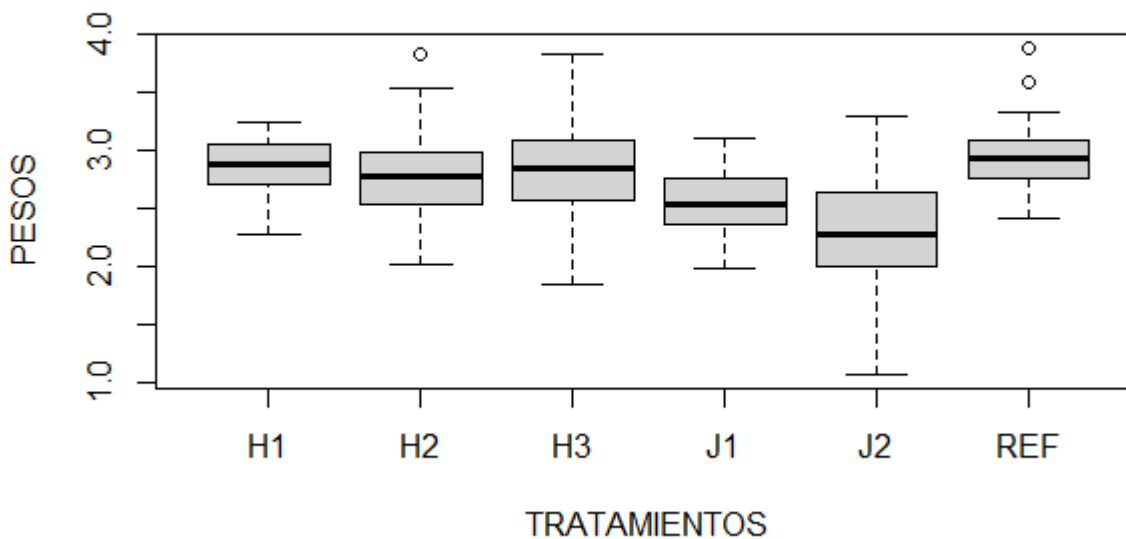


Figura 24. Biometría final de los camarones. Pesos (g), REF= control, H1= 18 mg/L H. Enzimático, H2= 36 mg/L H. Enzimático, H3= 72 mg/L H. Enzimático, J1= 18 mg/L jugo de guishe, J2 = 32 mg/L jugo de guishe.

7.3.5 Análisis microbiológico

Los recuentos totales de bacterias ácido láctico cultivables en muestras de agua fueron significativamente más altos en el hidrolizado con un valor medio de $2,42 \cdot 10^8$ CFU·ml⁻¹ en comparación con el jugo que tenía un total de $1,20 \cdot 10^3$ CFU·ml⁻¹ de bacterias de ácido láctico cultivables. Por otro lado, los recuentos presuntivos de *Vibrio* totales cultivables en muestras de agua fueron significativamente más altos en jugo con un valor medio de $3,21 \cdot 10^8$ CFU·ml⁻¹ en comparación con el hidrolizado que tenía un total de $2,27 \cdot 10^3$ CFU·ml⁻¹ de *Vibrio* cultivable en el final del experimento (fig. 25).

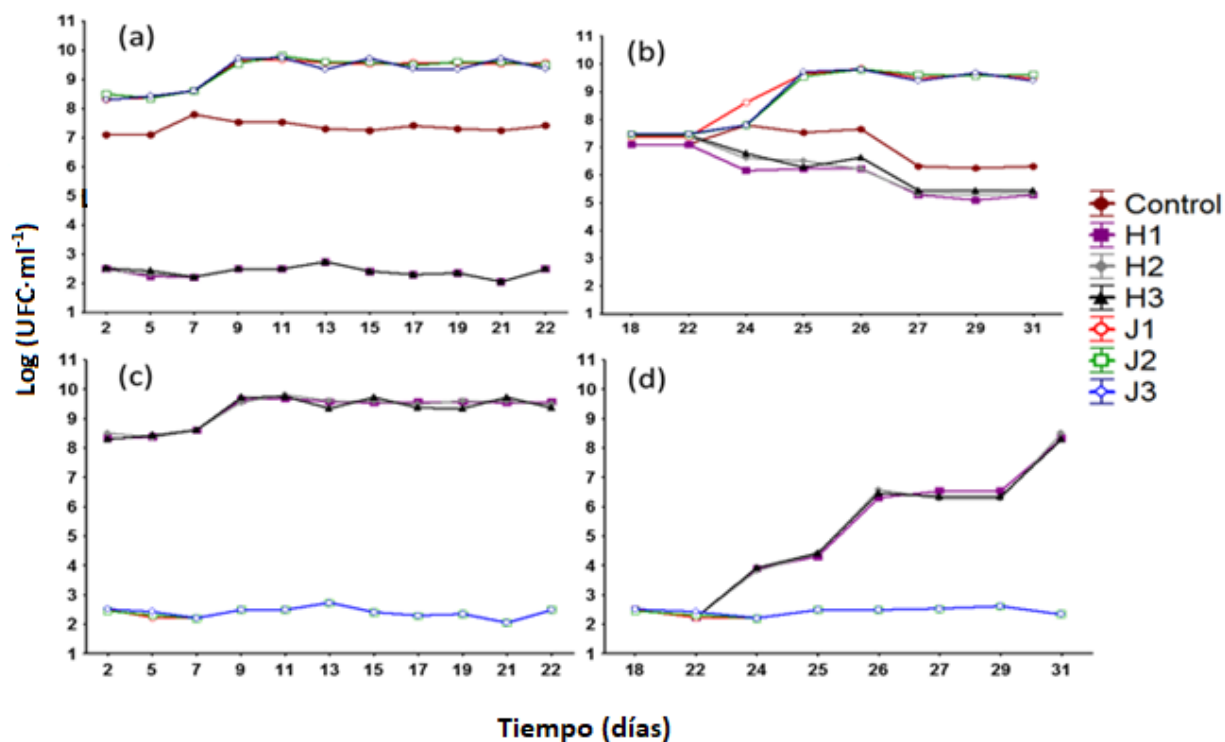


Figura 25. Crecimiento de *Vibrio* totales (a, b) y Bacterias Ácido-Lácticas (c, d) en unidades experimentales con hidrolizado enzimático y jugo de *guishe*.

7.4 Cuantificación de azúcares en los extractos.

Se determinó una concentración de azúcares reductores de 1.7 (± 0.07) mM en el jugo de *guishe*, mientras que en el hidrolizado enzimático fue de 3.7 (± 0.15) mM.

8. DISCUSIÓN

8.1 Transcriptómica.

Se encontraron 39 enzimas involucrada en la ruta de biosíntesis de saponinas. Sin embargo, solo 28 fueron encontradas en el reporte de anotación del transcriptoma *de novo*, esto puede ser debido a que hay enzimas que aún no se encuentran en secuencias “curadas”, por lo que es necesario realizar una base complementaria en donde se realizan BLAST con secuencias de *Arabidopsis thaliana*. Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre las regiones productivas de *A.lechuguilla* lo que concuerda con lo antes reportado en donde la variabilidad geográfica así como las condiciones climáticas y suelo impactan significativamente el contenido en saponinas, a su vez en un estudio se compararon tres regiones distintas al presente estudio en donde se menciona que la región más rica en saponinas fue Ejido Tortugas ubicado en Ramos Arizpe Coahuila (Juarez *et al.*, 2014), que está en la misma zona que Ejido Cosme, región en la que se determinó la mayor abundancia en saponinas mediante análisis de expresión diferencial. La concentración de saponinas está ampliamente relacionada con el estrés biótico y abiótico, ya que se ha descrito que estas son producidas en mayor cantidad como respuesta a situaciones de estrés, en especial al encontrarse bajo estrés hídrico (García-Parra *et al.*, 2018). Las diferencias en la precipitación pluvial en las regiones podrían explicar la diferencia en las abundancias obtenidas entre las regiones en el caso de Matehuala ubicado en San Luis Potosí la precipitación pluvial anual va de los 300 – 500 mm con temperatura máxima de 30°C (CONAGUA), mientras que en Ramos Arizpe la temperatura máxima es 35.8 °C con precipitación pluvial media de 100 mm siendo condiciones climáticas más extremas en Ramos (CONAGUA). Los resultados obtenidos mediante transcritómica facilitaron la manera de conocer la región con mayor abundancia en saponinas ya que no fue necesario emplear métodos de química analítica con muestras de cada una de las regiones, acortando el tiempo y bajando los costos de la investigación. Esto representa una estrategia prometedora y confiable según lo antes reportado (Morreeuw *et al.*, 2021).

Por otra parte, la biosíntesis de diosgenina aún no está claramente descrita, es por ello que se ha propuesto una vía a partir de la ruta de síntesis de fitosteroles la cual comienza por 29-

norlanosterol como sustrato, en donde el (3 β -25R)-furost-5-en-1-3,22,26 triol es catalizado por una glicosiltransferasa (UGT) a 26- β -D-glucopiranosil (3 β -25R)-furost-5-en-1-3,22 diol para posteriormente ser catalizado por la enzima Furostanol glucósido 26-O- β -glucosidasa (F26G) a diosgenina (Martinez, 2020). Sin embargo, no existe evidencia que soporte dicha ruta en bases de datos como KEGG, es por eso que se decidió elegir la ruta de biosíntesis a partir de la vía del colesterol descrita en la fig. 27. Dicha ruta fue obtenida mediante RNA-seq en muestras de fenogreco, inducida mediante precursores esteroidales y metil jasmonato (Ciura *et al.*, 2017). A su vez la ruta fue soportada a través de un trabajo con RNA-seq y qRT-PCR. Sin embargo, se decidió no añadir cada reacción colocando un gap en la ruta debido a que las enzimas propuestas no fueron encontradas en el transcriptoma del *A. lechuguilla* y algunas de las reacciones ocurren de manera espontánea (Mohammadi *et al.*, 2019).

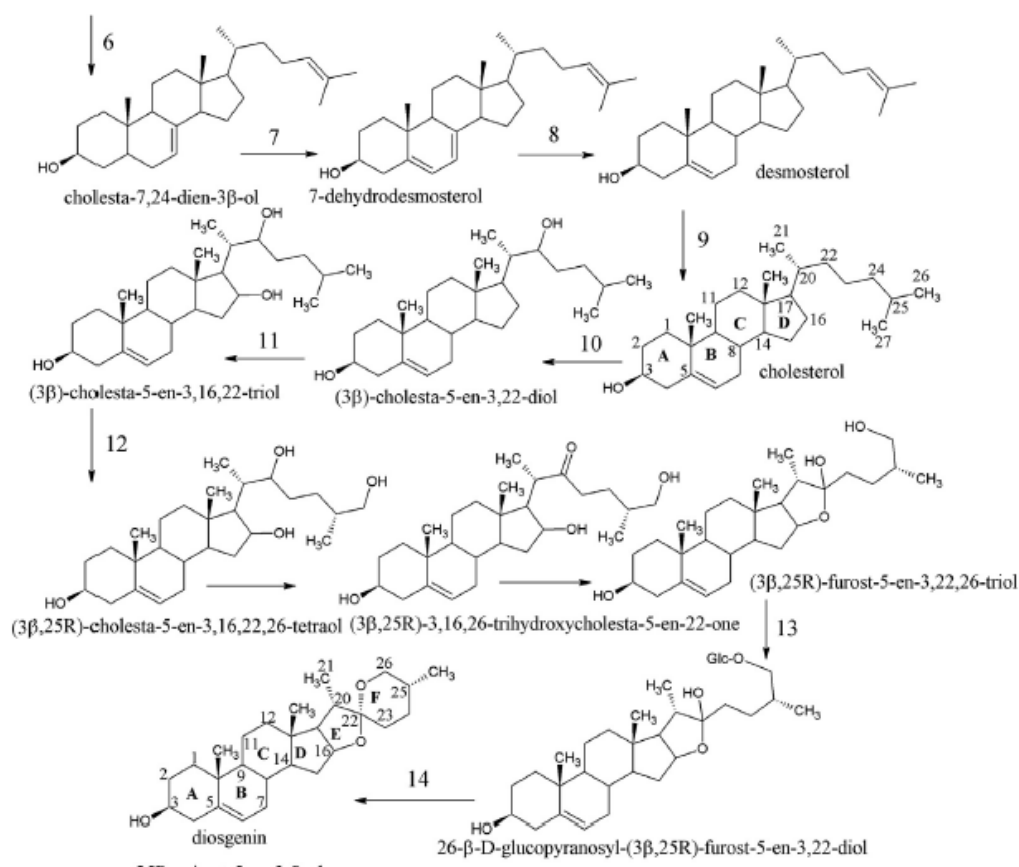


Figura 26. Ruta de biosíntesis de diosgenina propuesta por Ciura *et al.* recuperado de (Ciura *et al.*, 2017)

8.2 Cuantificación de saponinas.

Se lograron cuantificar 4 saponinas de los 6 estándares mediante HPLC-UV en el jugo de *guishe* con un total de 513.512 ppm, las cuales fueron protodioscina, gensenosido, gracillina, y trillina mismas que en base a los análisis *in silico* se esperaba estuvieran presentes, exceptuando el ginsenosido el cual forma parte de los triterpenos debido a que las enzimas involucradas en esta parte de la ruta no fueron encontradas en el reporte de anotación, no se descarta la presencia de saponinas triterpénicas en el extracto sin embargo era de esperarse un mayor contenido de saponinas esteroidales ya que las saponinas en el *Agave lechuguilla* son en su mayoría de carácter esteroideal (Carmona *et al.*, 2017). Por otro lado, en el hidrolizado enzimático se lograron cuantificar un total de 226.634 ppm repartidos entre protodioscina, gracillina, trillina y diosgenina. La diferencia en la concentración de diosgenina en el hidrolizado concuerda con lo antes reportado en donde al someter las muestras de la planta *D. zingiberensis* se logró aumentar la cuantificación de saponinas de tipo espirostánicas en un 212% (Peng *et al.*, 2010). En el caso del hidrolizado enzimático de *guishe* que es tratado con un mix de xilanas y celulasa (Ultraflo) se logró cuantificar 40.49 ppm de diosgenina (saponina espirostánica) mientras que en el jugo de *guishe* no se obtuvieron señales. La cuantificación total en los dos extractos de *guishe* no corresponden a lo reportado en el esquema de biorrefinería propuesto para el bagazo de *A. lechuguilla*, en donde mencionan que por cada hectárea de *A. lechuguilla* cosechada se pueden obtener 269 kg de saponinas (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019), siendo la cuantificación obtenida significativamente menor, lo que podría ser explicado por la metodología usada bajo HPLC-UV debido a que se ha observado que las saponinas son moléculas de baja absorbancia (Valle, 2016, Benavides *et al.*, 2012), por lo que se recomienda utilizar HPLC-MS para la cuantificación ya que en trabajos anteriores lograron cuantificar 8 saponinas; Diosgenina, esmilagenina, hecogenina, manogenina, tigogenina, hexosa, yucagenina, clorogenina (Peña-Rodríguez *et al.*, 2020). También se menciona que comúnmente es posible encontrar hecogenina y tigogenina en agaves (Benavides *et al.*, 2012). Sin embargo, no se contaba con dichos estándares.

Por otra parte, los resultados concuerdan con lo reportado por Martínez en donde no fue posible obtener señales en los cromatogramas al someter las muestras a hidrólisis ácida

(Martinez, 2020), ya que de tal forma se estarían cuantificando saponinas, a su vez la concentración de trillina obtenido en el presente trabajo corresponde a lo reportado previamente para el *A. lechuguilla* de 44.36 ppm (Martinez, 2020, Navarro del Hierro *et al.*, 2020). A su vez la diferencia en saponinas en cada uno de los extractos (H y J) puede estar explicado debido a que el tratamiento mediante hidrólisis enzimática está formulado para la obtención de extractos ricos en flavonoides (Pelletier-Morreuw *et al.*, 2021).

8.3 Parámetros zootécnicos.

No se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso, peso final y rango específico de crecimiento respecto al control en los tratamientos con hidrolizado enzimático, en cuanto a la tasa de conversión alimentaria, que se define como la cantidad de alimento necesario para que el camarón aumente un gramo en peso (García Lujan, 2018), tampoco se encontraron diferencias entre los tratamientos con hidrolizado enzimático respecto al control, por lo que se puede inferir que los camarones de los tratamientos H necesitaron menos alimento para crecer que los camarones con jugo de *guishe* hablándose de un mejor aprovechamiento del alimento. En cuanto a la supervivencia no se encontró que el *guishe* tuviera un impacto negativo en los camarones, únicamente en el tratamiento J3 debido a que durante su aplicación se generó un ambiente de anoxia por la forma en la que se aplicó el extracto, por lo que este tratamiento se descartó del análisis estadístico. Los resultados concuerdan con un estudio en donde se incluyó un extracto de *Y. schidigera* y *Quercus robur* en el que se reporta una disminución en el peso de los camarones en los tratamientos con mayor concentración de extracto (Novriadi *et al.*, 2022).

8.4 Calidad de agua.

En las últimas décadas se han buscado alternativas naturales para la reducción de productos nitrogenados en los cultivos de animales acuáticos con el fin de reducir la mortalidad y con ello evitar pérdidas económicas, además de disminuir la cantidad de agua utilizada durante el cultivo. Principalmente se han probado extractos de *Y. schidigera* debido a su alto contenido en saponinas esteroideas, obteniendo una disminución de un 58% en la concentración de TAN en bioensayos con postlarvas de *P. vannamei*. Sin embargo, en dicho trabajo solo monitorearon el

efecto por 24 h (*Santacruz-Reyes y Chien, 2012*). Por otra parte, se añadió un extracto líquido de *Y.schidigera* en un cultivo de juveniles de lobina (*dicentrarchus labrax*), durante 45 días, y se observó una disminución significativa de la concentración de NH_4^+ en el agua del cultivo (*Fayed et al., 2019*). También se probó una combinación de extractos de *Y.schidigera* y *Q. robur L.* (roble) en cultivos de camarón blanco de tipo intensivo, reportando una disminución significativa de la concentración de NH_4^+ en el agua de los tratamientos en los que se incluyó el extracto, sobre todo en el tratamiento con la mayor concentración, además de reportar que es un producto no tóxico para la especie (*Novriadi et al., 2022*). En el presente trabajo se encontró que al añadir dos extractos del *guishe* de *A. lechuguilla* en distintas concentraciones a un cultivo de camarón blanco fue posible disminuir la concentración de NH_4^+ alrededor de un 28% y 39% respecto al control durante todo el cultivo en aquellos estanques en los que se incluyeron los tratamientos H3 y J2 respectivamente. También fue posible establecer un sistema de bajo de recambio de agua de únicamente 20% semanal en donde se mantuvo la concentración de amonio por debajo de 2 ppm, tal como lo recomienda INAPESCA para cultivos de *P.vannameii* en México (*INAPESCA, 2018*). Con relación al consumo de agua en México se encuentra estipulado que para cultivos de tipo intensivo se requieren tasas de recambio mayores a un 20% diario. Sin embargo, comúnmente éstas rondan el 50% (*INAPESCA, 2018, Peña-Rodríguez et al., 2020*). Por ejemplo, si se tuviera el mismo cultivo realizado en el estudio con una tasa de recambio del 40% diario el desperdicio de agua en recambios sería de 13,622 L, comparado con el sistema aplicado en el bioensayo en donde fue posible utilizar solo 946 L durante todo el cultivo para recambios de agua, por lo tanto, al incluir los extractos del *guishe* se lograron ahorrar 12,676 L de agua sin comprometer la calidad de la misma.

En cuanto al pH en el agua de los cultivos no se encontró que el *guishe* tuviera algún efecto, lo que concuerda con lo publicado con *Novriadi et al* y *Dimitrou et al.* Cabe destacar que en el último artículo se menciona una ligera disminución del pH en las primeras 36 h posteriores a la adición del extracto de *Yucca* pero con el paso del tiempo los niveles se estabilizaron (*Dimitriou et al., 2013, Novriadi et al., 2022*). En el caso de los tratamientos con *guishe* el pH se elevó ligeramente en las primeras 24 h, sin embargo, el cambio no fue significativo.

8.4.1 Análisis microbiológicos.

Se esperaba que al añadir los extractos del *guishe* al agua se diera un efecto bactericida y que la carga bacteriana de *Vibrios* disminuyera, esto debido a su alto contenido en saponinas, que tienen actividad antimicrobiana. La literatura sugiere que las saponinas esteroidales tienen la capacidad de formar complejos celulolíticos en las paredes celulares de algunas bacterias lo que lleva al rompimiento de la membrana y así al compromiso del desarrollo de algunos géneros bacterianos (Yang *et al.*, 2015, Paray *et al.*, 2021). Sin embargo, solamente se encontró una disminución significativa en la población de *Vibrios* totales en aquellos tratamientos con hidrolizado enzimático, registrando un valor promedio de $2,27 \cdot 10^3$ UFC·ml⁻¹, mientras que el contenido en el jugo de *guishe* fue de $3,21 \cdot 10^8$ UFC·ml⁻¹). En un estudio *in vitro* con un extracto de la planta *Anredera cordifolia* se reportó una inhibición de *Vibrio cholerae* de un 30% a 100%, dependiendo de la concentración del extracto, este efecto se atribuye a que sus hojas tienen un alto contenido en biocompuestos como flavonoides, alcaloides, saponinas y polifenoles (Sari *et al.*, 2020), mismos que están presentes en la lechuguilla. Así mismo se comprobó la capacidad antimicrobiana del Lili acuático (*Nymphaea lotus*) contra algunos patógenos Gram negativos de peces, en donde se reportó una mayor inhibición en las bacterias *V.anguillarum* y *E.coli*, también se realizó el perfil fitoquímico en donde encontraron una alta concentración de alcaloides, carbohidratos y saponinas, además de la presencia moderada de terpenos, catequinas, taninos y fenoles (Adelakun *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha reportado un efecto inmunoestimulante en camarón blanco y en cangrejos al ser inmersos por 72 h en agua de mar con solución de saponinas en contra de patógenos como *V. alginolyticus* (Ng'ambi *et al.*, 2017, Su y Chen, 2008).

Al mismo tiempo, en este trabajo, se analizó la existencia de bacterias ácido lácticas, y se encontró una mayor cantidad en los tratamientos con hidrolizado enzimático, con un valor promedio de $2,42 \cdot 10^8$ CFU·ml⁻¹ en comparación a $1,20 \cdot 10^3$ CFU·ml⁻¹ de los tratamientos de jugo de *guishe*, esto puede ser debido a la diferencia en la concentración de azúcares, ya que en el jugo de *guishe* se encontró un total de azúcares reductores 1.7 (±0.07) mM mientras que la cuantificación en el hidrolizado fue de 3.7 (±0.15) mM. Normalmente, los *Lactobacillus* se

encuentran en medios con alta cantidad de carbohidratos (Naiel *et al.*, 2021). Por tal motivo, algunos prebióticos utilizados en la acuicultura, en especial de camarón, son la inulina, fructooligosacaridos (FOS), fructooligosacaridos de cadena corta (scFOS), manano oligosacáridos (MOS), galactooligosacaridos (GOS), xyloolisacaridos (XOS), arabaninoxyloligosacaridos (AXOS) e isomaltooligosacaridos (IMO) que son derivados en su mayoría de plantas y fibras, además de ser fácilmente metabolizados por bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Butt *et al.*, 2021). Como resultado del proceso de hidrólisis enzimática se esperaría que algunos de los compuestos antes mencionados se encuentren presentes en los tratamientos debido a que la mezcla enzimática, utilizada para la obtención del extracto, contiene beta-glucanasas y arabinoxilinasas. Así mismo, es posible relacionarla inhibición del crecimiento de *Vibrios* totales (fig. 26) con la presencia de bacterias ácido lácticas, ya que se ha reportado una disminución de *V. parahaemolyticus* al incluir cepas de *Lactobacillus plantarum*. De la misma manera, se reportó un efecto antimicrobiano en contra de *V. cholerae*, *V. harveyi* con cepas de *L. acidophilus*. Por otro lado la inclusión de probióticos y prebióticos podría ser una alternativa para prevenir la Vibriosis en cultivos de camarón (Naiel *et al.*, 2021, Abdel-Latif *et al.*, 2022). Por otra parte, se reportó que al añadir ciertas concentraciones del *guishe* tratado mediante hidrólisis enzimática a la dieta del camarón blanco hubo una mayor supervivencia en retos bacterianos contra *V. parahaemolyticus* así como cambios en el microbioma de los camarones proponiéndolo como una alternativa contra la Vibriosis (Quiroz-Guzmán *et al.*, 2023), lo que coincide con los resultados obtenidos al añadir los tratamientos H1, H2 y H3.

8.5 Selección del mejor extracto

Finalmente, se encontró que el mejor tratamiento es el H3 debido a que este no mostró efectos negativos en el crecimiento de los camarones, pero si un efecto positivo sobre la concentración de NH_4^+ en el agua, además de un efecto prebiótico en la comunidad microbiana durante el cultivo, así como la disminución del crecimiento de posibles patógenos como *Vibrio spp.* En cuanto a los tratamientos con jugo de *guishe* el efecto en el crecimiento puede ser debido a una que el jugo de *guishe* contiene más del doble de saponinas que el hidrolizado enzimático. La literatura sugiere que los camarones podrían ser sensibles a altas concentraciones de los

extractos (Novriadi *et al.*, 2022). Sin embargo el jugo de *guishe* podría ser utilizado para el tratamiento de efluentes provenientes de la acuicultura debido a que mostró una mayor capacidad para reducir el amonio en el agua, podría ser una alternativa al uso de *Y.schidigera* (Santacruz-Reyes y Chien, 2010, Santacruz-Reyes y Chien, 2012).

9. CONCLUSIONES

Los métodos de bioprospección por transcriptómica han mostrado ser confiables y con ventajas como los costos y el tiempo. En este trabajo se logró proponer la ruta de biosíntesis de saponinas, y a partir de ella obtener las abundancias (TPM), para determinar la variabilidad de las saponinas entre las regiones productivas de *A. lechuguilla*, debido a las condiciones climáticas en donde se encuentra la planta, teniendo una mayor concentración en aquellas con climas más extremos, y en donde el nivel de estrés es mayor. Con todo esto, se determinó que la mejor región para el estudio de las saponinas es el Ejido Cosme Coahuila. Esta región, se eligió sin la necesidad de utilizar un gran número de químicos para la cuantificación de los compuestos, lo que permitió llevar a cabo el estudio de forma sustentable.

Por otra parte, los extractos del *guishe* mostraron la capacidad de reducir la concentración de amonio en el agua de cultivo de camarón, específicamente, los tratamientos J2 y H3. Sin embargo, se encontró que el mejor tratamiento es el H3 debido a que ayuda a mantener la calidad de agua dentro de los parámetros aceptables, sin comprometer la supervivencia y talla de los camarones. Además, disminuye significativamente la carga bacteriana de *Vibrios* totales y aumenta el contenido de bacterias benéficas en el cultivo. Adicionalmente, la inclusión de altas concentraciones del *guishe* tratado mediante hidrólisis enzimática permite establecer sistemas de bajo recambio de agua, con lo que se podría llevar a cabo la acuicultura del camarón de forma sostenible. Por último, se propone el uso de jugo de *guishe* en concentración de 26 mg/l para tratar los efluentes resultantes de los cultivos. Finalmente, la posible inclusión de los extractos del *A.lechuguilla* a los cultivos de camarón lo convierte en una alternativa prometedora para la valorización de este residuo.

10. LITERATURA CITADA

- Abdel-Latif, H. M. R., Yilmaz, E., Dawood, M. A. O., Ringø, E., Ahmadifar, E. & Yilmaz, S. (2022). Shrimp vibriosis y possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, y synbiotics: A review. *Aquaculture*, 551, 737-951.
- Adelakun, K. M., Mustapha, M. K., Muazu, M. M., Omotayo, O. L. & Olaoye, O. (2016). Phytochemical screening y antibacterial activities of crude extract of *Nymphaea lotus* (water lily) against fish pathogens. *Journal of Biomedical Sciences*, 2, 38-42.
- Ahmed, N. & Thompson, S. (2019). The blue dimensions of aquaculture: a global synthesis. *Science of the Total Environment*, 652, 851-861.
- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D. & Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45, 438-469.
- Alcázar-Medina, F., Proal-Nájera, J., Gallardo-Velázquez, T., Cháirez-Hernández, I., Antileo-Hernández, C. & Alvarado-De La Peña, A. (2014). Aplicación de extractos de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en la remoción de cobre (II) en modelos de agua por aglomeración esférica. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13, 605-617.
- Alonso, S., Carmen Castro, M., Berdasco, M., De La Bya, I. G., Moreno-Ventas, X. & De Rojas, A. H. (2019). Isolation y Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. *Probiotics y Antimicrobial Proteins*, 11, 569-579.
- Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J., Huang, B. & Li, H. (2020). The exploitation of probiotics, prebiotics y synbiotics in aquaculture: present study, limitations y future directions. : a review. *Aquaculture International*, 28, 1017-1041.
- Benavides, O. L., Arango, O., Hurtado, A. M. & Rojas, M. C. (2012). Cuantificación de saponinas del jugo fresco y fermentado de fique (*Furcraea gigantea*) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-PDA). *Información tecnológica*, 23, 67-76.
- Butt, U. D., Lin, N., Akhter, N., Siddiqui, T., Li, S. & Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics y synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 114, 263-281.
- Caipang, C. y Aguana, M. (2011). Conventional PCR assays for the detection of pathogenic vibrio spp. In shrimp aquaculture in the Philippines. *AAFL Bioflux*, 4, 339-350.
- Carmona, J. E., Morales-Martínez, T. K., Mussatto, S. I., Castillo-Quiroz, D. & Ríos-González, L. J. (2017). Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Revista mexicana de ciencias forestales*, 8, 100-122.
- Carroza, C., Hurtado, F. & Gutierrez, X. (2012). Nitrogenated compounds biofiltration under alternative bacterium fixation substrates. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40, 772-785.
- Castillo-Quiroz, D., Berlanga Reyes, M. & M, C. P. (2005). Recolección, extracción y uso de la fibra de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en el estado de Coahuila. *INIFAP-CIRNE*.
- . Campo Experimental Saltillo.

- Castillo-Quiroz, D., Cano Pineda, A. & Berlanga Reyes, C. (2012). Establecimiento y aprovechamiento de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Comisión Nacional Forestal-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México*.
- Castillo Quiroz, D., Berlanga Reyes, C. A., Pyo Moreno, M. & Cano Pineda, A. (2020). Regeneración del cogollo de *Agave lechuguilla* torr. De cinco procedencias bajo cultivo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 33, 27-40.
- Cheeke, P. R. (2000). Actual y potential applications of *Yucca schidigera* y *Quillaja saponaria* saponins in human y animal nutrition. *Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants* (pp. 241-254). Springer, Dordrecht.
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K. & Sulaiman, R. (2014). Extraction y quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.
- Ciura, J., Szeliga, M., Grzesik, M. & Tyrka, M. (2017). Changes in fenugreek transcriptome induced by methyl jasmonate y steroid precursors revealed by RNA-Seq. LID - S0888-7543(17)30132-5 [pii] LID - 10.1016/j.ygeno.2017.10.006 [doi].
- CONAGUA. *Normales climatológicas por estado. Coahuila*. Disponible en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=coah>. [consulta: 19 septiembre 2021]
- CONAGUA. *Normales climatológica por estado. San Luis Potosí*. Disponible en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=slp> [consulta: 2 octubre 2022].
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) (2018a). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca*. 2018 ed. D Anuario estadístico de acuicultura y pesca. México.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca CONAPESCA (2018b). Cultivo de camarón, producción acuícola de calidad. Disponible en: <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/cultivo-de-camaron-produccion-acuicola-de-calidad?idiom=es> [consulta: 01 octubre 2020]
- Dawood, M. A. O. & Koshio, S. (2016). Recent advances in the role of probiotics y prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454, 243-251.
- Desai, S. D., Desai, D. G. & Kaur, H. (2009). Saponins y their biological activities. *Pharma Times*, 41, 13-16.
- Dhurba, G., Ezhil, K., Dawood, A. & Faisal, H. (2022). *High performance liquid chromatography (HPLC) : principle, types, instrumentation Y applications*. LaboratoryInfo. Disponible en: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>. [consulta: 10 noviembre 2022]
- Díaz-Jiménez, L., Carlos-Hernyez, S., Jasso De Rodríguez, D. & Rodríguez-García, R. (2019). Conceptualization of a biorefinery for guishe revalorization. *Industrial Crops y Products*, 138, 111-441.
- Dimitriou, E., Markogianni, V. & Yu, X. (2013). Effects of *Yucca shidigera* extract on the reduction of ammonia concentration in lake Koumoundourou. *Journal of Ecological Engineering*, 16, 3095. doi: 10.12911/22998993/59338
- Elesban, M., Rössel, D., Laurel, H., Quero-Carrillo, A. & Orozco, A. (2004). Análisis comparativo en la calidad de fibra de *Agave lechuguilla* torr., procesada manual y mecánicamente. *Agrociencia*, ISSN 1405-3195, Vol. 38, Nº. 2, 2004, pags. 219-225.
- Esquivel, G., Ruelas, L. & Villya, M. (2021). Uso y disposición del agua en la acuicultura. *Teoría y Praxis*, 1.

- Food and Agriculture Organization (FAO). (2009). *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Disponible en:
https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_whitelegshrimp.htm. [consultado: 27 octubre 2021]
- Food and Agriculture Organization (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. FAO Roma.
- Food and Agriculture Organization (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. La sostenibilidad en acción. FAO Roma.
- Food and Agriculture Organization (2022). The state of world fisheries y aquaculture. Towards blue transformation. FAO. Rome.
- Fayed, W. M. A., Khalil, R. H., Sallam, G. R., Mansour, A. T., Elkhayat, B. K. & Omar, E. A. (2019). Estimating the effective level of *Yucca schidigera* extract for improvement of the survival, haematological parameters, immunological responses y Water quality of European seabass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports*, 15, 100208.
- Fleck, J. D., Betti, A. H., Da Silva, F. P., Troian, E. A., Olivaro, C., Ferreira, F. & Verza, S. G. (2019). Saponins from *Quillaja saponaria* y *Quillaja brasiliensis*: Particular Chemical Characteristics y Biological Activities. *Molecules*, 24.
- Francis, G., Kerem Z Fau - Makkar, H. P. S., Makkar Hp Fau - Becker, K. & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr*. doi: 10.1079/BJN2002725.
- García-Parra, M. Á., Plazas-Leguizamón, N. Z., Carvajal Rodríguez, D. C., Ferreira Torrado, S. C. & Parra, J. D. (2018). Descripción de las saponinas en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en relación con el suelo y el clima: Una revisión. *Informador Técnico*, 82, 241-249.
- García-Lujan, J. (2018). *Aprovechamiento del bagazo de Agave lechuguilla Torrey como aditivo alimenticio para el crecimiento y fortalecimiento inmunológico de camarón blanco*. Tesis Maestría inédita. Tecnológico Nacional De México, Instituto tecnológico de Veracruz. México.
- Hernández S, R., Díaz J, L., Villanueva, S. & Lugo C, E. C. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey. *e-Gnosis*, 0.
- Hukom, V., Nielsen, R., Asmild, M. & Nielsen, M. 2020. Do Aquaculture Farmers Have an Incentive to Maintain Good Water Quality? The Case of Small-Scale Shrimp Farming in Indonesia. *Ecological Economics*, 176, 106717.
- Instituto Nacional de Pesca (2018). Acuicultura. Camaron blanco del pacífico. Acuicultura comercial. INAPESCA México.
- Jaramillo-Jaramillo, C., Jaramillo-Espinoza, A., D'armas, H., Troccoli, L. & De Astudillo, L. R. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64.
- Jiménez, G. G., Durán, A. G., Macías, F. A. & Simonet, A. M. (2021). Structure, bioactivity y analytical methods for the determination of *Yucca* saponins. *Molecules*, 26. doi: 10.3390/molecules26175251
- Juarez, D., Flores-López, M., Sánchez-Robles, J., Suárez, P., Charles, A. & Diaz, L. (2014). Variability of saponins concentration in guishe collected in different geographical areas y weather conditions. *Journal of Chemistry y Biochemistry*, 2.

- Kaktcham, P. M., Temgoua, J.-B., Zambou, F. N., Diaz-Ruiz, G., Wacher, C. & Pérez-Chabela, M. D. L. (2018). In vitro evaluation of the probiotic y safety properties of bacteriocinogenic y non-bacteriocinogenic lactic acid bacteria from the intestines of nile tilapia y common carp for their use as probiotics in aquaculture. *Probiotics y Antimicrobial Proteins*, 10, 98-109.
- Lawson, E. (2011). Physico-chemical parameters y heavy metal contents of water from the mangrove swamps of Lagos lagoon, Lagos, Nigeria. *Advances in Biological Research*. 5(1): 08-21 ISSN 1992-0067.
- Lee, E. J., Yoo Ks Fau - Patil, B. S. & Patil, B. S. (2010). Development of a rapid HPLC-UV method for simultaneous quantification of protodioscin y rutin in white y green asparagus spears. *J Food Sci*. 2010 Nov-Dec;75(9):C703-9. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01824.
- Liu, X.-X., Wang, L., Chen, X.-Q., Deng, X.-T., Cao, Y. & Wang, Q. (2008). Simultaneous quantification of both triterpenoid y steroidal saponins in various Yunnan Baiyao preparations using HPLC-UV y HPLC-MS. *Journal of Separation Science*, 31, 3834-3846.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. & Sharma, P. (2010). High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2, 22-26.
- Martinez-Alvarez, R. (2020). Descripción de la ruta metabólica e identificación de las saponinas del *guishe* de *Agave lechuguilla* por análisis transcripcional *in silico*. *Tesis licenciatura inédita*. Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Coahuila.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Moghimipour, E. & Hyali, S. (2015). Saponin: Properties, Methods of Evaluation y Applications. *Annual Research & Review in Biology*, 5, 207-220.
- Mohammadi, M., Mashayekh, T., Rashidi-Monfared, S. A.-O., Ebrahimi, A. & Abedini, D. (2019). New insights into diosgenin biosynthesis pathway y its regulation in *Trigonella foenum-graecum* L. *Phytochem Anal*. 2020 Mar;31(2):229-241 doi: 10.1002/pca.2887
- Morales, T., Medina-Morales, M. A., Ortiz, A., Rodriguez-De La Garza, J. A., Moreno, M., Lopez-Badillo, C. & Ríos-González, L. (2019). Consolidated bioprocessing of hydrogen production from agave biomass by *Clostridium acetobutylicum* y bovine ruminal fluid. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45.
- Morreeuw, Z. P., Escobedo-Fregoso, C., Ríos-González, L. J., Castillo-Quiroz, D. & Reyes, A. G. (2021). Transcriptome-based metabolic profiling of flavonoids in *Agave lechuguilla* waste biomass. *Plant Science*, 305, 110748.
- Naiel, M. A. E., Farag, M. R., Gewida, A. G. A., Elnakeeb, M. A., Amer, M. S. & Alagawany, M. (2021). Using lactic acid bacteria as an immunostimulants in cultured shrimp with special reference to *Lactobacillus* spp. *Aquaculture International*, 29, 219-231.
- Navarro Del Hierro, J., Piazzini, V., Reglero, G., Martin, D. & Bergonzi, M. C. (2020). In vitro permeability of saponins y sapogenins from seed extracts by the parallel artificial membrane permeability assay: effect of in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural y Food Chemistry*, 68, 1297-1305.
- Ng'ambi, J. W., Li, R., Mu, C., Song, W., Liu, L. & Wang, C. (2016). Dietary administration of saponin stimulates growth of the swimming crab *Portunus trituberculatus* y enhances its resistance against *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol*. 2016 Dec;59:305-311. doi: 10.1016/j.fsi.2016.10.041.

- Ng'ambi, J. W., Li, R., Mu, C., Song, W. & Wang, C. (2017). The immunostimulatory effect of saponin immersion against *Vibrio alginolyticus* in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture International*, 25, 1667-1678.
- Nobel, P. y Quero, E. (1986). Environmental Productivity Indices for a Chihuahuan Desert Cam Plant, Agave Lechuguilla. *Ecology*, 67.
- Novriadi, R., Albasri, H., Wahyudi, A. E., Fadhilah, R., Ali, A. & Trullàs, C. (2022). Effects of the addition of oak (*Quercus robur* L.) y yucca (*Yucca schidigera*) on the water quality y growth performance of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured intensively in concrete tanks. *Journal of the World Aquaculture Society*, n/a. doi: 10.1111/jwas.12871
- Paray, B. A., El-Basuini, M. F., Alagawany, M., Albeshr, M. F., Farah, M. A. & Dawood, M. A. O. (2021). *Yucca schidigera* usage for healthy aquatic animals: potential roles for sustainability. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11, 93.
- Pelletier-Morreeuw, Z., Ríos-González, L., Salinas-Salazar, C., Melchor-Martínez, E., Ascacio-Valdés, J., Parra, R., Iqbal, H. & Reyes, A. (2021). Early optimization stages of *Agave lechuguilla* bagasse processing toward biorefinement: drying procedure y enzymatic hydrolysis for flavonoid extraction. *Molecules*, 26, 7292.
- Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, K., Morikawa, R. & Takahashi, J. (2006). Effects of *Yucca schidigera* y *Quillaja saponaria* extracts on in vitro ruminal fermentation y methane emission. *Animal Feed Science y Technology*, 129, 175-186.
- Peña-Rodríguez, A., Pelletier-Morreeuw, Z., García-Luján, J., Rodríguez-Jaramillo, M. D. C., Guzmán-Villanueva, L., Escobedo-Fregoso, C., Tovar-Ramírez, D. & Reyes, A. G. (2020). Evaluation of *Agave lechuguilla* by-product crude extract as a feed additive for juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 51, 1336-1345.
- Peng, Y. E., Wang, Y., Yang, Z., Bao, J., Peng, H. & Hong, Y. (2010). Content Increase of Spirostanol Saponins during Enzymatic Hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 8279-8281.
- Quiroz-Guzmán, E., Morreeuw, Z. P., Peña-Rodríguez, A., Barajas-Syoval, D. R., Magallón-Servín, P., Mejía, A. & Reyes, A. G. (2023). Flavonoid-enriched extract of *Agave lechuguilla* bagasse as a feed supplement to prevent vibriosis in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 562, 738867.
- Rai, A., Saito, K. y Yamazaki, M. (2017). Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants. *Plant J.* 2017 May;90(4):764-787. doi: 10.1111/tpj.13485.
- Rai, A., Yamazaki, M., Takahashi, H., Nakamura, M., Kojoma, M., Suzuki, H. & Saito, K. (2016). RNA-seq transcriptome analysis of *Panax japonicus*, y its comparison with other *Panax* species to identify potential genes involved in the saponins biosynthesis. *Frontiers in plant science*, 7, 481.
- Rajeev, R., Adithya, K. K., Kiran, G. S. & Selvin, J. (2021). Healthy microbiome: a key to successful y sustainable shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13, 238-258.
- Reyes, J., Aguirre, J., y Peña, B. (2000). Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. *Botanical Sciences*, (67), 75-88.
- Reyna-Martínez, R., Martínez, T., Quiroz, D., Contreras, J. & Ríos-González, L. (2019). Pretratamiento fúngico de biomasa de *Agave lechuguilla* Torr. para la producción de etanol. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10, 86-106.

- Santacruz-Reyes, R. A. y Chien, Y.-H. (2010). *Yucca schidigera* extract – A bioresource for the reduction of ammonia from mariculture. *Bioresource Technology*, 101, 5652-5657.
- Santacruz-Reyes, R. A. Y Chien, Y.-H. (2012). The potential of *Yucca schidigera* extract to reduce the ammonia pollution from shrimp farming. *Bioresource Technology*, 113, 311-314.
- Sari, M. K., Tumangger, B. S., Sorbakti, B. J., Helmalia, F. & Fadhliani (2020). Effectiveness of the binahong leaf extract *Anredera cordifolia* in devoting bacterial growth *Vibrio cholerae* in vitro. *IOP Conference Series: Materials Science y Engineering*, 725, 012073.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-008-SEMARNAT-1996. SEMARNAT. México.
- Su, B.-K. & Chen, J.-C. (2008). Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* y its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 24, 74-81.
- Suarez, D. & Morales, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Semilleros: Formación Investigativa. 4(1), 7-14. 2619-5267
- Toledo, A., Castillo, N. M., Carrillo, O. & Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, 30, 57-71.
- Valle-Alcazar, E. (2016). *Caracterización de saponinas de Agave durangensis y salmiana, y su efecto en la pared y membrana celular de Kluyveromyces marxianus y Saccharomyces cerevisiae. Tesis doctoral inédita.* Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Ciencias Agropecuarias y Biotecnología, Jalisco.
- Vela, M. y Gutiérrez-Aguilar, R. (2017). Ciencias “ómicas”, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud? *Revista Digital Universitaria UNAM*, 18(7).
- Vincken, J. P., Heng L Fau - De Groot, A., De Groot A Fau - Gruppen, H. & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification y occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3), 275-297.
- Wang, J., Huang, Y., Xu, K., Zhang, X., Sun, H., Fan, L. & Yan, M. (2019). White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition y function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 84, 130-137.
- Yang, Q.-H., Tan, B.-P., Dong, X.-H., Chi, S.-Y. & Liu, H.-Y. (2015). Effects of different levels of *Yucca schidigera* extract on the growth y nonspecific immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) y on culture water quality. *Aquaculture*, 439, 39-44.
- Yi, Y.S. (2021). New mechanisms of ginseng saponin-mediated anti-inflammatory action via targeting canonical inflammasome signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114292. doi: 10.1016/j.jep.2021.114292

11. ANEXOS

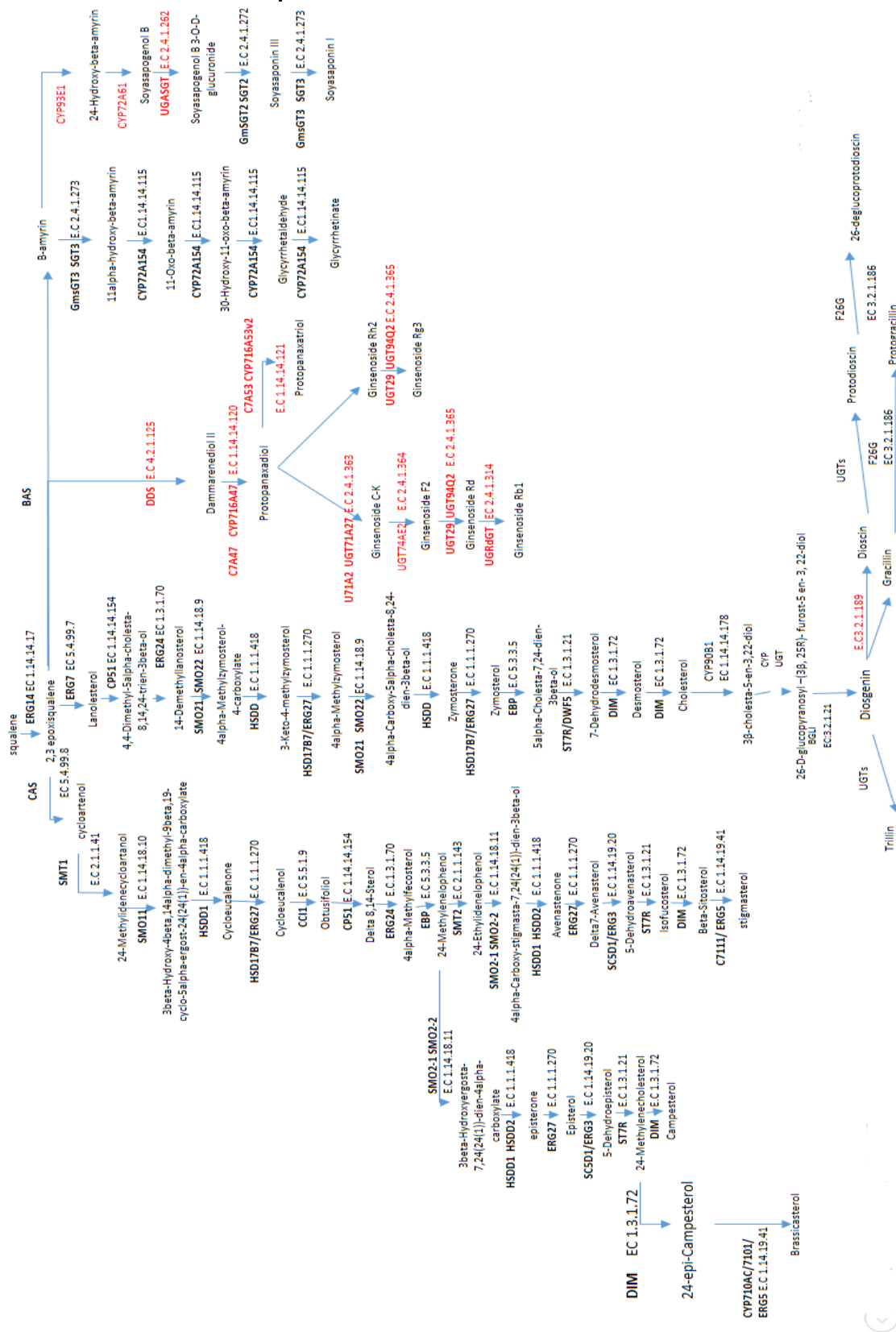
Anexo A. Enzimas empleadas para el análisis de expresión diferencial

Enzima		ID Trinity	ID UNIPROT	Clas enzimática	Cos	Mat	Tuxt																																																																																																																																																																																																																																																							
Squalene epoxidase 1	ERG14	TRINITY_DN153893_c	ERG14_A	EC:1.14.14.17	4.579	0.101	0.054																																																																																																																																																																																																																																																							
		1_g2_i2	RATH					Lanosterol synthase	ERG7	TRINITY_DN155080_c	ERG7_YE	EC:5.4.99.7	1.625	0.299	0.000	2_g3_i3	AST	Squalene synthase	FDFT	TRINITY_DN150893_c	FDFT_NIC	EC:2.5.1.21	53.285	5.470	16.831	0_g1_i6	BE	TRINITY_DN193126_c	FDFT_PO	0.210	0.091	0.436			TRINITY_DN138158_c	FDFT_CA		11.609	0.821	0.022			0_g1_i1	NAB							0_g1_i1	NAX					Lanosterol 14-alpha demethylase	CP51	TRINITY_DN218326_c	CP51_YEA	EC:1.14.14.154	0.031	0.000	0.000	0_g1_i1	ST			TRINITY_DN145308_c	CP51_CA		43.843	2.513	0.135			0_g1_i1	NTR					Delta(14)-sterol reductase	ERG24	TRINITY_DN145551_c	ERG24_A	EC:1.3.1.70	3.370	0.225	0.630	0_g1_i4	RATH			TRINITY_DN116936_c			1.973	0.255	0.985			0_g1_i1						Delta(24)-sterol reductase	DIM	TRINITY_DN306546_c	DIM_PEA	EC:1.3.1.72	4.136	14.455	3.052	0_g1_i1		TRINITY_DN111838_c	DIM_ARA	3.603	0.363	0.808	0_g1_i1	TH						TRINITY_DN132616_c	DIM_ARA		2.793	0.114	0.692			0_g2_i2	TH							TRINITY_DN150061_c	DIM_PEA		1.932	0.235	1.001			0_g3_i1						Cycloartenol-C-24-methyltransferase 1	SMT1	TRINITY_DN149327_c	SMT1_OR	EC:2.1.1.41	2.909	0.540	0.417			0_g1_i11	YSJ					Cycloartenol synthase	CAS	TRINITY_DN154538_c	CAS1_GLY	EC:5.4.99.8	8.535	0.260	0.703			0_g3_i4	GL					Methylsterol monooxygenase 1-1	SMO11	TRINITY_DN134564_c	SMO11_A	EC:1.14.18.10	40.773	6.066	15.746	0_g1_i1	RATH			TRINITY_DN141327_c	SMO11_A		1.373	1.092	0.312			0_g1_i2	RATH					3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase	HSDD1	TRINITY_DN148124_c	HSDD1_A	EC:1.1.1.41	1.743	0.078	0.348			0_g1_i1	RATH	8				Cycloeucaenol cycloisomerase	CCI1	TRINITY_DN148771_c	CCI1_ARA	EC:5.5.1.9	4.886	1.285	2.146	2_g1_i12	TH			TRINITY_DN279310_c	CCI1_ARA		0.627	0.341	0.000		
Lanosterol synthase	ERG7	TRINITY_DN155080_c	ERG7_YE	EC:5.4.99.7	1.625	0.299	0.000																																																																																																																																																																																																																																																							
		2_g3_i3	AST					Squalene synthase	FDFT	TRINITY_DN150893_c	FDFT_NIC	EC:2.5.1.21	53.285	5.470	16.831	0_g1_i6	BE			TRINITY_DN193126_c	FDFT_PO					0.210	0.091	0.436			TRINITY_DN138158_c	FDFT_CA		11.609	0.821	0.022			0_g1_i1	NAB							0_g1_i1	NAX					Lanosterol 14-alpha demethylase	CP51	TRINITY_DN218326_c	CP51_YEA	EC:1.14.14.154	0.031	0.000	0.000	0_g1_i1	ST			TRINITY_DN145308_c	CP51_CA		43.843	2.513	0.135			0_g1_i1	NTR					Delta(14)-sterol reductase	ERG24	TRINITY_DN145551_c	ERG24_A	EC:1.3.1.70	3.370	0.225	0.630	0_g1_i4	RATH			TRINITY_DN116936_c			1.973	0.255	0.985			0_g1_i1						Delta(24)-sterol reductase	DIM	TRINITY_DN306546_c	DIM_PEA			EC:1.3.1.72	4.136					14.455	3.052	0_g1_i1		TRINITY_DN111838_c	DIM_ARA	3.603	0.363	0.808	0_g1_i1	TH						TRINITY_DN132616_c	DIM_ARA		2.793	0.114	0.692			0_g2_i2	TH							TRINITY_DN150061_c	DIM_PEA		1.932	0.235	1.001			0_g3_i1						Cycloartenol-C-24-methyltransferase 1	SMT1	TRINITY_DN149327_c	SMT1_OR	EC:2.1.1.41	2.909	0.540	0.417			0_g1_i11	YSJ					Cycloartenol synthase	CAS	TRINITY_DN154538_c	CAS1_GLY	EC:5.4.99.8	8.535	0.260	0.703			0_g3_i4	GL					Methylsterol monooxygenase 1-1	SMO11	TRINITY_DN134564_c	SMO11_A	EC:1.14.18.10	40.773	6.066	15.746	0_g1_i1	RATH			TRINITY_DN141327_c	SMO11_A		1.373	1.092	0.312			0_g1_i2	RATH					3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase	HSDD1	TRINITY_DN148124_c	HSDD1_A	EC:1.1.1.41	1.743	0.078	0.348			0_g1_i1	RATH	8				Cycloeucaenol cycloisomerase	CCI1	TRINITY_DN148771_c	CCI1_ARA	EC:5.5.1.9	4.886	1.285	2.146	2_g1_i12	TH			TRINITY_DN279310_c	CCI1_ARA		0.627	0.341	0.000
Squalene synthase	FDFT	TRINITY_DN150893_c	FDFT_NIC	EC:2.5.1.21	53.285	5.470	16.831																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i6	BE																																																																																																																																																																																																																																																											
		TRINITY_DN193126_c	FDFT_PO					0.210	0.091	0.436																																																																																																																																																																																																																																																				
		TRINITY_DN138158_c	FDFT_CA		11.609	0.821	0.022																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i1	NAB																																																																																																																																																																																																																																																											
		0_g1_i1	NAX																																																																																																																																																																																																																																																											
Lanosterol 14-alpha demethylase	CP51	TRINITY_DN218326_c	CP51_YEA	EC:1.14.14.154	0.031	0.000	0.000																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i1	ST																																																																																																																																																																																																																																																											
		TRINITY_DN145308_c	CP51_CA		43.843	2.513	0.135																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i1	NTR																																																																																																																																																																																																																																																											
Delta(14)-sterol reductase	ERG24	TRINITY_DN145551_c	ERG24_A	EC:1.3.1.70	3.370	0.225	0.630																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i4	RATH																																																																																																																																																																																																																																																											
		TRINITY_DN116936_c			1.973	0.255	0.985																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i1																																																																																																																																																																																																																																																												
Delta(24)-sterol reductase	DIM	TRINITY_DN306546_c	DIM_PEA	EC:1.3.1.72	4.136	14.455	3.052																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i1																																																																																																																																																																																																																																																												
		TRINITY_DN111838_c	DIM_ARA					3.603	0.363	0.808																																																																																																																																																																																																																																																				
		0_g1_i1	TH																																																																																																																																																																																																																																																											
		TRINITY_DN132616_c	DIM_ARA		2.793	0.114	0.692																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g2_i2	TH																																																																																																																																																																																																																																																											
		TRINITY_DN150061_c	DIM_PEA		1.932	0.235	1.001																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g3_i1																																																																																																																																																																																																																																																												
Cycloartenol-C-24-methyltransferase 1	SMT1	TRINITY_DN149327_c	SMT1_OR	EC:2.1.1.41	2.909	0.540	0.417																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i11	YSJ																																																																																																																																																																																																																																																											
Cycloartenol synthase	CAS	TRINITY_DN154538_c	CAS1_GLY	EC:5.4.99.8	8.535	0.260	0.703																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g3_i4	GL																																																																																																																																																																																																																																																											
Methylsterol monooxygenase 1-1	SMO11	TRINITY_DN134564_c	SMO11_A	EC:1.14.18.10	40.773	6.066	15.746																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i1	RATH																																																																																																																																																																																																																																																											
		TRINITY_DN141327_c	SMO11_A		1.373	1.092	0.312																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i2	RATH																																																																																																																																																																																																																																																											
3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase	HSDD1	TRINITY_DN148124_c	HSDD1_A	EC:1.1.1.41	1.743	0.078	0.348																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i1	RATH	8																																																																																																																																																																																																																																																										
Cycloeucaenol cycloisomerase	CCI1	TRINITY_DN148771_c	CCI1_ARA	EC:5.5.1.9	4.886	1.285	2.146																																																																																																																																																																																																																																																							
		2_g1_i12	TH																																																																																																																																																																																																																																																											
		TRINITY_DN279310_c	CCI1_ARA		0.627	0.341	0.000																																																																																																																																																																																																																																																							
		0_g1_i1	TH																																																																																																																																																																																																																																																											

3-keto-steroid reductase	ERG27	TRINITY_DN150595_c 0_g1_i1	ERG27_D EBHA	EC:1.1.1.27 0	1.035	0.074	0.000
Obtusifoliosol 14-alpha demethylase / Lanosterol 14-alpha demethylase	CYP51/ CP51	TRINITY_DN150098_c 0_g3_i2	CP51_SO RBI	EC:1.14.14. 154	12.184	3.322	8.760
		TRINITY_DN145308_c 0_g1_i1	CP51_CA NTR		43.843	34.758	7.817
Probable 3-beta-hydroxysteroid-d-Delta(8),Delta(7)-isomerase	EBP	TRINITY_DN133682_c 1_g1_i1	EBP_ORY SJ	EC:5.3.3.5	11.073	1.744	2.848
24-methylenesterol C-methyltransferase 2	SMT2	TRINITY_DN139644_c 3_g2_i2	SMT2_OR YSJ	EC:2.1.1.14 3	4.148	0.367	0.916
Methylsterol monooxygenase 2-2	SMO22	TRINITY_DN138502_c 0_g1_i1	SMO22_A RATH	EC:1.14.18. 9	30.888	2.361	8.614
3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase /decarboxylase isoform 2	HSDD2	TRINITY_DN147920_c 0_g1_i3	HSDD2_A RATH	EC:1.1.1.41 8	3.985	0.655	0.902
Delta(7)-sterol-C5(6)-desaturase 1	SC5D1	TRINITY_DN143804_c 2_g1_i4	SC5D1_A RATH	EC:1.14.19. 20	0.285	0.000	0.227
	ERG3	TRINITY_DN174305_c 0_g1_i1	ERG3_LEP MC		1.031	1.060	0.471
		TRINITY_DN146783_c 0_g2_i1	ERG3_CA NAX		23.914	17.706	4.359
7-dehydrocholesterol reductase	ST7R/D WF5	TRINITY_DN149901_c 1_g2_i2	ST7R_ARA TH	EC:1.3.1.21	5.539	1.230	3.301
Cytochrome P450 710A11	CYP710A 11	TRINITY_DN147946_c 2_g1_i1	C7111_SO LLC	EC:1.14.19. 41	19.097	9.630	4.225
	ERG5/CY P710A1	TRINITY_DN145832_c 0_g3_i2	ERG5_YE AST		25.606	1.107	0.000
		TRINITY_DN91852_c0 _g2_i1	C7101_AR ATH		0.090	0.000	0.000
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase	NSDHL	TRINITY_DN317051_c 0_g1_i1	NSDHL_H UMA	EC:1.1.1.17 0	0.000	0.000	0.000

steroid 22S-hydroxylase / Cytochrome P450 90B1	CYP90B1 /DWF4	TRINITY_DN126080_c 0_g2_i1	C90B1_A RATH	EC:1.14.14. 178	0.189	0.124	0.012
		TRINITY_DN140622_c 1_g1_i1			29.126	1.505	2.818
		TRINITY_DN144237_c 0_g1_i1			0.975	0.276	0.329
		TRINITY_DN127445_c 0_g2_i1			31.539	7.539	13.945
		TRINITY_DN150529_c 0_g1_i5			1.428	0.096	0.178
11-oxo-beta-amyirin 30-oxidase	CYP72A1 54	TRINITY_DN134850_c 3_g2_i1	C7254_GL YUR	EC:1.14.14. 115	4.368	0.220	0.295
	CYP72A6 3	TRINITY_DN157026_c 4_g1_i3	C7263_M EDTR		2.940	0.275	0.326
Beta-amyirin 11-oxidase	CYP88D 6	TRINITY_DN128821_c 3_g3_i1	BAMO_GL YUR	EC:1.14.14. 152	0.489	0.080	0.167
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein 2	SGT2	TRINITY_DN223083_c 0_g1_i1	SGT2_YEA ST		0.612	0.000	0.000
Soyasaponin III rhamnosyltransferase	SGT3	TRINITY_DN142680_c 1_g2_i1	SGT3_SOY BN	EC:2.4.1.27 3	0.756	0.119	0.177
		TRINITY_DN127779_c 0_g1_i3			0.397	0.184	0.000
Cytochrome P450 734A1	CYP734A 1 /BAS1	TRINITY_DN139014_c 0_g1_i1	C734A_A RATH	EC:1.14.-.-	58.865	16.428	102.083
		TRINITY_DN299538_c 0_g1_i1			1.903	0.076	0.326

Anexo B. Ruta biosintés de saponinas con nombres



Anexo D. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-UV para la cuantificación de saponinas en hidrolizado enzimático del *guishe*.

