



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS
DEGRADORAS DE AGAVINA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DIEGO VARGAS GASSIER



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Luz del Carmen Castellanos Román

VOCAL: Profesor: Oscar Hernández Meléndez

SECRETARIO: Profesora: Carmina Montiel Pacheco

1er. SUPLENTE: Profesor: Alfonso Rafael Salgado Aguayo

2do. SUPLENTE: Profesora: Ariadna González Solís

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 314, Facultad de Química. UNAM. Departamento de Alimentos y Biotecnología.

ASESOR DEL TEMA:

Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Diego Vargas Gassier.

AGRADECIMIENTO

**CONACyT POR EL FINANCIAMIENTO A TRAVÉS DEL
PROYECTO SEP-BASICA 2011/167507
Y AL FINANCIAMIENTO DE LA UNAM (DGAPA) A TRAVÉS DEL
PROYECTO PAPIIT IA-204415**

TAMBIÉN AGRADEZCO A:

PROYECTO BABETHANOL (FP7/2007-2013)
BAJO EL ACUERDO N° 227498 POR LA BECA OTORGADA

AL DR. EDUARDO TERRÉS DEL INSTITUTO
MEXICANO DEL PETRÓLEO POR LAS IMÁGENES
REALIZADAS CON MICROSCOPIA SEM

ÍNDICE

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO	1
1. Introducción	11
1.1. Características de los fructanos.....	11
1.2. Inulina	12
1.2.1. Proceso de extracción de la inulina.....	15
1.3. Usos y aplicaciones de los fructanos.....	16
1.4. Agavina.....	17
1.5. Hidrólisis de fructanos.....	19
1.6. Producción de Inulinasas.....	19
1.7. Identificación de microorganismos mediante secuenciación.	23
1.8. Reacción en cadena de la DNA polimerasa.....	24
1.8.1. Regiones <i>primer</i> para amplificación de DNA.....	27
2. Hipótesis	28
3. Objetivo.....	28
4. Objetivos particulares	28
5. Materiales y métodos.....	29
5.1. Reactivos	29
5.2. Obtención de cepas.....	29
5.3. Aislamiento de cepas.....	29
5.4. Reacción en Cadena de la DNA Polimerasa para la identificación de los microorganismos 8 y 12.....	30
5.5. Amplificación de la región ITS de la cepa 8 y la región 16s ribosomal de la cepa 12	31
5.6. Confirmación de crecimiento en medio de cultivo con agavina como fuente de carbono.....	33
5.7. Crecimiento de cepas en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono.....	34
5.8. Curvas de crecimiento de las cepas en estudio.....	34
5.9. Determinación del consumo de carbohidratos.....	35
5.10. Reacción de hidrólisis enzimática de la agavina.....	36

5.11. Cromatografía en capa fina a partir de la reacción de hidrólisis enzimática.....	36
5.12. Cromatografía de líquidos de alta resolución de los productos de la reacción enzimática	37
6. Resultados y discusión.	38
6.2. Caracterización de las cepas 8b y 12	40
6.3. Curvas de crecimiento y consumo de carbohidratos.	42
6.4. Desarrollo de cepas en estudio a diferentes temperaturas.....	51
6.5. Ensayos de hidrólisis enzimática	53
6.6. Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	56
7. Conclusiones.	60
8. Referencias.....	62

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de consumo de carbohidratos y desarrollo de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. en medio con agavina a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	43
Gráfica 2. Curva de consumo de carbohidratos y desarrollo de crecimiento de <i>K. marxianus</i> en medio con agavina a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	44
Gráfica 3. Curva de consumo de carbohidratos y desarrollo de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. en medio con fructooligosacáridos a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	45
Gráfica 4. Curva de consumo de carbohidratos y desarrollo de crecimiento de <i>K. marxianus</i> en medio con fructooligosacáridos a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	46
Gráfica 5. Curva de consumo de carbohidratos y desarrollo de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. en medio con glucosa a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	48
Gráfica 6. Curva de consumo de carbohidratos y desarrollo de crecimiento de <i>K. marxianus</i> en medio con glucosa a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	49

Gráfica 7. Curva de consumo de carbohidratos y desarrollo de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. en medio con sacarosa a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	50
Gráfica 8. Curva de consumo de carbohidratos y desarrollo de crecimiento de <i>K. marxianus</i> en medio con sacarosa a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	50
Gráfica 9. Desarrollo de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. a diferentes temperaturas. 180 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	52
Gráfica 10. Desarrollo de crecimiento de <i>K. marxianus</i> a diferentes temperaturas. 180 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL	53
Gráfica 11. Actividades enzimáticas de los extractos crudos de los microorganismos en estudio. Reacción llevada a cabo en tubos microfuga con un volumen total de 1 mL a 38°C durante 1 hora a 200 RPM.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fructano de bajo peso molecular proveniente de <i>B. subtilis</i> , propuesto por Toshio Tanaka (Kagaku et al., 1991; Tanaka et al. 2014)	12
Figura 2. Prebióticos de tipo inulina.(Muñoz-Gutiérrez et al., 2009).....	15
Figura 3. Producción total de tequila y tequila 100% a diciembre 2014, los volúmenes se expresan en millones de litros de acuerdo a reportes del Consejo Regulador del Tequila.....	18
Figura 4. Sitios de reconocimiento enzimático de las exo- y endo- inulinasas sobre un polisacárido como la inulina.	22
Figura 5. Reacción en cadena de la DNA polimerasa o PCR. (Laloux et al. 1991) (Laloux et al. 1991)	26
Figura 6. Microscopia de los microorganismos en estudio. A la izquierda a) y c) de la cepa '12' con microscopio óptico y SEM en fresco respectivamente. A la derecha b) y d) las observaciones de la cepa '8'.....	39
Figura 7. Observación del tipo de crecimiento de las colonias de las cepas en estudio. Medios de cultivo sólido de la cepa '12' (izquierda) y cepa '8' (derecha)	40
Figura 8. Alineamiento BLAST de la secuencia de DNA de la cepa '8', se cuenta con una identidad del 99% para la especie <i>Kluyveromyces marxianus</i>	41
Figura 9. Resultados del alineamiento de BLAST de la secuencia nucleotídica de una de las muestras de DNA de la cepa '12', se observa que la identidad coincide al 99% con <i>Bacillus sp.</i> y dos especies denominadas como <i>Bacillus methylotrophicus</i> y <i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	41
Figura 10. Cromatoplaqueta de las reacciones de hidrólisis enzimática de la inulina pura y la agavina con extracto crudo de <i>Bacillus sp.</i> y <i>K. marxianus</i>	54
Figura 11. Cromatogramas de los ensayos enzimáticos.	56
Figura 12. Cromatogramas de los ensayos enzimáticos. Ensayo enzimático con extracto crudo de <i>Bacillus sp.</i> inducido con:.....	57
Figura 13. Cromatogramas de los ensayos enzimáticos.	58
Figura 14. Cromatogramas de los ensayos enzimáticos. Ensayo enzimático con extracto crudo de <i>K. marxianus</i> inducido con:.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de inulina en algunas especies. (Singh and Singh, 2010).	14
Tabla 2. Inulina de diferentes fuentes usadas para la producción de inulinasas.	21
Tabla 3. Curva patrón de azúcares reductores mediante técnica de DNS	35
Tabla 4. Bioquímica de las enzimas de interés industrial encontradas en diferentes cepas de <i>K. marxianus</i>	47

Resumen

Los fructanos son polisacáridos compuestos por unidades de fructosa unidas por enlaces β -2,1 y presentan una glucosa terminal unida por su carbono 1. Estos compuestos se encuentran como reserva de carbohidratos en hojas, raíces, bulbos y rizomas, en diversos géneros vegetales. Estructuralmente, los fructanos pueden ser cadenas polimerizadas lineales o ramificadas de fructosa y dependiendo de su grado de polimerización podemos llamarlos inulooligosacáridos (IOS), los cuales pueden ser usados para la producción de fructosa y carbohidratos de menor tamaño. Los Inulooligosacáridos han sido usados en las últimas décadas como prebióticos y su uso ha sido extendido ampliamente en la industria alimenticia debido a sus propiedades como espesantes y edulcorantes.

Comercialmente, los inulooligosacáridos son extraídos de la achicoria y la alcachofa de Jerusalén. Sin embargo, existen otras fuentes de extracción, en México, estos compuestos pueden producirse a partir del *Agave* sp. Los fructanos del agave, a diferencia de los provenientes de la achicoria u otras especies, son altamente ramificados con una estructura que combina residuos de fructosa unidos por enlaces β -(2,1) y β -(2,6), con la presencia de residuos de glucosa dentro y fuera de la cadena.

El aumento en la producción y consumo de bebidas fermentadas del agave ha dado paso al aprovechamiento de la gran cantidad de residuos generados por esta actividad, el objetivo de este trabajo fue caracterizar e identificar 2 cepas, una levadura y un bacilo capaces de consumir a la agavina como única fuente de carbono. La caracterización consistió en evaluar la mejor temperatura para crecimiento así como diferentes sustratos que permitieran o no, la expresión de las enzimas inulinasas en ambos microorganismos. Por otro lado se evaluó la actividad hidrolítica de la fracción extracelular de las fermentaciones de cada microorganismo. La producción de fructosa e IOS, productos de la actividad de inulinasas se realizó mediante cromatografía de capa fina así como por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC).

1. Introducción

1.1. Características de los fructanos

Los prebióticos de tipo inulina pertenecen a un gran grupo de carbohidratos llamados “fructanos”, los cuales representan una categoría de compuestos que se encuentran naturalmente en las plantas como oligo- y polisacáridos en el que uno o más enlaces fructosil-fructosa comprende la mayoría de las uniones glucosídicas. Estructuralmente, los fructanos pueden ser de cadenas polimerizadas de fructosa lineales o ramificados. Un fructano que tiene una glucosa precedida de una molécula de fructosa es designado como GF_n – refiriéndose como G a unidad de glucosa terminal, F refiriéndose a las unidades de fructosa, y n como el número de unidades de fructosa encontradas en la cadena del fructano. Un fructano que no tiene una unidad de glucosa se puede designar como F_n (Bosscher *et al.*, 2009; Gibson *et al.*, 1999; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2009). Por lo tanto, un fructano GF_2 es un oligosacárido con una glucosa terminal seguida de dos unidades de fructosa.

Los fructanos también pueden ser descritos por su grado de polimerización (DP o Degree of polymerization). DP se refiere el número de unidades repetidas en un oligómero o cadena polimérica, así, el DP de un fructano individual puede referirse al número de repeticiones de unidades de fructosa e idénticas a n. (Kolida *et al.*, 2007)

Se consideran a los oligosacáridos y fructooligosacáridos (FOS) como sinónimos de los fructanos de tipo inulina, así como los fructanos que son químicamente similares y tienen un DP menor a 10. Estos compuestos son principalmente de origen vegetal, pero pueden encontrarse también en hongos y bacterias (Dilipkumar *et al.*, 2014). Sin embargo, los fructanos de tipo inulina de origen bacteriano son cadenas largas de más de 100,000 unidades de fructosa y tienen un mayor grado de ramificación que los compuestos de origen vegetal que alcanzan aproximadamente 200 unidades de fructosa (Figura 1) (Kagaku *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 2014)

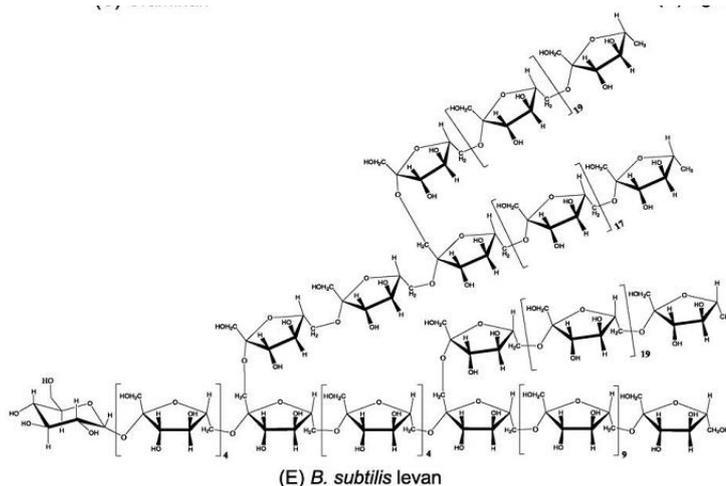


Figura 1. Fructano de bajo peso molecular proveniente de *B. subtilis*, propuesto por Toshio Tanaka (Kagaku et al., 1991; Tanaka et al. 2014)

1.2. Inulina

La inulina se constituye como un fructano de cadenas lineales y ramificadas compuesta de unidades fructosa con enlaces β -2,1. Generalmente, una molécula de glucosa se encuentra unida mediante un enlace α -2,1 al final o al inicio de cada cadena de fructosa (Zhang *et al.*, 2012). El intervalo de grado de polimerización se encuentra entre 2 y 70 unidades de fructosa (López *et al.* 2009). Estos enlaces tan específicos le da a la inulina una estructura y propiedades fisiológicas únicas, ya que la configuración beta de estos enlaces entre monómeros de fructosa, resisten la hidrólisis enzimática de la saliva humana y enzimas intestinales y por lo tanto, son considerados como fibra prebiótica con un valor calórico reducido, que al ser ingerida pasa al estómago y al intestino delgado sin cambios y es fermentada en el intestino grueso donde estimula el crecimiento y/o actividad de las bacterias como lactobacilos o bifidobacterias que son benéficas para la salud, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos patógenos como *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* variedad diarreogénica (Li *et al.*, 2013).

La inulina existe en más de 36,000 especies de plantas como reserva de carbohidratos en conjunto con el almidón y se encuentra principalmente en raíces y bulbos (Jenkins *et al.*, 1999). La mayor parte de las plantas que

contienen inulina son dicotiledóneas, pertenecientes a las familias Asteraceae y Campanulaceae, una menor cantidad de especies son monocotiledóneas de las familias Poaceae, Liliaceae y Amarilidaceae. La dalia (*Dalia* spp), la achicoria (*Cichorium intybus*) y el topinambur (*Heliantus tuberosus*) son ejemplos de especies que tienen un alto contenido de inulina (Tabla 1). Este compuesto fue descubierto a comienzos del siglo XIX por el alemán Valentin Rose, aislando una sustancia peculiar a partir de un extracto de agua hervida de las raíces de la planta *Inula helenium* y la llamó Inulina, pero también ha sido llamada helenin, alatin y meniantin (Franck *et al.* 2002)

Nombre botánico	Nombre común	Parte de la planta	% de Inulina en masa fresca
<i>Agave americana</i>	Agave	Lóbulos o piña	7-10
<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	poro	bulbo	3-10
<i>Allium cepa</i>	Cebolla	Bulbo	2-6
<i>Allium sativum</i>	Ajo	Bulbo	9-16
<i>Arcticum</i> sp.	Bardana	Raíces	3.5-4.0
<i>Asparragus officinalis</i>	esparrago	Tubérculos	10-15
<i>Asparragus racemosus</i>	Safed musli	Tubérculos	10-15
<i>Camassia</i> sp.	Camas	Bulbo	12-22
<i>Cichorium intybus</i>	Achicoria	Raíces	15-20
<i>Cynara cardculus</i>	Alcachofa	Hojas/corazón	3-10
<i>Dahlia</i> sp.	Dalia	Tubérculos	15-20
<i>Helianthus tuberosus</i>	Achicoria de Jerusalem	Tubérculos	14-19
<i>Hordeum vulgare</i>	Cebada	Semillas	0.5-1.5
<i>Microseris lanceolata</i>	Dandelion	Raíces	8-13
<i>Musa acuminata</i>	Plátano	Fruta	0.3-0.7
<i>Secale cereale</i>	Trigo	Semillas	0.5-1.0
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	Yacon	Raíces	3-19
<i>Toraxacum officinale</i>	Dandelion	Hojas	12-15
<i>Tragopogon</i> sp.	Salsifí	Raíces	15-20
<i>Scorzonera hispánica</i>	Salsifí español	Raíces	8.15-10.75
<i>Saussurea lappa</i>	Lotus de las nieves	Raíces	18-20

Tabla 1. Contenido de inulina en algunas especies. (Singh and Singh, 2010)

Los fructanos como la inulina también pueden ser producidos por bacterias *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*; *Zymomonas mobilis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus polmyxa* (Muñoz-Gutiérrez et al., 2009).

1.2.1. Proceso de extracción de la inulina

El proceso de extracción de la inulina comercial es muy similar al proceso de extracción del azúcar común a partir del proceso de refinamiento del azúcar estándar. Las raíces son cosechadas, peladas y lavadas. La inulina es extraída de la raíz usando un proceso de difusión con agua caliente, después es purificada y secada (Belval *et al.*, 1927), el producto resultante tiene un grado de polimerización muy variable (DP)² de 10-12 y una distribución de moléculas con cadenas de 2-60 unidades de longitud. El polvo vendido comercialmente contiene de 6-10% de azúcares nativos como glucosa, fructosa y sacarosa. Se estima que en la dieta de una persona en Norte América se consumen cerca de 1-4 g. de prebióticos como inulina y otros fructooligosacáridos diariamente, una ingesta menor comparada con otras regiones del mundo, como Europa, donde se estima que se consume cerca de 3-11 g. de prebióticos de tipo inulina a diario por persona (Figura 2) (Van Loo *et al.*, 1995).

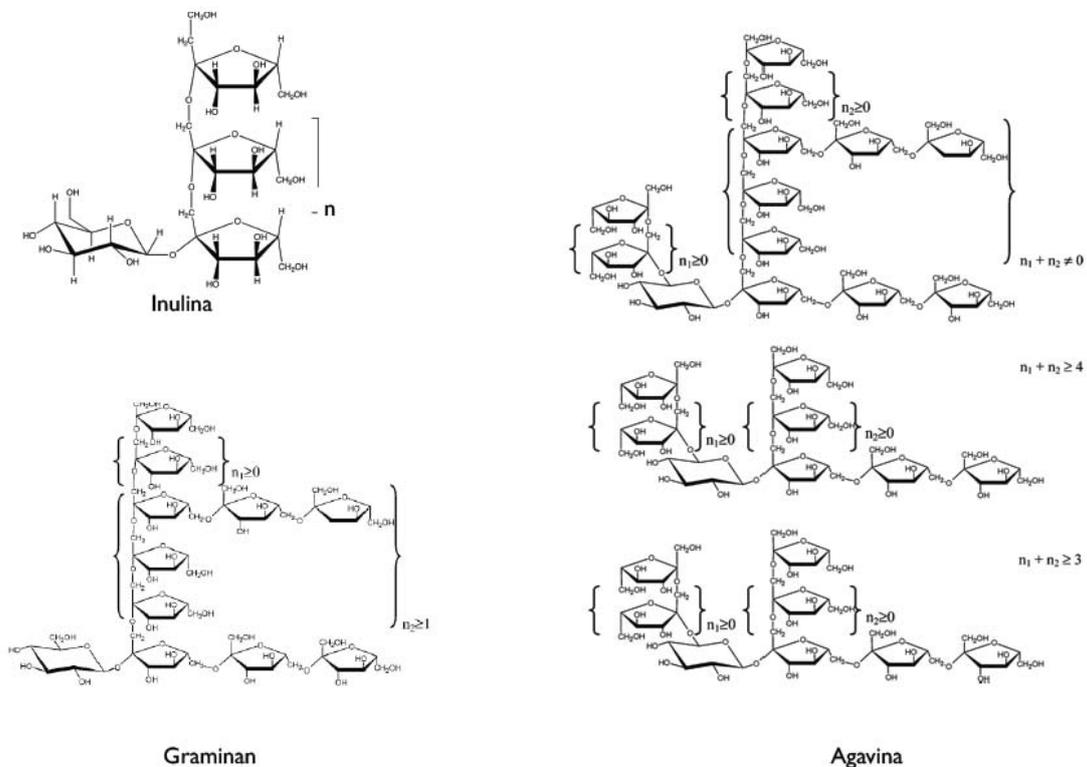


Figura 2. Prebióticos de tipo inulina. (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2009).

En años recientes, los prebióticos de tipo inulina han cobrado gran relevancia pues el consumo en cantidades suficientes a través de alimentos y bebidas, tiene efectos fisiológicos, incluyendo beneficios gastrointestinales. La inulina, oligofruktosa y fructooligosacáridos (FOS) son clasificados como fibras solubles que pueden usarse para incrementar la dieta de fibra o reemplazar azúcares o grasa sin aumentar la viscosidad en las formulaciones alimenticias. Usando una técnica específica, la inulina se procesa en una mezcla con agua para producir la misma textura y sensación en la boca que la grasa. Este sustituto prebiótico de grasa puede usarse en alimentos a base de agua como productos lácteos.

1.3. Usos y aplicaciones de los fructanos

La inulina de cadenas largas y alto peso molecular se prefiere para uso como sustituto de grasa. La longitud de las cadenas largas reduce la solubilidad de los fructanos de tipo inulina, y cuando se mezclan con agua o leche el resultado es la formación de “cristales de inulina”, los cuales son perceptibles dejando en la boca una sensación cremosa y suave (Gibson *et al.*, 1999).

En contraste con los fructanos de cadenas largas y altos pesos moleculares, los fructooligosacáridos y oligosacáridos de bajo peso molecular y cadenas cortas son preferentemente usados como sustitutos del azúcar. Estos oligómeros son más solubles que la sacarosa, poseen cualidades similares al azúcar o jarabe de glucosa y pueden tener aproximadamente el 30% más de la dulzura del azúcar de mesa, así que usualmente se combinan con un edulcorante de mayor intensidad como el aspartame o acesulfame-K para obtener un grado deseado de dulzor enmascarando la sensación que dejan después de ingerirlos. (Jenkins *et al.*, 1999)

Los fructanos tienen una gran cantidad de aplicaciones, sin embargo no es viable su uso en refrescos ni en mermeladas de frutas, ya que los ácidos en estos alimentos hidrolizan los fructanos de tipo inulina en monosacáridos.

Debido al alto costo de la inulina, entre 3 y 4 USD/ Kg, se pretenden utilizar fuentes de inulina más económicas y renovables para la producción de bioetanol, inulooligosacáridos (IOS) y jarabe de fructosa, los cuales usualmente

se producen a partir de maíz, caña y miel de abeja. (Mellado-Mojica y López-Pérez, 2013)

1.4. Agavina

Los agaves, también llamados magueyes, son monocotiledóneas endémicas del continente Americano y aproximadamente 200 especies se encuentran sólo en México con una distribución aproximadamente del 75% del territorio. El *Agave tequilana* (Azul Weber) contiene de 20-25% de inulina (A. Geoffrey y H. Lea 2003) dependiendo de las condiciones ambientales y el estado de desarrollo de la planta, las cuales pueden encontrarse en planicies, montañas, acantilados, dunas costeras o en los picos montañosos, preferentemente entre los mil y dos mil metros de altitud (García *et al.*, 2007). La inulina proveniente del agave, a diferencia de la inulina de la alcachofa de Jerusalem o de la achicoria, es un polímero de alto grado de ramificación con una estructura que combina residuos de fructosa unidos por enlaces β -(2-1) y β -(2-6), con la presencia de residuos de glucosa dentro y fuera de la cadena. (Mancilla-Margalli, *et al.*, 2006). Este alto grado de ramificación y particular estructura ha llevado a nombrar como agavina.

Generalmente la agavina se encuentra entre las raíces, las hojas y la piña del *Agave*, siendo la última el recurso para la elaboración de bebidas alcohólicas tradicionales en México como el Tequila, Bacanora, Sotol y Mezcal. Existen dos clasificaciones de tequila dependiendo del proceso de elaboración: tequila 100% de agave, el cual es elaborado por un proceso de fermentación tradicional a partir de los azúcares del agave, al que se le pueden adicionar hasta un 50% de otros azúcares que no son de agave como glucosa, piloncillo o sacarosa (Calderón *et al.*, 2013).

La denominación de origen del tequila data desde 1975, los estados dentro de esta denominación son Jalisco, Nayarit, Michoacán y Tamaulipas. La estructura que controla y regula la producción de tequila en México se denomina Consejo Regulador del Tequila, que es quien otorga a los productores de agave los certificados para poder ser proveedores de la industria tequilera. De 1995 a 2014 la producción nacional de tequila creció al pasar de 104.3 a 242.4

millones de litros, lo que equivale a una tasa de crecimiento anual de producción del 15% (Consejo Regulador del Tequila).

Producción Total: Tequila y Tequila 100%

Volúmenes expresados a 40% Alc. Vol. millones de litros

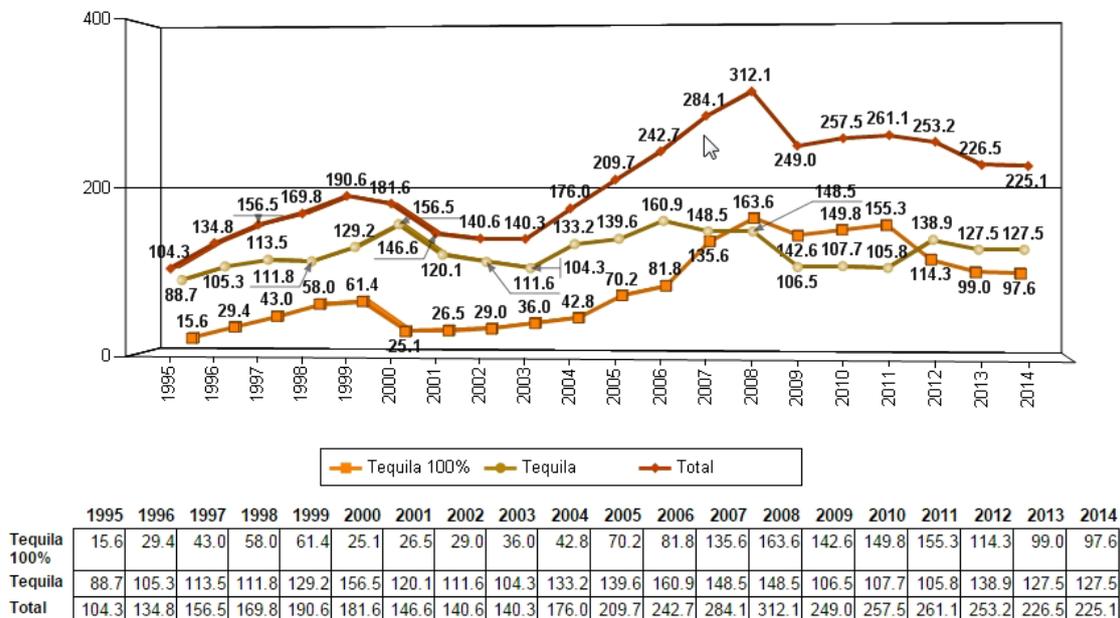


Figura 3. Producción total de tequila y tequila 100% a diciembre 2014, los volúmenes se expresan en millones de litros de acuerdo a reportes del Consejo Regulador del Tequila.

Sin embargo, con este incremento en la producción, también aumenta la cantidad de residuos generados tras jimar o cosechar las hojas externas de la piña del agave, las cuales son ricas en polisacáridos. Se estima que más de un millón de toneladas de plantas de *Agave tequilana weber* azul son procesadas anualmente por la industria tequilera mexicana, generando aproximadamente 384 millones de toneladas de hojas (Consejo Regulador del Tequila). Estos residuos generalmente son dejados en el campo para nutrir la tierra, pero cada año aumenta la cantidad de hojas sobrepasando la capacidad de la tierra, lo que plantea problemas de contaminación por generación de gases como CO₂ y proliferación de fauna nociva. Asimismo hay métodos de baja tecnología para la utilización directa de estos materiales, como preparación de alimentos, construcción, forrajes, fertilizantes y combustibles, pero en los últimos años se han tratado de utilizar como sustratos para la aplicación de enzimas inulinasas de microorganismos como *Aspergillus niger*, aumentando el campo de

aplicación rentable para la producción de enzimas, biomasa, pigmentos y antibióticos (Dinarvand *et al.*, 2012).

1.5. Hidrólisis de fructanos

La inulina y sus productos hidrolizados son legalmente clasificados como alimentos o ingredientes alimenticios en todos los países en los que son consumidos (Coussement *et al.*, 1999). Los inulooligosacáridos (IOS) producidos a partir de la inulina tienen estructuras químicas y funcionalidades fisiológicas similares a las de los fructooligosacáridos (FOS) (Farnworth *et al.*, 1993; Kaur y Gupta, 2002).

La inulina puede ser hidrolizada en fructosa y glucosa mediante tratamiento ácido o hidrólisis enzimática, sin embargo, se prefiere usar este último método para la producción de jarabe de alta densidad de fructosa, ya que bajo condiciones ácidas, también se forma 5-hidroximetilfurfural, un inhibidor del crecimiento celular microbiano. (Liu *et al.*, 2010; Ricca *et al.*, 2009)

1.6. Producción de Inulinasas.

Las inulinasas pueden provenir de plantas, se han aislado y purificado a partir de diente de león (*Taraxacum officinale*), achicoria y alcachofa de Jerusalem. Sin embargo, los microorganismos son la mejor fuente de inulinasas para la producción comercial porque presentan una mayor actividad enzimática que las de provenientes de plantas y además son de fácil mantenimiento y cultivo, rápido crecimiento y altos rendimientos de producción (Chi *et al.* 2011) Las inulinasas microbianas son una clase de enzimas industriales importantes, las cuales usualmente son inducibles y extracelulares. Se han reportado un gran número de hongos, levaduras y bacterias productores de estas enzimas, entre ellos hay hongos filamentosos como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Dilipkumar *et al.*, 2014; Nonklang *et al.*, 2008) los cuales son los mayores representantes, mientras que en las levaduras encontramos a *Kluyveromyces* sp. (Ricca *et al.* 2009). Entre las bacterias reportadas que presentan altos

rendimientos al producir las enzimas se encuentran los géneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Streptomyces* sp.

Hay microorganismos que producen las enzimas con exo y endo actividad como *Aspergillus ficuum* y *Kluyveromyces* sp. (Singh y Singh, 2010, Pandey *et al.*, 1999). La localización de la enzima, su modo de acción y rendimiento depende del tipo de microorganismo y el sustrato usado durante la fermentación. Los microorganismos que expresan inulinasas junto con fermentaciones en los que son empleados se encuentran en la tabla 1. Todos los microorganismos son reportados como productores de endo-inulinasas extracelulares excepto *Aspergillus niger* cepa 12 y *Kluyveromyces* sp. Y-85, los cuales son conocidos como productores de endo-inulinasas intracelulares (Wei *et al.*, 1997).

Microorganismo	Fuente de inulina	% en peso usado
<i>Arthrobacter</i> sp.	Extracto de alcachofa de Jerusalem	1.5
<i>Aspergillus ficuum</i>	Raíces de achicoria	2.0
	Extracto de alcachofa de Jerusalem	2.0
<i>Aspergillus niger</i>	Extracto de raíz de Dandelión	40
	Tubérculos de Dalia	1.0
<i>Bacillus smithii</i>	No especificado	2.0
<i>Chrysosporium pannorum</i>	No especificado	1.0
<i>Paenibacillus</i> sp.	No especificado	0.5
<i>Penicillium purpurogenum</i>	No especificado	2.0
<i>Penicillium rugulosum</i>	Tubérculos de Dalia	3.0
<i>Penicillium</i> sp.	No especificado	1.0
<i>Pseudomonas</i> sp.	Tubérculos de Dalia	1.0
	Polvo de raíz de achicoria	2.0
<i>Rhizopus</i> sp.	Tubérculos de Dalia	1.0
<i>Rhizoctonia solani</i>	Polvo de alcachofa de Jerusalem	3.0
<i>Streptomyces rochei</i>	Raíces de achicoria	1.0

<i>Trichoderma harzianum</i>	Polvo de alcachofa de Jerusalem	3.0
<i>Trichoderma viride</i>	Polvo de alcachofa de Jerusalem	3.0
<i>Xanthomonas campestris pv. phaseoli</i>	Raíces de achicoria	2.0
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Extracto de raíz de achicoria	2.0
<i>Xanthomonas sp.</i>	Tubérculos de Dalia	2.0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	No especificado	4.0

Tabla 2. Inulina de diferentes fuentes usadas para la producción de inulinasas.

El sitio de reconocimiento y de corte de las inulinasas es precisamente el enlace β -2,1 de la inulina y puede presentar actividad exo- y endo- inulítica (Figura 4). La actividad exo-inulinasa produce fructosa como producto final, mientras que la actividad endo-inulinasa produce principalmente varios tipos de fructooligosacáridos y monosacáridos en menor cantidad (Zhang *et al.*, 2012)

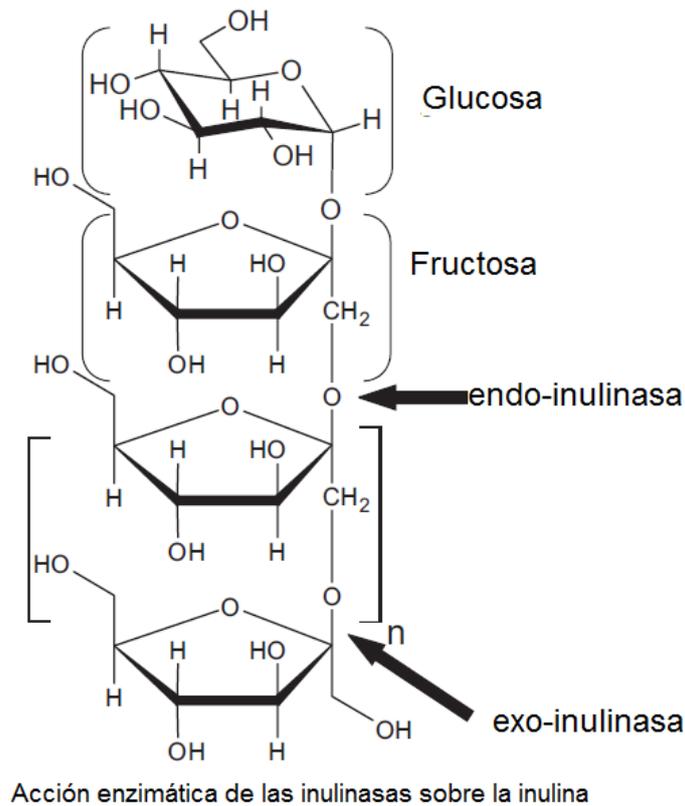


Figura 4. Sitios de reconocimiento enzimático de las *exo-* y *endo-* inulinasas sobre un polisacárido como la inulina.

La materia prima usada para la producción de las inulinasas incluye una gran cantidad de sustratos naturales, puros y mezclados. Aunque la inulina es el sustrato mayormente usado, sustratos como glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, fructanos, etc., han sido usados para inducir las enzimas en diferentes microorganismos, algunos de estos sustratos se encuentran en la alcachofa de Jerusalem, dalia y achicoria. En los reactores de producción, el medio de cultivo empleado es rico en fuentes de nitrógeno como extracto de levadura, extracto de carne, peptonas, urea, etc. y fuentes inorgánicas como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 , etc. Otro factor que tiene influencia en la producción de inulinasas es el pH del medio, aireación y temperatura de fermentación. Generalmente, las inulinasas provenientes de hongos muestran un rendimiento óptimo a pH entre 4.5 y 7.0, de levaduras entre 4.4 y 6.5 y provenientes de bacterias entre 4.8 y 7.0. (Poorna *et al.* 1995). Las inulinasas de bacterias y hongos muestran una temperatura óptima dentro

del intervalo mesófilo y termófilo, mientras que las inulinasas de levaduras lo hacen en el rango mesófilo.

Asimismo, la optimización de las fermentaciones ha involucrado el aprovechamiento de la biotecnología aplicada a los microorganismos. Por ejemplo, se sabe que el gen INU2 de *Aspergillus ficuum* codifica para endoinulinasas y ha sido secuenciado, clonado y expresado con éxito en *Saccharomyces cerevisiae* (Kim *et al.* 2006) obteniendo una endoinulinasas libre de una invertasa extracelular y exoinulítica en el medio de cultivo (Kim *et al.*, 1999).

Las inulinasas también tienen otras aplicaciones como en la producción de etanol, acetona y butanol, pululano, ácido glucónico y sorbitol (Michel *et al.*, 2013).

1.7. Identificación de microorganismos mediante secuenciación.

El desarrollo de técnicas para el estudio directo del genoma microbiano, en particular la amplificación por PCR (*polymerase chain reaction*), ha llevado a una explosión relativa de la cantidad de métodos publicados para la identificación genotípica de los microorganismos en los últimos 25 años. Al mismo tiempo, el valor de la determinación del genotipo ha sido ampliamente reconocido, no sólo en la microbiología clínica, sino también en el sector farmacéutico. La FDA (*Food and Drug Administration*) en Estados Unidos ha resaltado el valor de la investigación y genotipificación para estos propósitos declarando que “Estos métodos son especialmente valiosos para la investigación de las fallas, por ejemplo, pruebas de esterilidad y medios de cultivo contaminados”. Una gran cantidad de técnicas de análisis del DNA extraído de células microbianas, a menudo denominado “huella de DNA”, se han desarrollado para la tipificación, las técnicas más usadas actualmente son (Ahmad *et al.*, 2011):

- Electroforesis en gel con gradiente de potencial (PFGE-Pulsed-field gel electrophoresis), la cual permite la separación de un bajo número de fragmentos largos de DNA producidos por enzimas de restricción para generar segmentos genéticos altamente selectivos. Se usa para la

tipificación de patógenos bacterianos en humanos y la investigación por brotes de enfermedades, sin embargo, es relativamente costosa y requiere de al menos 3 días para obtener un resultado.

- Ribotipificación, es una técnica que se basa en la estabilidad relativa de los genes que codifican para el ARN ribosomal, 16s y 23s rRNA. Los genes se cortan usando enzimas de restricción y los fragmentos de DNA resultante son separados mediante electroforesis añadiendo sondas fluorescentes para su fácil visualización. Actualmente este método es automatizado y los resultados son obtenidos a las 24 horas.
- Reacción en cadena de la DNA-polimerasa o PCR se basa en el hecho de que el genoma de hongos y bacterias contienen numerosas secuencias de DNA repetitivas y no codificantes, ampliamente separadas y su disposición variada entre las cepas. Esta técnica consiste en la amplificación de estas secuencias repetitivas para producir ampliaciones de longitud variable que se pueden separar por electroforesis dando una idea de las bandas que emiten fluorescencia a diferentes intensidades de radiación después de la unión con un colorante intercalante.
- Microarreglos de DNA se refiere a una micromatriz de colecciones de sondas de DNA unidas en un patrón ordenado sobre una superficie sólida. Estas sondas pueden utilizarse para detectar la presencia de secuencias complementarias en el DNA aislado, y por lo tanto puede detectar marcadores genéticos en cepas bacterianas específicas.

1.8. Reacción en cadena de la DNA polimerasa

La base actual de estos métodos es la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, que permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA *in vitro*. Esta técnica puede copiar segmentos de DNA hasta mil millones de veces en un tubo de ensayo, un proceso llamado amplificación, que genera grandes cantidades de genes específicos y otros segmentos de DNA. En realidad, la PCR no copia moléculas enteras de DNA, sino que amplifica fragmentos de hasta algunos miles de pares de bases de una molécula de DNA más grande.

Las etapas de la amplificación del DNA por PCR se pueden resumir como sigue:

- Desnaturalización de la hebra molde de DNA a amplificar, generalmente las temperaturas de desnaturalización se encuentran entre 94-96°C dependiendo del tipo de DNA polimerasa que se emplea.
- Se añaden o sintetizan dos oligonucleótidos cebadores o primers complementarios flanqueando el DNA desnaturalizado por calor por los extremos 3' de la doble cadena, generalmente son secuencias cortas de entre 6 y 30 nucleótidos, estos nucleótidos delimitan la zona de DNA a amplificar, es decir, que se definen como los extremos de la secuencia que se desea replicar. Para este proceso es necesario el descenso de la temperatura de reacción a 40-68°C durante 20-40 segundos permitiendo el alineamiento.
- A continuación la DNA-polimerasa toma la hebra molde para sintetizar la cadena complementaria y parte del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de una nueva cadena de DNA. Esta enzima añade los nucleótidos complementarios a partir del extremo 3'. La temperatura de este paso depende de la polimerasa usada, por ejemplo para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad se encuentra entre 75-80°C.
- Tras un periodo de incubación adecuado, la mezcla se calienta de nuevo para separar las cadenas, después, la mezcla se enfría para permitir la hibridación de los cebadores con las regiones complementarias de DNA recién sintetizado, y se repite todo el proceso, usualmente se realizan de 20 a 30 ciclos, lo que produce un incremento de copias de la secuencia original de hasta 10^9 veces.
- Para finalizar la técnica, se lleva a cabo una última etapa a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR para asegurar que cualquier cadena de DNA simple libre sea totalmente amplificado. (Hierro *et al.* 2004)

Esta reacción se lleva a cabo en un volumen de 15-50 μ L, en pequeños tubos de 0.2-0.5 mL que se colocan en el *termociclador*, el cual es un equipo

automatizado que puede realizar ciclos de calentamiento y enfriamiento, estos ciclos toman 5 minutos, por lo que el método permite grandes amplificaciones en pocas horas (Figura 5).

Reacción en cadena de la ADN Polimerasa

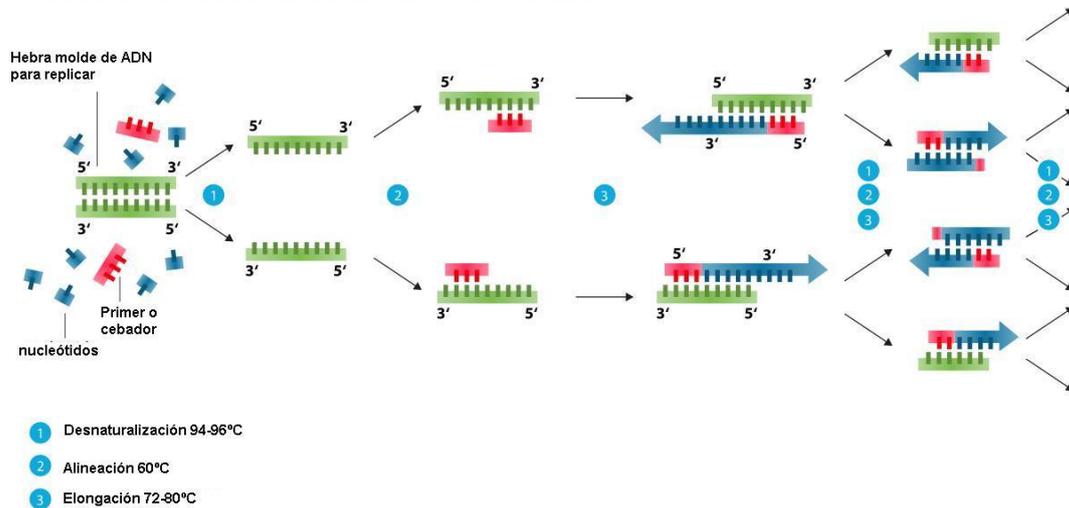


Figura 5. Reacción en cadena de la DNA polimerasa o PCR. (Laloux et al. 1991)
(Laloux et al. 1991)

Esta técnica es una herramienta muy potente, de fácil utilización, extremadamente sensible y altamente eficiente. Se puede utilizar para la clonación de genes o con fines de secuenciación, porque el gen o los genes de interés se pueden amplificar fácilmente.

La PCR también se utiliza rutinariamente para estudios comparativos filogenéticos para amplificar genes de diversas procedencias, es decir, comparar secuencias y designar familias filogenéticas. En estos casos, los cebadores se sintetizan para regiones del gen cuya secuencia está altamente conservada en una gran variedad de organismos. Tal es el caso del ARN ribosomal 16S, una molécula utilizada en análisis filogenéticos, tiene regiones altamente conservadas y otras altamente variables, los cebadores específicos para el gen del rARN 16s de bacterias o de arqueas se pueden sintetizar y utilizar para analizar estos organismos en un hábitat específico. El ribosoma es una estructura funcional que evolutivamente se ha conservado, lo que quiere decir que también se conserva el DNA que le da origen o no hay un cambio

importante en su secuencia. Sin embargo, durante el periodo de maduración del ARN existe una pérdida significativa de las regiones no codificantes ITS (*Internal Transcribed Spacer*) por no tener, por así decirlo, una función más que separar los genes, así que cuando un organismo diverge en su código genético, se obtienen diferentes especies que conservan su secuencia de DNA codificante (Manter y Vivanco, 2007).

1.8.1. Regiones *primer* para amplificación de DNA

Una región ITS se refiere a un fragmento de ARN no funcional situada entre los códigos que codifican para el ARN ribosómico estructural 16S y 26S en una transcripción precursora común. Al comparar las regiones ITS de dos microorganismos podemos saber si son de la misma especie, un menor porcentaje de igualdad nos indica un distanciamiento evolutivo de especies. Para la identificación de hongos y levaduras, usualmente se usan los primers ITS1 e ITS4 por ser muy específicos y eficientes, estos primers han sido usados con éxito para la identificación de varias especies de hongos entre ellos 10 ascomicetos, 6 basidiomicetos y 4 zigomicetos (Manter y Vivanco, 2007) por lo que se espera que en este estudio, alguno de los microorganismos pertenezca a alguna de las familias antes mencionadas y los primers se unan con facilidad a las secuencias de DNA genómico.

2. Hipótesis

Los microorganismos capaces de utilizar a la agavina como fuente de carbono, necesariamente deben producir enzimas capaces de hidrolizar la estructura ramificada de la agavina.

3. Objetivo

Caracterizar e identificar dos microorganismos capaces de utilizar a la agavina como única fuente de carbono para la producción de fructooligosacáridos.

4. Objetivos particulares

Identificar mediante el uso de técnicas moleculares a los microorganismos seleccionados para el tema de estudio.

Seleccionar los sustratos con los cuales se producen las inulinasas.

Determinar la actividad endo- y exo-inulinolítica de las enzimas degradadoras de agavina, vía ensayos enzimáticos de los extractos celulares

Analizar por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) los productos resultados de la hidrólisis enzimática de la agavina.

5. Materiales y métodos

5.1. Reactivos

La agavina y los fructooligosacáridos fueron proporcionadas amablemente por la compañía Nekutli. Los reactivos: ácido 3,5-dinitrosalicílico ((O₂N)₂C₆H₂-2-(OH)CO₂H) al 98% (DNS) en polvo, cristales de fenol (C₆H₅OH), glucosa (C₆H₁₂O₆) grado reactivo, extracto de levadura en polvo, agar-agar, los reactivos grado analítico metanol (CH₄O), butanol (C₄H₁₀O), isopropanol (C₃H₈O), se adquirieron en Sigma Aldrich, el hidróxido de sodio (NaOH) USP en lentejas, sulfato de magnesio (MgSO₄) en polvo y la sacarosa (C₁₂H₂₂O₁₁) fueron adquiridos en Merck, la fructosa (C₆H₁₂O₆) grado reactivo y reactivo de referencia, sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) de la droguería Cosmopolita, el cloruro de potasio (KCl) en escamas, el fosfato de potasio (KH₂PO₄) en polvo, el ácido acético glacial (C₂H₄O₂), el acetonitrilo (CH₃CN) grado HPLC adquiridos con J. T. Baker, las cromatoplasmas de sílice de Microgenomic, el agua ultrapura de Simplicity System de Millipore, la Taq DNA polimerasa Thermo Scientific, Kit de purificación de bandas de PCR y QIAquick Extraction Kit de QIAGEN, DNAzol y agarosa de Invitrogen Inc., nitrógeno líquido, nitrógeno e hidrógeno para cromatografía provenientes de Infra.

5.2. Obtención de cepas

Las cepas empleadas en este trabajo se obtuvieron por muestreo directo a partir de bagazo de *Agave tequilana Weber* utilizadas para la producción de tequila en el estado de Jalisco, también se aislaron cepas provenientes de pulque comprado en el estado de Hidalgo y Estado de México, las cepas fueron elegidas de acuerdo a su capacidad de consumir agavina como única fuente de carbono.

5.3. Aislamiento de cepas

Para el aislamiento de las muestras se usaron medios de cultivo sólidos en cajas petri preparados con los siguientes reactivos:

- ◆ 0.5% Agavina (Metlin),

- ◆ 0.5% extracto de levadura,
- ◆ 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- ◆ 0.05% KCl,
- ◆ 0.1% KH_2PO_4 ,
- ◆ 0.05% MgSO_4 y
- ◆ 1.5% agar

Las sales, el extracto de levadura y la agavina se mezclaron en agua en vasos de precipitados de 500 mL, una vez hecho esto el medio de cultivo se esterilizó a 121°C durante 15 minutos en una Autoclave Hirayama de Amerex Instruments, Inc. y se sirvió en cajas Petri.

Posteriormente las muestras fueron sembradas e incubadas durante 24 horas a 35°C en una incubadora innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker de New Brunswick Scientific, se seleccionaron las cepas que presentaron crecimiento en las placas petri y un halo transparente alrededor de las colonias aisladas, lo que significa degradación de los fructanos polimerizados.

Para conservar las cepas se almacenaron en medio mencionado anteriormente (30%) y glicerol (70%) en tubos de microfuga a una temperatura de -80°C en un Congelador Revco modelo ULT390-3-A30, de Legaci Refrigeration System, powered by Copeland DuPont Suva Refrigerants

Posteriormente las dos cepas de estudio identificadas como „8“ y „12“ fueron descongeladas e inoculadas en tubos de ensaye de 10 mL con tapón de rosca para preparar pre-inóculos a 35.0°C con agitación de 180 RPM durante 24 h. para los ensayos experimentales por duplicado con distintas concentraciones de agavina.

5.4. Reacción en Cadena de la DNA Polimerasa para la identificación de los microorganismos 8 y 12

Con la finalidad de identificar a los microorganismos usados en este trabajo se purificó el DNA genómico y amplificó por PCR la región 16S para la cepa 12 y la región ITS para la cepa 8.

5.5. Amplificación de la región ITS de la cepa 8 y la región 16S ribosomal de la cepa 12

Las cepas de interés se hicieron crecer en medios de cultivo con agavina (0.5%) durante 24 h, 38°C a 180 RPM en tubos de ensaye. La extracción de DNA para la cepa 8 se realizó usando el reactivo DNAzol de Molecular Research Center, Inc. de la siguiente manera. Se colocó un volumen de 1.5 mL de muestra proveniente de medio de cultivo en tubos microfuga se centrifugó a 14,000 RPM durante 5 minutos. Con la finalidad de lisar las células la muestra se calentó en un baño con glicerol a 80°C y se congeló en un baño de nitrógeno, posteriormente se agregó 1 mL de DNAzol, y se homogenizó agitando ligeramente por inversión, subsecuentemente se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugó a 10,000 RPM, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, donde se agregó 0.5 mL de isopropanol (-20°C) y se mezcló por inversión, al finalizar se incubó durante 3 min. a temperatura ambiente, esto con el objetivo de precipitar el DNA genómico; para continuar se centrifugó 10 min. a 10,000 RPM a una temperatura de 4°C y se eliminó el sobrenadante por decantación, lavamos el DNA con 1 mL de etanol (70%), se lavó nuevamente durante 2 minutos a 10,000 RPM a 4°C, se eliminó el sobrenadante por decantación, finalmente el pellet de DNA se secó en un tubo abierto durante 15 minutos y se agregó 40 µL de agua estéril.

Los cebadores empleados para la amplificación fueron:

- ◆ ITS1 5"–TCCTCCGCTTATTGATATGC– 3"
- ◆ ITS4 5"–TCCTCCGCTTATTGATATGC– 3"

El DNA de la cepa identificada como „12" se llevó a cabo con base a cuatro etapas consecutivas: lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación del DNA y redisolución del DNA (Rodicio *et al.* 2004). El procedimiento que se realizó fue el siguiente: se resuspendió el botón de la muestra centrifugada en 0.5 mL de buffer TE, después se adicionó 1 mg de lisozima y se incubó a 37°C durante 1 h. Posteriormente se adicionaron 100 µL de SDS al 10% y se incubó a 50°C durante 15 min., a esta mezcla agregamos 100 µL de proteinasa K (10 UI/mL) e incubar a 37°C durante 1 h. subsecuentemente se agregaron 100 µL de CTAB/ NaCl, se incubó durante 1

h. a 50°C, al finalizar se adicionaron 800 µL de cloroformo y se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregó 1 volumen de isopropanol, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 10,000 durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70% y se resuspendió el sobrenadante en 50 µL de amortiguador TE.

Para la amplificación del DNA mediante PCR se usaron primers que codifican para la región 16s ribosomal de bacterias con base en las observaciones microscópicas realizadas anteriormente. Los primers o cebadores usados para amplificar esta región fueron:

- ♣ fD1 (5"AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3")
- ♣ rP2 (5"ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3")

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	Cantidad
Taq Amortiguador 5x	1x
dNTP's 10 mM	0.2 mM
ITS1/ fD1 20uM	0.4 mM
ITS4/ rP2 20uM	0.4 mM
DNA purificado	100 ng
Taq Polimerasa (Thermo Scientific)	1 µL
Agua ultrapura de purificador Millipore Simplicity UV	c.b.p. 20 µL

Para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de DNA, se utilizó un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler, de AB Applied Biosystems con las siguientes condiciones:

Desnaturalización primaria: 94°C por 3 min

Desnaturalización secundaria: 94°C por 40 seg

Alineación: 56°C por 40 seg

Elongación: 72°C por 40 seg

Elongación final: 72°C por 5min

} 34 ciclos

Los productos de amplificación fueron colocados en un gel 1% (w/v) de agarosa en amortiguador TAE 1X y separados por electroforesis en una cámara Bio-Rad aplicando una diferencia de potencial de 100 A.

La extracción del DNA separado a partir del gel de agarosa se lleva a cabo con un Kit de extracción de gel QIAquick de QIAGEN de la siguiente manera: se cortó cuidadosamente el fragmento de DNA del gel, después fue colocado en un tubo de microfuga, se pesaron y agregaron 3 volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel (100 mg equivalen a 100 µL), posteriormente los tubos fueron puestos en incubación a 50°C por 10 min, finalizado esto, se agitó el tubo en vortex durante 2-3 min para ayudar a disolver el gel, finalmente se agregó 1 volumen con respecto al volumen del gel de isopropanol y se mezcló.

La concentración y pureza del DNA amplificado se determinó con ayuda de un nano espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Scientific a una longitud de onda de 260 nm Para identificar los microorganismos, el DNA (100 ng/µL) purificado se envió a la compañía Laragen, Inc. ubicada en 10601 Virginia Ave. Culver City, California 90232.

5.6. Confirmación de crecimiento en medio de cultivo con agavina como fuente de carbono

De aproximadamente 100 microorganismos aislados en el grupo de investigación, se seleccionaron únicamente para trabajar dos tipos de microorganismos una levadura y una bacteria con la capacidad de consumir agavina como única fuente de carbono. Esta prueba se realizó por duplicado con las cepas „8“ y „12“ en un medio de cultivo líquido que contenía 0.5% agavina, 0.5% extracto de levadura, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% KCl, 0.1%KH₂PO₄, 0.05 MgSO₄, incubando a 38°C a 180 RPM durante 24 horas en un volumen de

150 mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Las cepas seleccionadas fueron aquellas que presentaron crecimiento. Así mismo, la observación microscópica a 10x y 100x se realizó con tinción con safranina de Gram.

5.7. Crecimiento de cepas en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono

Se realizaron pruebas de crecimiento en diferentes fuentes de carbono además de la agavina, como sacarosa, glucosa, y fructooligosacáridos comerciales con el fin de obtener un sustrato en el cual los microorganismos se desarrollen óptimamente y conocer su metabolismo. Se tomaron las cepas congeladas y se usaron para preparar los inóculos en tubos de ensaye de 10 mL; la composición de los medios es la misma descrita anteriormente y además suplementado, por diferentes fuentes de carbono como 0.5% de agavina, 0.5% sacarosa, 0.5% de glucosa o 0.5% de fructooligosacáridos. Los medios de cultivo para realizar las curvas de crecimiento tienen la misma composición que los inóculos preparados respectivamente y estos se incubaron a 38°C a 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con muestreo constante durante 48 h.

5.8. Curvas de crecimiento de las cepas en estudio

Se determinó la densidad óptica de las muestras obtenidas a partir de 1 mL de los medios de cultivo, las determinaciones se hicieron a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis, de Thermo Scientific, se realizaron diluciones de las muestras con una lectura mayor a 1.000 en absorbancia a temperatura ambiente. Los datos de absorbancia se graficaron en función del tiempo (48 h de muestreo) tomando en cuenta las diluciones, el objetivo fue comparar el desarrollo de ambas cepas en las diferentes fuentes de carbono descritas previamente a una temperatura de 38°C. Posteriormente este experimento se realizó con inulina variando las condiciones de temperatura a 25, 30, 34 y 45 °C con agitación de 180 RPM en un volumen de 100 mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL.

5.9. Determinación del consumo de carbohidratos

El perfil de consumo de carbohidratos FOS y agavina se realizó mediante la prueba de azúcares reductores DNS. Para realizar este método se centrifugaron las muestras obtenidas en tubos de microfuga a 14000 RPM durante 10 minutos, se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se agregaron 200 μ L de amortiguador de acetatos 0.5 M pH= 5.5 y 600 μ L de reactivo de DNS, los tubos fueron mezclados y calentados a 100°C en baño durante 5 minutos, terminado este tiempo, la reacción se enfrió en un baño de hielo durante 10 minutos y finalmente fueron añadidos 4 mL de agua a cada tubo y se agitaron. Posteriormente se midieron a una longitud de onda de 540 nm. La curva patrón de DNS se realizó conforme a las cantidades descritas en la tabla 3.

Curva patrón DNS				
Conc mcg/mL	%INU	μ L Stock 1%	μ L Amortiguador Acetatos	μ L DNS
500	0.5	50	250	600
400	0.4	40	260	600
300	0.3	30	270	600
250	0.25	25	275	600
200	0.2	20	280	600
100	0.1	10	290	600
50	0.05	5	295	600

Tabla 3. Curva patrón de azúcares reductores mediante técnica de DNS

El análisis cuantitativo para determinar el consumo de sacarosa y glucosa en los medios de cultivo se llevó a cabo por HPLC usando una columna aminada Waters High Performance Carbohydrate column 4u 4.6x250 mm. La fase móvil usada fue un gradiente de agua: acetonitrilo, con un flujo de 1 mL/ min y a 40°C. El volumen de inyección de muestras fue de 15 μ L. Las relaciones ACN: H₂O fueron 75:25. Se usó un detector de índice de refracción 1100 Series G1362A de Agilent Technologies. La elección del uso de la técnica de HPLC para cuantificar la sacarosa se debe a que es un dímero sin radicales o terminaciones con poder reductor por lo que si usamos reactivo de DNS no se

realizará la reducción de ningún azúcar, caso contrario la glucosa es una hexosa que posee un grupo carbonilo disponible con gran poder reductor con DNS sin embargo, este gran potencial reductor ocasiona que la técnica sea alterada realizando diluciones para medir con el espectrofotómetro por lo que es preferible el uso del HPLC.

5.10. Reacción de hidrólisis enzimática de la agavina

Con la finalidad de observar si las enzimas degradadoras de agavina se expresaron al usar diferentes tipos de carbohidratos, se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de la agavina. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: la reacción se realizó en un volumen total de 1 mL. Se agregaron 500 μ L de extracto crudo filtrado y 500 μ L de amortiguador de acetatos 0.5M pH 5.5 con 1% de agavina o inulina pura suspendida, la reacción fue incubada a 40°C durante 15 y 30 minutos a 300 RPM en un ThermoMixer C Eppendorf. Después el tubo con la mezcla fue colocado en un baño con hielo durante 5 minutos para detener la reacción. Los productos se observaron a través de cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos de alta resolución y método de azúcares reductores con reactivo DNS. Una unidad de inulinasa se definió como la cantidad de enzima que produce un μ g de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones del ensayo.

5.11. Cromatografía en capa fina a partir de la reacción de hidrólisis enzimática.

Se realizaron análisis cualitativos de la degradación enzimática de la inulina pura y la agavina y de las pruebas de la actividad por medio de la técnica de cromatografía en capa fina o TLC (Thin Layer Chromatography). La técnica se usó para separar productos provenientes de una reacción como en el caso de los azúcares producto de hidrólisis enzimática de la agavina. Se empleó una placa de gel de sílice y una fase móvil compuesta por etanol, butanol y agua en una proporción de 5:3:1 respectivamente. Las muestras se colocaron en uno de los bordes de la placa con ayuda de un capilar y posteriormente esta placa se puso en una cámara de elución junto con la fase móvil procurando que ésta no rebasara la altura donde se colocaron las muestras, la fase móvil generalmente debe eluir hasta 0.5 cm. antes de la parte superior de la placa. La placa se

secó a temperatura ambiente para eliminar la fase móvil y hecho esto, se reveló impregnando la placa con solución de Orcinol 10 mg/mL en una solución de etanol con ácido sulfúrico al 5% y se calentó a 95°C.

5.12. Cromatografía de líquidos de alta resolución de los productos de la reacción enzimática

El análisis cuantitativo para las reacciones enzimáticas con agavina, FOS, sacarosa y glucosa se llevó a cabo por HPLC usando las columnas aminadas Phenomenex Luna 5 u NH₂, 230x4.6 mm. Y Waters High Performance Carbohydrate column 4u 4.6x250 mm. La fase móvil usada fue un gradiente de agua: acetonitrilo, con un flujo de 1 mL/ min y a 40°C. El volumen de inyección de muestras es de 15 µL. Las relaciones ACN:H₂O son 75:25.

Se usó un detector de dispersión de luz con un flujo de nitrógeno de 1.0 SLM, temperatura de nebulizador de 60°C y temperatura de evaporador de 80°C. y un detector IR.

6. Resultados y discusión.

6.1. Selección de microorganismos consumidores de agavina.

De la colección de cepas del laboratorio 314 se seleccionaron dos cepas para realizar este trabajo, el criterio de selección fue su capacidad para consumir agavina como única fuente de carbono, las cepas fueron etiquetadas como 8b y 12 para fines experimentales.

Para su identificación microscópica, las cepas fueron tomadas del medio de crioconservación a -80°C compuesto por glicerol y medio de cultivo anteriormente descrito, e inoculadas en medio de cultivo estéril con agavina durante 24 horas a 35°C y 180 RPM. Al finalizar las 24 horas se tomaron muestras para tinción con safranina y tinción de Gram para observación al microscopio (Figura 6). La cepa 8b muestra características morfológicas levaduriformes como bipartición o gemación y formas ovoides o elipsoidales. Mientras que la morfología de la cepa 12 sugiere la presencia de una bacteria bacilar Gram + (trabajo realizado por Gerardo Pérez, alumno del lab. 314 del conjunto de E de la Facultad de Química), en una preparación en fresco de esta cepa se observó que el microorganismo tiene movimiento por lo que se piensa que es flagelado. Así mismo contamos con el apoyo del Dr. Eduardo Terrés del Instituto Mexicano del Petróleo para las observaciones microscópicas con SEM en fresco a partir de medios de cultivo líquidos suplementados con agavina, con lo cual pudimos reafirmar que se tratan de formas bacilares para la cepa 12 y formas ovoides y elipsoidales para la cepa 8.

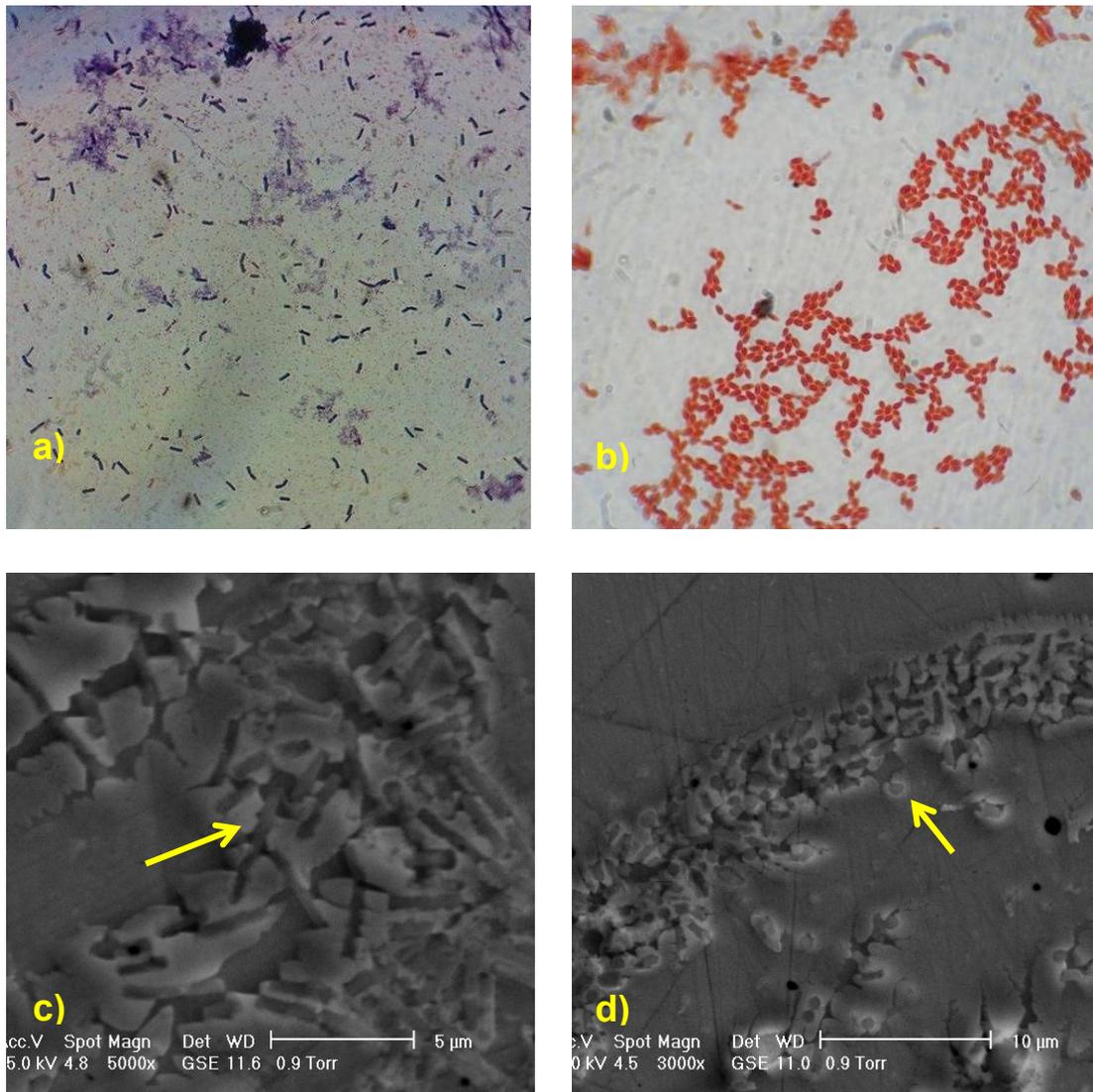


Figura 6. Microscopía de los microorganismos en estudio. A la izquierda a) y c) de la cepa '12' con microscopio óptico y SEM en fresco respectivamente. A la derecha b) y d) las observaciones de la cepa '8'

En la observación macroscópica (figura 7) de los medios sólidos preparados con 0.5% de agavina la cepa 8b tiene un desarrollo de colonias puntiformes definidas de color blancas rodeadas con halos transparentes, mientras que la cepa 12 tiene un crecimiento en placa con colonias blancas opacas sin bordes definidos, el halo de consumo de agavina no es tan claro como en el caso de la cepa 8b.

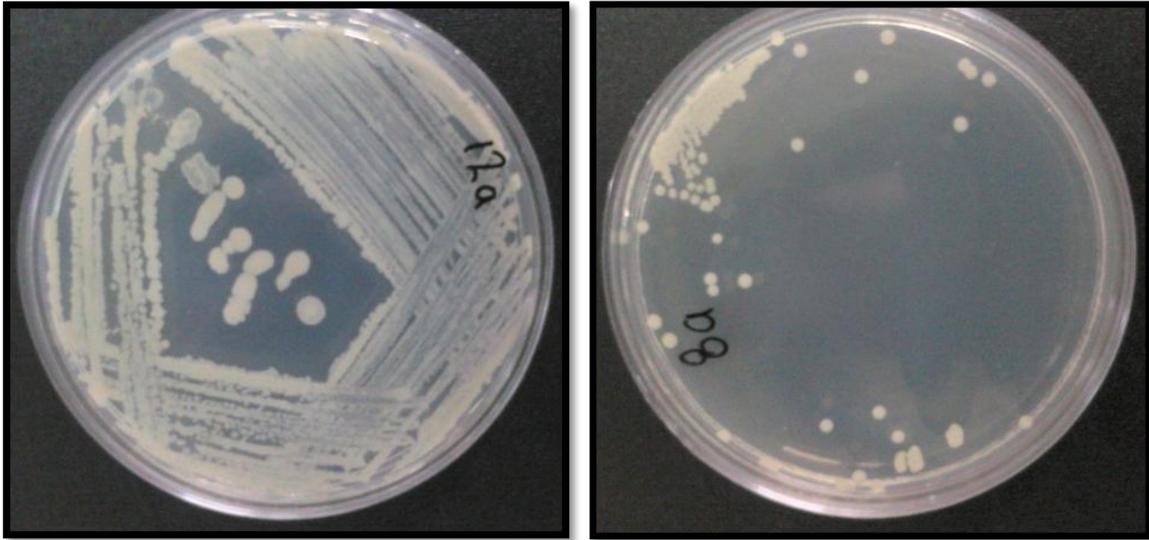


Figura 7. Observación del tipo de crecimiento de las colonias de las cepas en estudio. Medios de cultivo sólido de la cepa '12' (izquierda) y cepa '8' (derecha)

6.2. Caracterización de las cepas 8b y 12

El DNA extraído, purificado y amplificado a partir de la región ITS y 16s ribosomal de las cepas 8 y 12 respectivamente, fue secuenciado por Laragen Inc. Los resultados de la secuenciación son obtenidos de la página web de Laragen y posteriormente esta secuencia de nucleótidos es introducida en una base datos llamada BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que como su nombre indica, realiza un alineamiento local sin permitir la presencia de huecos. El alineamiento se realiza utilizando el algoritmo de Smith&Waterman (1981) o el algoritmo de Sellers, P.H. (1984), así BLAST devuelve todos los pares de segmentos mejor alineados o aquellos segmentos cuyo "Score" es inmejorable ya sea por extensión o corrimiento del segmento. Al final se reportan sólo los alineamientos que hayan obtenido una probabilidad menor a E. El parámetro E es conocido como e-valor (*e-value*) de corte, y nos permite definir qué alineamientos queremos obtener de acuerdo a su significación estadística. Cuanto menor sea el valor de E, más significativo es un alineamiento. Así, de acuerdo a esta información estadística, la herramienta BLAST reporta también un porcentaje de identidad, listando los microorganismos que mejor se alinean estadísticamente a la secuencia de nucleótidos.

Como se muestra en las Figuras 8 y 9, para la secuencia de la cepa 8, BLAST reporta que *Kluyveromyces marxianus* tiene un 99% de identidad con la secuencia aislada en el laboratorio (Figura 8) y para nuestra cepa 12 se muestra un rango más amplio de coincidencias entre las que figuran *Bacillus* sp., *Bacillus methylotrophicus* y *Bacillus amyloliquefaciens* (trabajo realizado por Gerardo Pérez, alumno del laboratorio 314) (Figura 9). Finalmente se decidió referirse a los microorganismos de estudio como *Kluyveromyces marxianus* y *Bacillus* sp.

RID EZ9KSN82014 (Expires on 02-28 06:04 am)		Database Name nr	
Query ID	Id Query_46989	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.2.30+ ▶ Citation
Molecule type	nucleic acid		
Query Length	702		

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/> Kluyveromyces marxianus DNA, chromosome 5, complete genome, strain: NBRC 1777	1225	2450	96%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042 DNA, complete genome, chromosome 5	1225	2450	96%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Kluyveromyces marxianus isolate B-WHX-12-25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	1225	1225	96%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Kluyveromyces marxianus strain CHY1612 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	1225	1225	96%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA	1225	1225	96%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Kluyveromyces marxianus strain WM 03.237 isolate ISHAM-ITS ID MITS756 18S ribosomal RNA	1223	1223	96%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Kluyveromyces marxianus strain PAZ 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	1223	1223	96%	0.0	99%

Figura 8. Alineamiento BLAST de la secuencia de DNA de la cepa '8', se cuenta con una identidad del 99% para la especie *Kluyveromyces marxianus*.

RID FD30G233014 (Expires on 03-05 11:37 am)		Database Name nr	
Query ID	Id Query_6131	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.2.30+ ▶ Citation
Molecule type	nucleic acid		
Query Length	1000		

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. APG-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	97%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. ap-1(2015) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	97%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Bacillus methylotrophicus strain KE2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	97%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. N-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	97%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Bacillus amyloliquefaciens strain ZQ1107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	97%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Uncultured Bacillus sp. clone ZB05313377(28) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	97%	0.0	99%
<input type="checkbox"/> Bacillus amyloliquefaciens strain zyx18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	97%	0.0	99%

Figura 9. Resultados del alineamiento de BLAST de la secuencia nucleotídica de una de las muestras de DNA de la cepa '12', se observa que la identidad coincide al 99% con *Bacillus* sp. y dos especies denominadas como *Bacillus methylotrophicus* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

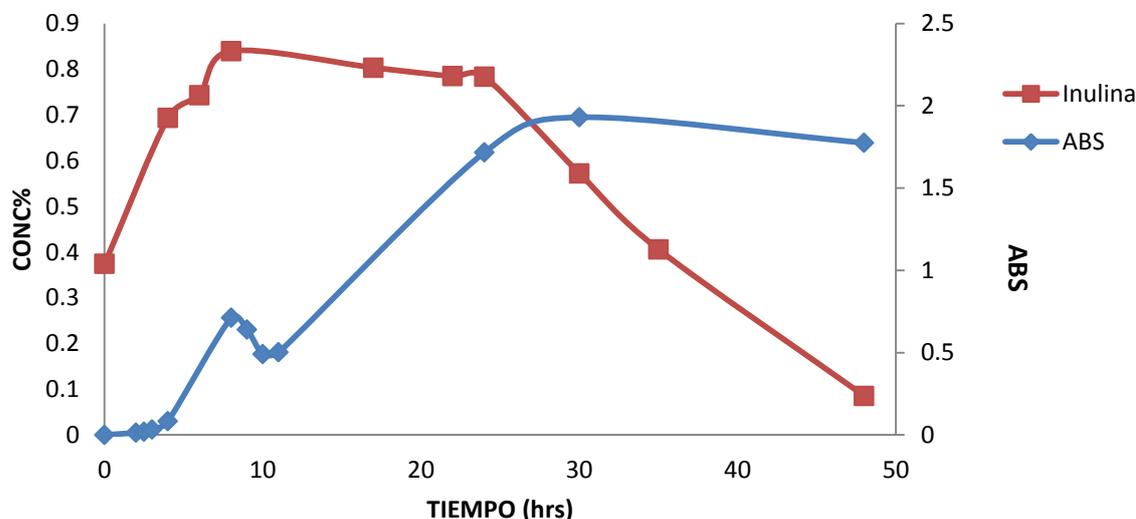
Para una mejor identificación de la especie de *Bacillus* sp. Y mejor referencia para futuros trabajos, es posible el uso de regiones de amplificación más específicas.

6.3. Curvas de crecimiento y consumo de carbohidratos.

En las gráficas 1 y 2 se observa el crecimiento de los microorganismos *Kluyveromyces marxianus* y *Bacillus* sp. en medio de cultivo con 0.5% de agavina, la densidad óptica fue medida mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm, así mismo, se determinó el consumo de carbohidratos en función del tiempo. La glucosa y sacarosa se determinaron usando HPLC-RID, ya que la glucosa cuenta con un gran potencial reductor y la sacarosa no cuenta con radicales reductores para ser cuantificada por método de DNS, en el caso de los FOS y de la agavina no fue posible la cuantificación mediante esta técnica pues no se cuentan con los estándares suficientes para realizar una curva patrón apropiada, por lo que se optó por usar el reactivo de DNS para cuantificar azúcares reductores en el medio de cultivo.

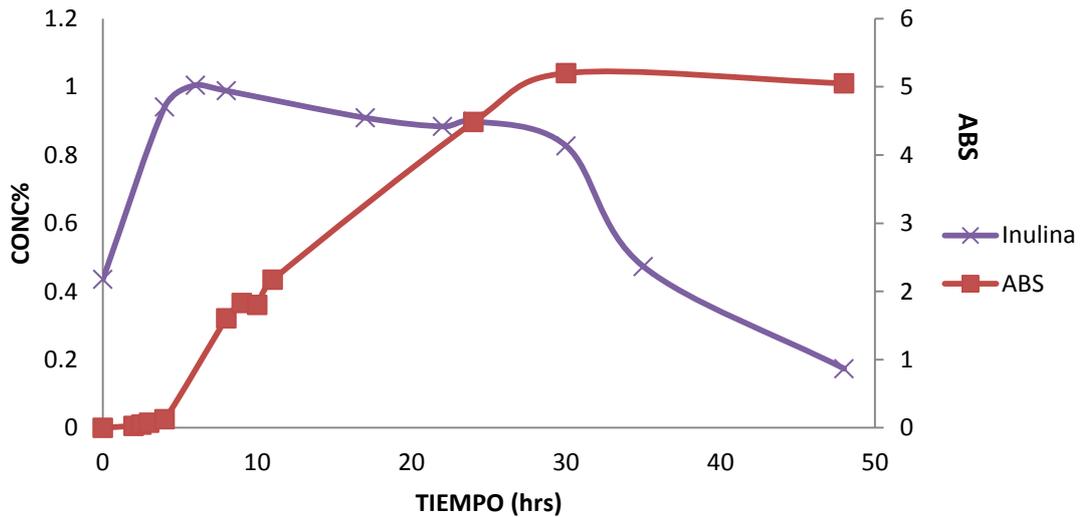
El crecimiento de *Bacillus* sp. en el medio con agavina al 0.5% no presenta un comportamiento esperado, es decir, la fase exponencial se interrumpe por una segunda fase de latencia durante las primeras 10 horas del ensayo (gráfica 1), considerando que la agavina es una mezcla de fructanos de diferentes tamaños existe la posibilidad de que esta especie de *Bacillus* sp. prefiera el consumo estos compuestos por sobre fructanos de mayor tamaño, ocasionando un estrés o segunda fase de latencia que desencadena la hidrólisis enzimática de moléculas ramificadas como es el caso de la agavina. Sin embargo, se observa que desde las primeras horas de cultivo, la cantidad de azúcares reductores se incrementa debido a la hidrólisis de agavina en cadenas más cortas. Se ha reportado, por ejemplo, que *Bacillus polymyxa* posee exo-inulinasas, las cuales están reguladas por el gen *INU* compuesto por 1455 nucleótidos (Kwon *et al.*, 2003) y que puede estar presente en otras especies del género *Bacillus* sp. como la del presente estudio. Estas enzimas al tener acción por los bordes de las cadenas de fructanos, liberan únicamente fructosa y glucosa disponibles en el medio, dificultando su acción por la

ramificación propia de la agavina, asimismo se observa que la curva de crecimiento llega a la fase estacionaria en proporción al descenso de la cantidad de azúcares disponibles en el medio.



Gráfica 1. Curva de consumo de carbohidratos ■ Inulina y desarrollo de crecimiento de *Bacillus* sp. ◆ ABS en medio con agavina a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL (los experimento se hicieron por duplicado).

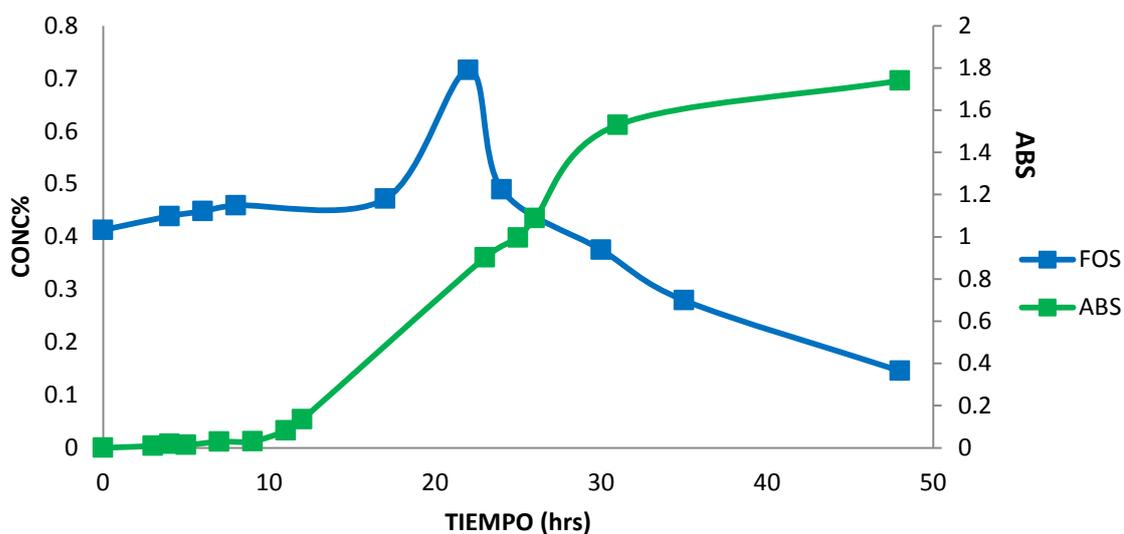
El desarrollo de *Kluyveromyces marxianus* (Gráfica 2) es más rápido y constante a 38°C que *Bacillus* sp., el medio suplementado con 0.5% de agavina muestra un aumento de azúcares reductores en las primeras horas de ensayo debido a la degradación del fructano ramificado de agave. Esta degradación se mantiene hasta las 30 horas, alcanzando también la fase estacionaria de crecimiento (Gráfica 2). Se ha reportado que algunas cepas de *Kluyveromyces marxianus* producen tanto exo- como endo-inulinasas y que además tienen localización intracelular (Wei *et al.*, 1998) y el gen encargado de regular estas enzimas, INU1, tiene un tamaño de 1,551 pares de bases, con lo cual podemos explicar el crecimiento constante de esta cepa en la agavina ramificada a comparación de *Bacillus* sp. pues al contar con actividad endoinulítica se obtiene una mayor área de corte para las enzimas exoinulíticas y mayor aprovechamiento de azúcares de cadenas cortas y fructosa como carbohidratos disponibles en el medio.



Gráfica 2. Curva de consumo de carbohidratos \times Inulina y desarrollo de crecimiento de *K. marxianus* \blacksquare ABS en medio con agavina a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL

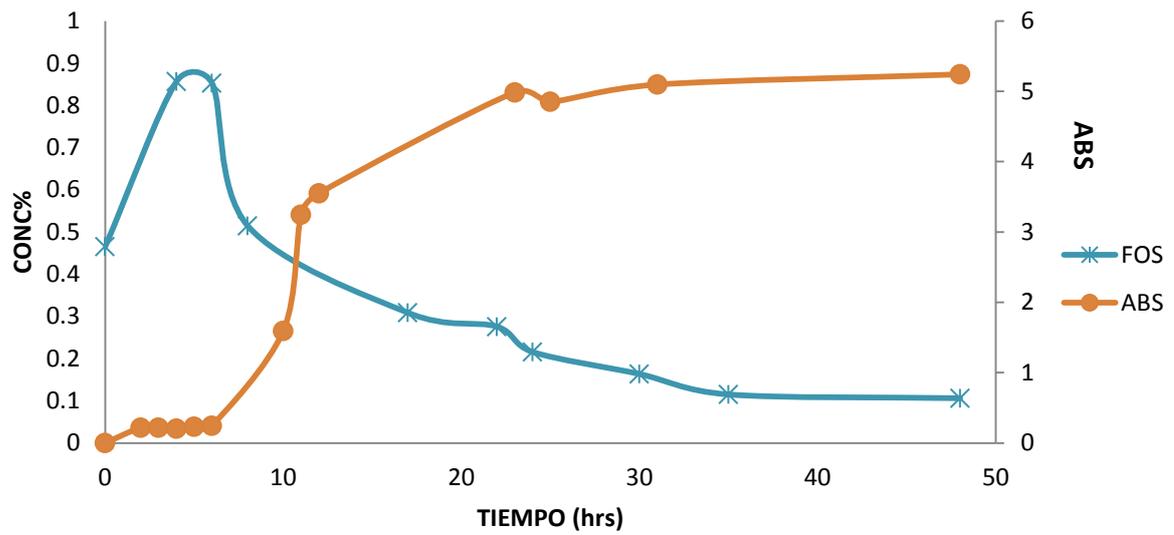
Los ensayos de crecimiento usando como fuente de carbono fructooligosacáridos al 0.5% en el medio de cultivo se muestran en la gráfica 3 en la que se observa que *Bacillus* sp. muestra una fase de latencia prolongada pues la fase exponencial es constante y comienza aproximadamente a las 10 h. de ensayo. Asimismo, la hidrólisis de los FOS permanece durante las primeras 20 horas de ensayo. Los FOS son polímeros que cuentan con enlaces β -2,1 entre moléculas de fructosa con una molécula de glucosa terminal o inicial, por lo que la hidrólisis es llevada por β - fructofuranosidasas, en otras especies como *L. acidophilus*, *B. breve* y *L. paracasei* los genes involucrados en el metabolismo de los FOS son inducidos por mezclas de diferentes grados de polimerización GF2, GF3 y GF4, con represión en presencia de glucosa. (Ryan *et al.*, 2005). Actualmente se sabe que existe el locus *fos*, compuesto por 6 genes organizados por un operón que codifica para un transportador de azúcar y para las enzimas implicadas en el metabolismo de este tipo de fructanos (Porcheron *et al.*, 2011). Ha sido demostrado que la expresión de estos genes involucrados en el metabolismo de los FOS se ha encontrado en *L. acidophilus*, *B. breve* y *L. paracasei* y han sido inducidos generalmente con una mezcla de GF2, GF3 y GF4.

Los FOS empleados para la preparación del medio de cultivo son una mezcla comercial por lo que contiene moléculas de glucosa, y puede presentarse esta represión del gen *fos* lo que explicaría el retraso del crecimiento y producción de las enzimas necesarias para obtener fructosa como fuente de carbono.



Gráfica 3. Curva de consumo de carbohidratos—■—FOS y desarrollo de crecimiento de *Bacillus* sp. —■—ABS en medio con fructooligosacáridos a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL

La tendencia de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* a 38°C se muestra en la gráfica 4 y se puede observar que es más acelerada que *Bacillus* sp. (gráfica 3), la fase exponencial tiene una pendiente muy prolongada, por lo que llega a la fase estacionaria aproximadamente a las 24 h de ensayo, de igual manera, el consumo de carbohidratos es acelerado, pues en las primeras horas se muestra que la ruptura de los enlaces β -2,1 de los fructooligosacáridos da lugar a una gran cantidad de azúcares reductores disponibles como fuente de carbono en el medio de cultivo, de los cuales, aproximadamente a las 35 h., prácticamente han sido consumidos. Algunas de las enzimas que producen diferentes cepas de *Kluyveromyces marxianus* se listan en la tabla 4 (Fonseca *et al.*, 2008) entre las que se encuentran enzimas potencialmente degradadoras de cadenas lineales de fructanos como la inulinasa.

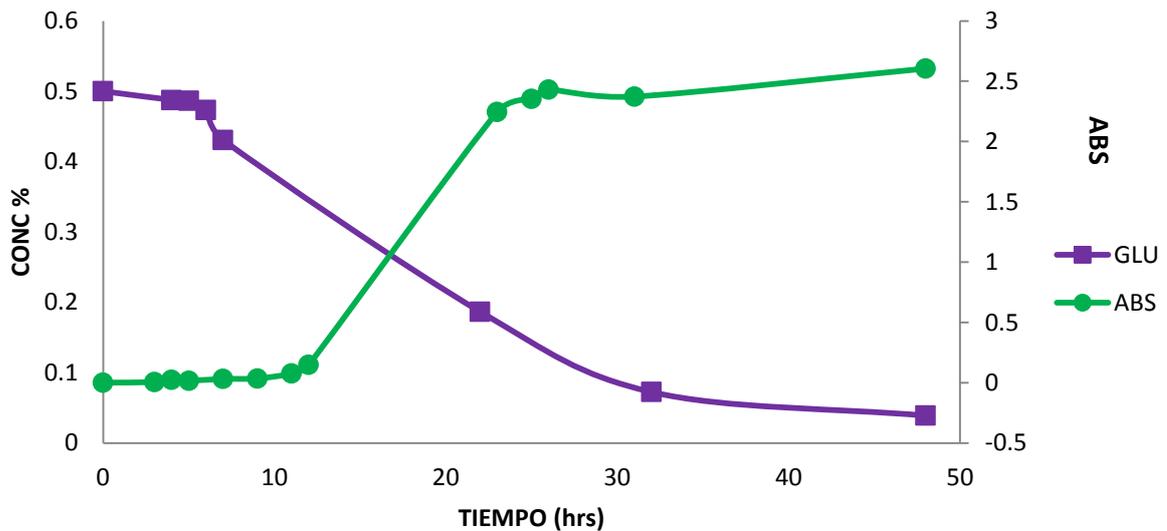


Gráfica 4. Curva de consumo de carbohidratos \ast FOS y desarrollo de crecimiento de *K. marxianus* \bullet ABS en medio con fructooligosacáridos a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL

Enzima	Aplicación	Cepa	
Inulinasa	Producción de jarabe de fructosa a partir de fuentes ricas en contenido de inulina.	<i>K. fragilis</i> ATCC 12424; <i>K. marxianus</i> CBS 6397, CBS 6556	(Workman y Day 1984); (Rouwenhorst <i>et al.</i> 1988, 1990a,b)
β-galactosidasa	Reducción del contenido de lactosa en alimentos	<i>K. fragilis</i> (several strains); <i>K. marxianus</i> NCYC 111; <i>K. marxianus</i> ATCC 10022; <i>K. marxianus</i> IMB3; <i>K. marxianus</i> CBS 6556	(Mahoney <i>et al.</i> 1975); (Gonçalves y Castillo 1982); (Bacci Júnior <i>et al.</i> 1996); (Brady <i>et al.</i> 1995); (Martins <i>et al.</i> 2002)
β-glucosidasa	Hidrólisis de materiales celulósicos.	<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	(Raynal y Guerineau 1984); (Leclerc <i>et al.</i> 1987)
Endopoligalacturonasas	Reduce la viscosidad de productos procesados de fruta	<i>K. marxianus</i> CCT 3172; CCT 3172 (<i>overproducing mutant</i>); <i>an unidentified NCYC isolate</i>	(Jia y Wheals 2000)
Protein fosfatasas	Modificación de las cualidades de las caseínas en la fabricación del queso	<i>K. marxianus</i> (cepa no indicada)	(Jolivet <i>et al.</i> 2001)
Carboxipeptidasas	Reduce el sabor amargo de los alimentos que contienen proteínas.	<i>K. marxianus</i> (no identificada)	(Ramírez-Zavala <i>et al.</i> 2004b)
Aminopeptidasas	Procesamiento directo o evitar el envejecimiento de productos lácteos y cárnicos	<i>K. marxianus</i> (no identificada)	(Ramírez-Zavala <i>et al.</i> 2004a)

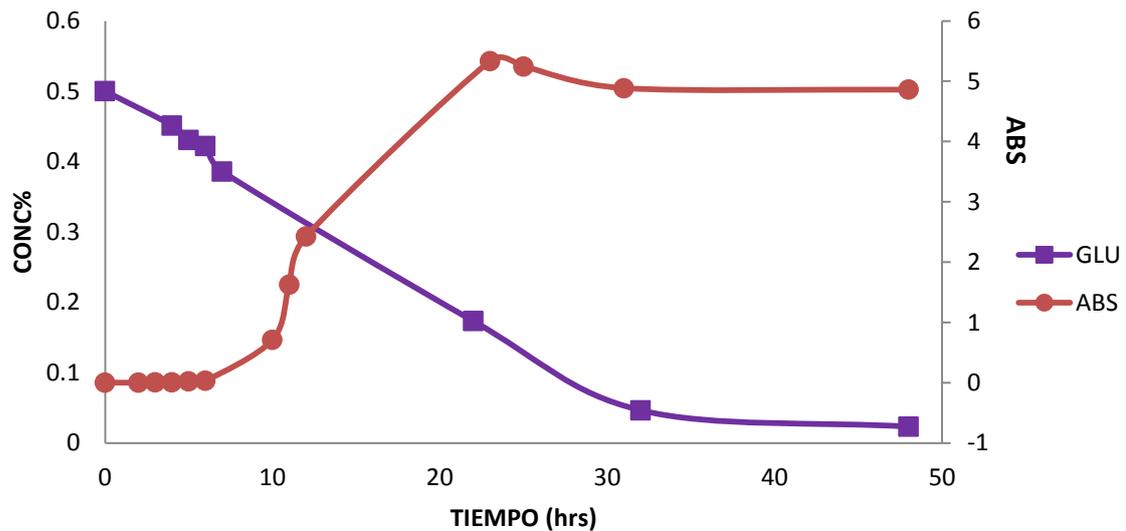
Tabla 4. Bioquímica de las enzimas de interés industrial encontradas en diferentes cepas de *K. marxianus*

Para carbohidratos más simples y de fácil aprovechamiento como glucosa, no hay dificultades observables para que los microorganismos *Bacillus* sp. (Gráfica 5) y *Kluyveromyces marxianus* (Gráfica 6) se desarrollen llegando a una fase estacionaria a aproximadamente a las 20 h. de ensayo. Al tratarse de un monosacárido, es posible que no pueda inducir la producción de enzimas debido a la ausencia de enlaces β -2,1 y β -2,6 glucosídicos, aunado a esto, se sabe que hay represión por glucosa como sustrato en el locus *fos* de *E. coli* (Porcheron *et al.*, 2011) y el mecanismo puede ser similar en nuestras cepas de estudio.



Gráfica 5. Curva de consumo de carbohidratos —■— GLU y desarrollo de crecimiento de *Bacillus* sp. —●— ABS en medio con glucosa a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL

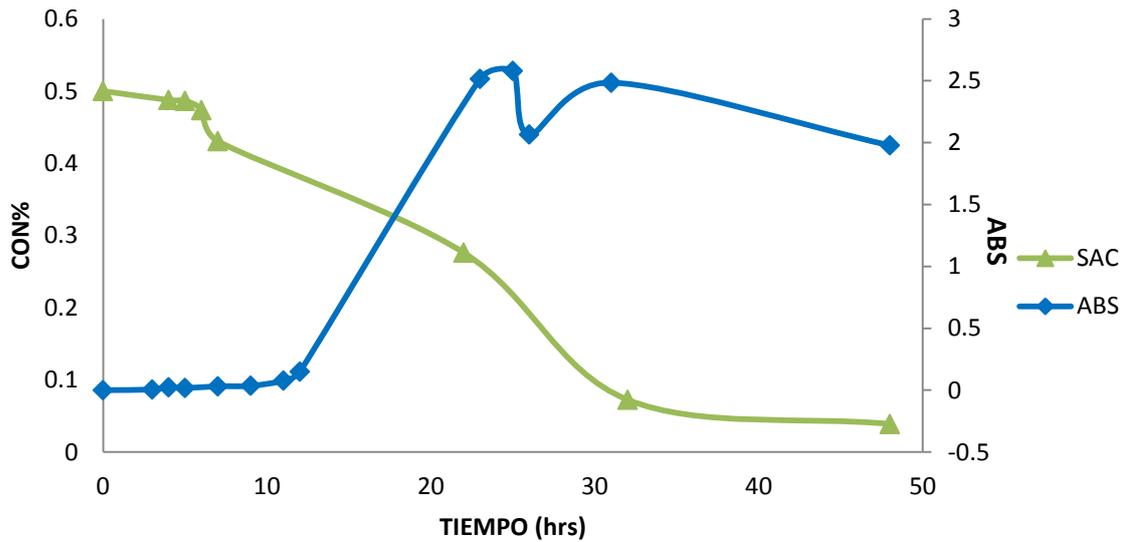
En las observaciones microscópicas de las cepas en estudio, *Bacillus* sp. es un microorganismo de un menor tamaño que *Kluyveromyces marxianus*, razón por la cual, la densidad óptica en los ensayos de crecimiento de la levadura y lecturas de absorbancia son mayores, visto de otro modo se genera una mayor cantidad de biomasa. La biomasa proveniente de microorganismos es una excelente fuente de nutrientes como proteínas, ácidos grasos, vitaminas, minerales, etc., que puede tener aplicaciones como suplemento proteico en alimentación animal, además, se ha investigado su utilización en la fabricación de ingredientes funcionales, suplementos proteicos, para resaltar el sabor de los procesados, entre otros (Michel *et al.* 2013). Este proceso de producción de proteína es una vía biotecnológica adecuada para el aprovechamiento de desechos industriales ricos en carbohidratos. De hecho, el principal factor limitante es el alto costo de las fuentes de carbono, por lo que el uso de subproductos es ideal (Rica *et al.*, 2006) como en el caso de las hojas de agave que contienen inulina (agavina).



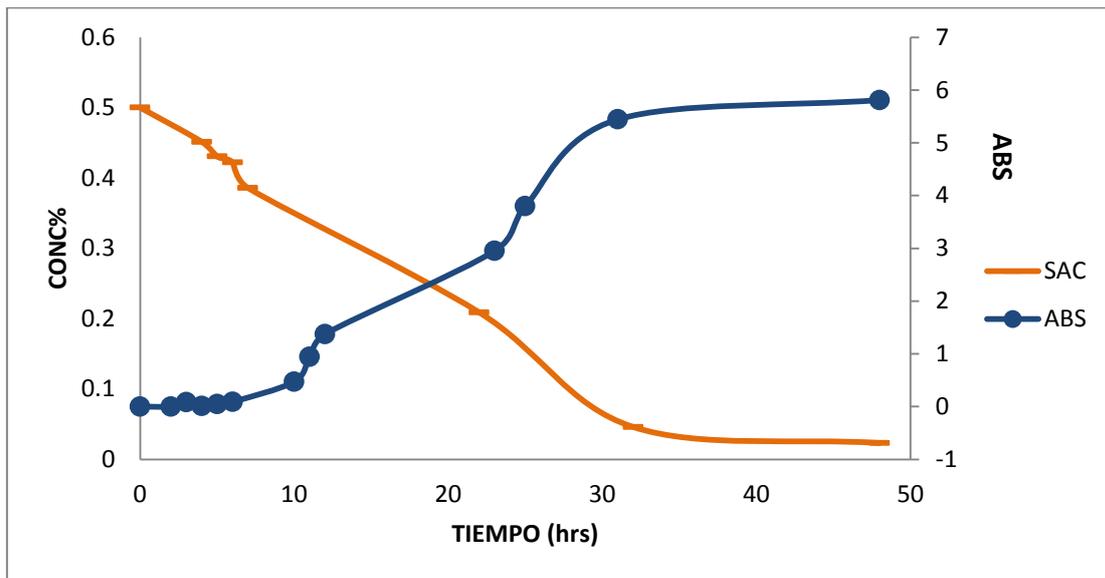
Gráfica 6. Curva de consumo de carbohidratos—GLU— y desarrollo de crecimiento de *K. marxianus*—ABS— en medio con glucosa a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL

Se conoce bastante respecto al crecimiento de levaduras en medios ricos en azúcares, en donde los niveles de oxígeno disuelto y de azúcares regulan el metabolismo celular, de manera que se produce exclusivamente masa celular y dióxido de carbono, o en caso contrario, podemos minimizar la producción de biomasa y favorecer la producción de metabolitos y enzimas de interés.

Un disacárido como la sacarosa también fue usado como fuente de carbono para determinar el crecimiento de los microorganismos en estudio, observamos que ambas cepas se desarrollan de una manera similar durante 25 horas, sin embargo el comportamiento es diferente después de este periodo, ya que *Bacillus* sp. (Gráfica 7) comienza con un descenso en la curva de crecimiento mientras que *Kluyveromyces marxianus* (Gráfica 8) se mantiene en su fase estacionaria de crecimiento.



Gráfica 7. Curva de consumo de carbohidratos SAC y desarrollo de crecimiento de *Bacillus sp* ABS en medio con sacarosa a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL



Gráfica 8. Curva de consumo de carbohidratos SAC y desarrollo de crecimiento de *K. marxianus* ABS en medio con sacarosa a 38°C, 150 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL

Las bacterias tienen la ventaja sobre las levaduras de tener una mayor rapidez de generación celular y adaptabilidad a diferentes condiciones y modos de

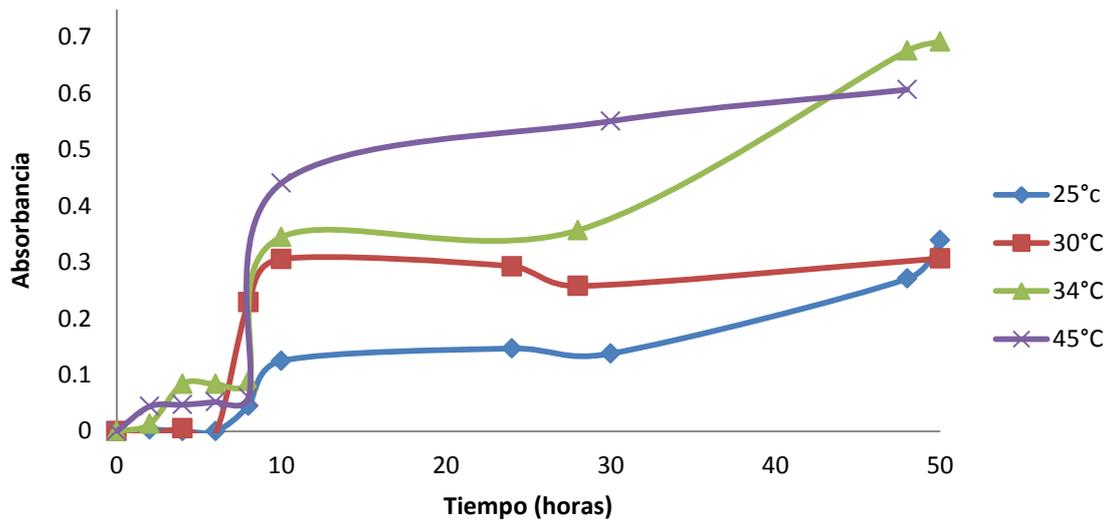
cultivo, sin embargo la tendencia sobre el estudio de las cepas de *Kluyveromyces marxianus* ha ido en aumento (Calderón *et al.* 2010), además de ser la inulinasa una enzima nativa de esta levadura, es especialmente adecuada para la aplicación industrial, por tener una mejor rapidez de crecimiento que cualquier otro microbio eucarionte, termotolerante, generalmente con habilidad para crecer sobre los 52°C, también cuenta con la capacidad para asimilar un amplio intervalo de azúcares, como la lactosa e inulina y tiene una alta capacidad secretoria de enzimas líticas lo que hacen de este microorganismo un líder de entre todas las levaduras para muchos procesos biotecnológicos. Las cepas más usadas con fines alimentarios y biotecnológicos tienen el *status* de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) en los Estados Unidos y en la Unión Europea respectivamente. (Lane *et al.* 2011).

6.4. Desarrollo de cepas en estudio a diferentes temperaturas.

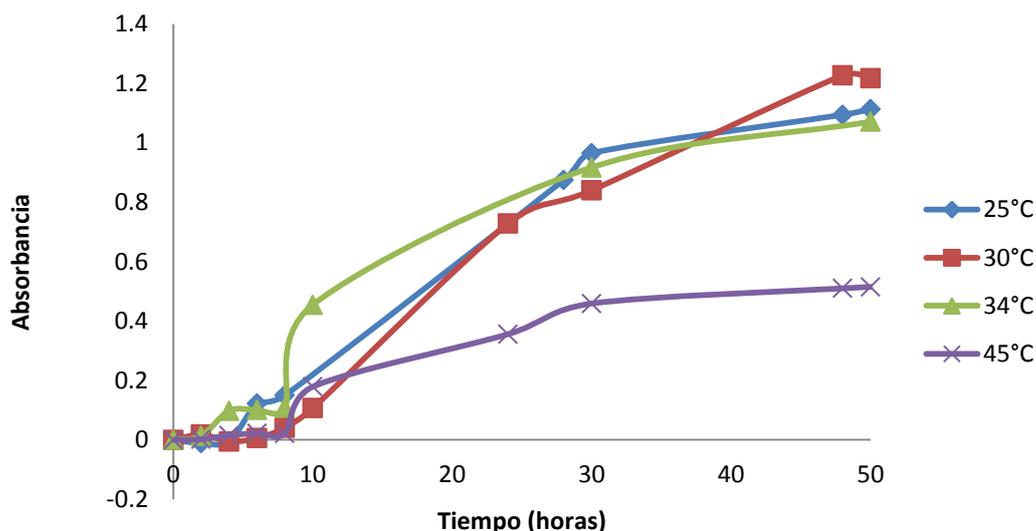
También se evaluó el crecimiento de ambos microorganismos a temperaturas de 25, 30, 34 y 45 °C en un medio suplementado con agavina como única fuente de carbono. Se observa en la gráfica 9 que *Bacillus* sp. tiene un mejor crecimiento cuando se incrementa la temperatura a 45°C, sin embargo, a una temperatura cercana a 25°C hay desarrollo con lo que podríamos bien realizar ensayos a condiciones ambientales. Las dos especies de *Bacillus* con las que coincide el DNA secuenciado, tienen reportadas temperaturas óptimas de crecimiento entre 30 y 40°C para el caso de *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest *et al.* 1987), sin crecimiento por debajo de los 15°C y por arriba de los 50°C, para el caso de *Bacillus methylophilicus* el crecimiento es de 25 a 40°C (28°C óptimo) (Madhaiyan *et al.* 2010) por lo que bien podemos utilizar una temperatura de 45°C para futuros ensayos.

Kluyveromyces marxianus es una levadura termófila, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 45 y 50°C (Calderón *et al.* 2010), en la gráfica 10 se muestra un buen desarrollo desde los 25 hasta los 34°C, sin embargo, para los 45°C no hay un buen crecimiento reportado (Guiraud *et al.*, 1981). Se sabe que la variación de la velocidad de agitación no sólo afecta la disponibilidad de

oxígeno, si no también ejerce influencia sobre la disponibilidad de otros nutrientes en el medio. Por tanto la aireación y agitación son factores críticos para *K. marxianus*, que son responsables de la viabilidad y producción enzimática. En el laboratorio los factores que pueden afectar el crecimiento pueden provenir de una mala calibración de la temperatura de las incubadoras, o velocidad de agitación de los matraces.



Gráfica 9. Desarrollo de crecimiento de *Bacillus* sp. a diferentes temperaturas. 180 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL



Gráfica 10. Desarrollo de crecimiento de *K. marxianus* a diferentes temperaturas. 180 RPM en un volumen de 150 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL

6.5. Ensayos de hidrólisis enzimática

La cromatografía en capa fina o *TLC* por sus siglas en inglés *Thin Layer Chromatography*, es una técnica cualitativa empleada para separar y observar productos de una reacción como la hidrólisis enzimática de la inulina pura o de la agavina pura. La reacción se realizó con 0.5 mL de sobrenadante de medio de cultivo con agavina de 48 h., ya que mediante cromatografías en capa fina se observa que para este tiempo se ha consumido casi en su totalidad toda la agavina, se usaron 0.5 mL de amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 suplementado con 0.5% de agavina o inulina pura. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora con agitación de 200 RPM y 38°C con ayuda de un agitador Thermomixer C de Eppendorf. Las placas fueron reveladas con una reacción de oxidación con orcinol al 5% y calentamiento en parrilla a 105°C. Como control se emplearon FOS, agavina y agavina pura, en los ensayos enzimáticos se aprecia que las enzimas del extracto crudo de *Kluyveromyces marxianus* puede degradar tanto la agavina como la inulina pura, produciendo monosacáridos como fructosa o glucosa y algunos productos de mayor tamaño como disacáridos o fructanos de acuerdo con el control de fructooligosacáridos, estas marcas indican que esta cepa puede expresar tanto exo- como endo-

inulinasas, por otro lado, en la elución del extracto crudo de *Bacillus* sp. la placa revela que sólo se presenta un producto como un monosacárido a partir de la hidrólisis para la agavina y la inulina pura y por ende se infiere que sólo se producen exo-inulinasas (Figura 10). Es importante recordar que la agavina es un fructano ramificado, y que este hecho dificulta la hidrólisis enzimática por cualquier microorganismo, por lo que éste debe contar con enzimas muy especializadas como exo- y endo- inulinasas para actuar sobre los enlaces β -2,1 y β -2,6 glucosídicos.

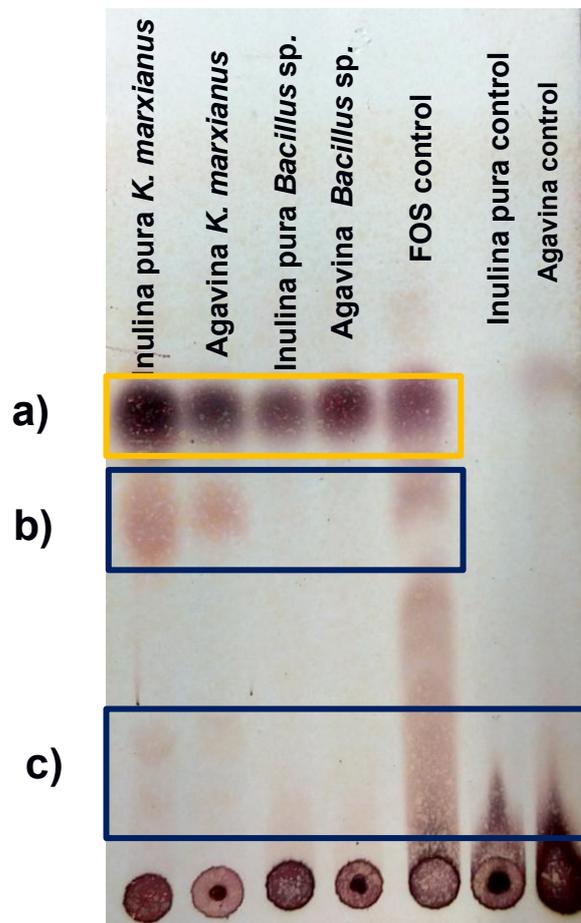
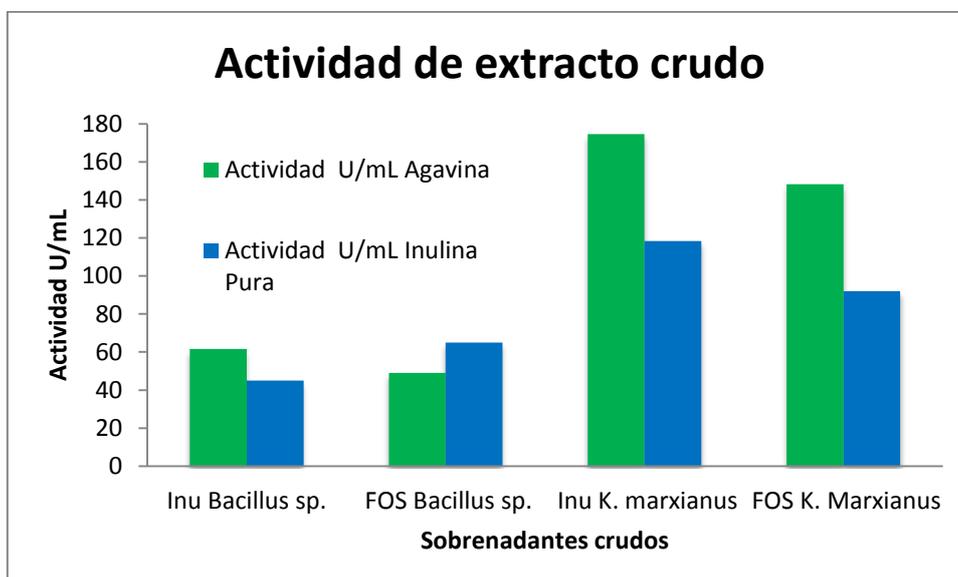


Figura 10. Cromatopla de las reacciones de hidrólisis enzimática de la inulina pura y la agavina con extracto crudo de *Bacillus* sp. y *K. marxianus*

- a) Glucosa y fructosa
- b) Fructooligosacáridos.
- c) Agavinas

Reacción realizada a 38°C durante 1 hora a 200 RPM. Elución con etanol, butanol y agua 5:3:1. Revelado con orcinol al 5% y calentamiento en parrilla.

Después de elaborar el análisis por cromatoplasmas, se realizó la cuantificación de azúcares reductores mediante DNS para conocer la actividad enzimática aproximada del extracto crudo, estos ensayos fueron realizados partir de medios de cultivo suplementados con FOS y con agavina sobre medios de reacción con agavina y con inulina pura, con base en estos resultados observamos que *K. marxianus* presenta una mayor actividad en la hidrólisis de agavina e inulina pura que *Bacillus* sp. (Gráfica 11). Sin embargo, la actividad de estas enzimas se ve influenciada por los procesos de purificación aumentando o disminuyendo su actividad específica por lo que las actividades específicas reportadas en la literatura podrían ser diferentes (Lertwattanasakul et al. 2013; Singh y Singh, 2010). Una de las aplicaciones de estas enzimas parcial o totalmente purificadas es la producción de jarabe de fructosa de alta densidad (Nguyen et al., 2011; Pimpakan et al., 2012). Por lo que las enzimas de interés para purificar y estudiar podrían provenir de ambas cepas (*K. marxianus* y *Bacillus* sp.).



Gráfica 11. Actividades enzimáticas de los extractos crudos de los microorganismos en estudio. Reacción llevada a cabo en tubos microfuga con un volumen total de 1 mL a 38°C durante 1 hora a 200 RPM.

6.6. Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Finalmente, se realizó un análisis cualitativo para conocer si algunos carbohidratos como glucosa, sacarosa, fructooligosacáridos y agavina tienen la capacidad de inducir la producción de enzimas inulíticas. Este ensayo se llevó a cabo con 800 μL de amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 más 200 μL de sobrenadante proveniente de los medios de cultivo de diferentes carbohidratos, se incubó a una temperatura de 38°C con agitación de 180 RPM durante 10 minutos. Posteriormente, la reacción se analizó empleando cromatografía de líquidos de alta resolución o HPLC por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*, con un gradiente de acetonitrilo: agua 75:25 y un detector de dispersión de luz. Los cromatogramas correspondientes al extracto crudo de ambos microorganismos en estudio se muestran a continuación:



Figura 11. Cromatogramas de los ensayos enzimáticos.

a) Referencia de fructosa

b) *Ensayo enzimático con extracto crudo de Bacillus sp. inducido con fructooligosacáridos.*

c) *Referencia de agavina*

Así mismo, se inyectaron al cromatógrafo referencias de fructosa y agavina con tiempo de retención a los 8 y 24 minutos respectivamente, el objetivo es observar si se presenta degradación de este fructano en los ensayos; en la figura 11 se observó que la inducción con fructooligosacáridos sobre *Bacillus sp.* no expresó enzimas que pudieran degradar la agavina, así como tampoco el uso de sacarosa y glucosa (figura 12). Como se mencionó anteriormente, el uso de glucosa en el medio de cultivo puede reprimir la expresión del *locus fos* (Porcheron *et al.* 2011) en ciertas especies de *Bacillus sp.* por lo que se piensa que el mismo mecanismo de represión puede afectar a nuestra cepa en estudio y no inducir la producción de cepas degradadoras de agavina. Sin embargo, cuando usamos agavina como fuente de carbohidratos si existe una señal de fructosa a los 8 minutos, que indica una degradación enzimática del fructano ramificado a este monosacárido.

a)
b)
c)



Figura 12. Cromatogramas de los ensayos enzimáticos. Ensayo enzimático con extracto crudo de Bacillus sp. inducido con:

a) *glucosa*

b) *sacarosa*

c) agavina con degradación a fructosa.

Los cromatogramas de ensayos realizados (Figura 13 y 14) con los extractos crudos de los medios de *K. marxianus* muestran que usando glucosa, sacarosa, FOS y agavina como inductores, hay señales con tiempo de retención de 8 minutos, es decir que hubo producción de enzimas que rompen los enlaces fructosil-glucosídicos de la agavina y la convirtieron en fructosa. Este hecho indica que podemos usar tanto glucosa como sacarosa para inducir la producción de estas enzimas pues son sustratos más baratos y de fácil obtención que la agavina comercial o una mezcla de fructooligosacáridos.

a)

b)

c)

Figura 13. Cromatogramas de los ensayos enzimáticos.

a) Referencia de fructosa

*b) Ensayo enzimático con extracto crudo de *K. marxianus* inducido con fructooligosacáridos.*

c) Referencia de agavina

Al parecer no se presentó represión en el metabolismo de regulación enzimática de *K. marxianus* usando estos carbohidratos como sustrato, en el caso de *Bacillus* sp. es posible que si exista represión en la expresión de estas enzimas como en el caso de *E. coli* (Ryan *et al.* 2005) en el que la glucosa actúa como inhibidor.

Figura 14. Cromatogramas de los ensayos enzimáticos. Ensayo enzimático con extracto crudo de K. marxianus inducido con:

- a) glucosa y presencia de fructosa*
- b) sacarosa con presencia de fructosa*
- c) agavina con degradación a fructosa.*

7. Conclusiones.

Los microorganismos seleccionados son capaces de degradar agavina como única fuente de carbono y se caracterizaron morfológicamente mediante observaciones macro y microscópicas, así como genotípicamente mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) empleando los primers o cebadores de las regiones ITS para el caso de la levadura *Kluyveromyces marxianus* y la región 16s ribosomal para identificar a *Bacillus* sp.

Los microorganismos de estudio tienen la capacidad de crecer a temperaturas de 25 y 45 °C según los ensayos realizados, consumiendo la agavina casi en su totalidad después de 48 h. Con base en lo observado por TLC's, únicamente *K. marxianus* tiene la capacidad de producir exo- y endo- inulinasas, induciendo la producción de estas enzimas con glucosa, sacarosa, FOS y agavina, obteniendo actividades de hasta 180 U/mL a partir del extracto crudo proveniente de medio con agavina a diferencia de una actividad de 150 U/mL cuando se usa como sustrato inulina pura en medio de reacción, lo cual indica que con agavina como sustrato se obtiene un mayor rendimiento en la actividad enzimática. Además de esto *K. marxianus* desarrolla crecimiento rápidamente a temperaturas de 25° a 38°C y tiene la capacidad de generar una gran cantidad de biomasa, lo que la convierte en un microorganismo con potencial biotecnológico para la fabricación de productos alimenticios prebióticos con alto contenido de fructosa y fructooligosacáridos.

Bacillus sp. sólo muestra actividad exo-inulítica con enzimas extracelulares y esta se induce usando agavina como única fuente de carbohidratos en el medio de cultivo, es posible que la represión en la expresión enzimática se presente cuando se usa glucosa como sustrato, por lo que no se observó actividad usando este monosacárido. Se obtuvo una actividad de 61 U/mL a partir del extracto crudo de *Bacillus* sp. menor que la que se obtuvo con *K. marxianus*, de aproximadamente 170 U/mL, no obstante, hay que recalcar que estos resultados pueden verse afectados por procesos de purificación, aumentando o disminuyendo los rendimientos, asimismo no se obtuvo gran cantidad de biomasa en los ensayos y por estos resultados *Bacillus* sp. no parece a simple vista un microorganismo con gran potencial para aplicaciones

industriales, no obstante, durante los ensayos de crecimiento se observó el desarrollo de una biopelícula en el medio de cultivo, de la cual se puede realizar un estudio más amplio con posibles aplicaciones biotecnológicas y aún resta por estudiar si estas cepas de *Bacillus* sp. y *K. marxianus* pueden expresar enzimas de membrana inulíticas.

8. Referencias.

- A. Geoffrey, H. Lea, J. H. Piggott and J. R. Piggott. 2003. "Fermented Beverage Production." In *Fermented Beverage Production*, Springer eBooks, 356.
- Ahmad, Iqbal, Farah Ahmad, and John Pichtel. 2011. "Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications." *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*: 1–516.
- Bacci Júnior M, Siqueira CG, Antoniazzi SA, Ueta J (1996) Location of the b-galactosidase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 10022. *Antonie van Leeuwenhoek* 69:357–361
- Bosscher, Douwina. 2009. "6 Fructan Prebiotics Derived from Inulin."
- Brady D, Marchant R, McHale L, McHale AP (1995) Isolation and partial characterization of b-galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme Microb Technol* 17: 696–699
- Calderón, Augusto Castillo, and Rolando Chamy Maggi. 2010. "Scientia Agropecuaria Inulinase Production by Yeast *Kluyveromyces Marxianus*." *Scientia Agropecuaria* 1: 235–45.
- Chi, Zhen Ming et al. 2011. "Biotechnological Potential of Inulin for Bioprocesses." *Bioresource Technology* 102(6): 4295–4303.
- Dilipkumar, M, M Rajasimman, and N Rajamohan. 2014. "Utilization of Copra Waste for the Solid State Fermentative Production of Inulinase in Batch and Packed Bed Reactors." *Carbohydrate polymers* 102: 662–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507333> (October 20, 2014).
- Dinarvand, Mojdeh et al. 2012. "Effect of Extrinsic and Intrinsic Parameters on Inulinase Production by *Aspergillus Niger* ATCC 20611." *Electronic Journal of Biotechnology* 15(4): 1–11. <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/941> (October 20, 2014).
- Fonseca, Gustavo Graciano, Elmar Heinzle, Christoph Wittmann, and Andreas K. Gombert. 2008. "The Yeast *Kluyveromyces Marxianus* and Its Biotechnological Potential." *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 339–54.
- Franck, a. 2002. "Technological Functionality of Inulin and Oligofructose." *The British journal of nutrition* 87 Suppl 2: S287–91.
- Gibson, Glenn R. 1999. "Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using the Prebiotics Oligofructose and Inulin 1." *Journal of Nutrition*: 1438–41.
- Gonçalves JA, Castillo FJ (1982) Partial Purification and characterization of b-D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *J Dairy Sci* 65:2088–2094
- Guiraud, J P, T Deville-Duc, and P Galzy. 1981. "Selection of Yeast Strains for Ethanol Production from Inulin." *Folia microbiologica* 26: 147–50.
- Hierro, N, a González, a Mas, and J M Guillamón. 2004. "New PCR-Based Methods for Yeast Identification." *Journal of applied microbiology* 97(4): 792–801. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357729> (October 23, 2014).

- Jenkins, David J a, Cyril W C Kendall, and Vladimir Vuksan. 1999. "Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Inulin , Oligofructose and Intestinal Function 1." : 1431–33.
- Jia J, Wheals A (2000) Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Curr Genet* 38:264–270
- Jolivet P, Bergeron E, Benyair H, Meunier JC (2001) Characterization of major protein phosphatases from selected species of *Kluyveromyces*. Comparison with protein phosphatases from *Yarrowia lipolytica*. *Can J Microbiol* 47:861–870
- Kagaku, Denpun. 1991. "Synthesis of Fructan Plant and Oligosaccharides Erased by Microbial and Fructosyltransf Solubilization of Enzymes from Bacterial Cells . Harvested Cells Were Washed with Sterile Tap Water Several Times and Washed Cells Were Suspended in 5 Parts of 0 . 01." 38(2).
- Kolida, S., K. Tuohy, and G. R. Gibson. 2007. "Prebiotic Effects of Inulin and Oligofructose." *British Journal of Nutrition* 87(S2): S193. http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114502000958 (August 26, 2014).
- Kwon, Hyun-ju et al. 2003. "Cloning and Characterization of an Exoinulinase from *Bacillus Polymyxa*." : 155–59.
- Laloux, Olivier, Jean Delco, Jozef Van Beeumen, and Jean Vandenhoute. 1991. "Cloning and Sequencing of the Inulinase Gene of *Khyveromyces Var . Marxianus* ATCC 12424." 289(1): 0–4.
- Lane, Melanie M. et al. 2011. "Physiological and Metabolic Diversity in the Yeast *Kluyveromyces Marxianus*." *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 100(4): 507–19.
- Leclerc M, Chemardin P, Arnaud A, Ratomahenina R, Galzy P, Gerbaud C, Raynal A, Guérineau M (1987) Comparison of the properties of the purified beta-glucosidase from the transformed strain of *Saccharomyces cerevisiae* TYKF2 with that of the donor strain *Kluyveromyces fragilis* Y610. *Biotechnol Appl Biochem* 9:410–422
- Lertwattanasakul, Noppon et al. 2013. "Essentiality of Respiratory Activity for Pentose Utilization in Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces Marxianus* DMKU 3-1042." *Antonie van Leeuwenhoek* 103(4): 933–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23338601> (October 26, 2014).
- Li, Jing et al. 2013. "Determination of Fructooligosaccharides in Burdock Using HPLC and Microwave-Assisted Extraction." *Journal of agricultural and food chemistry* 61(24): 5888–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23745967>.
- Liu, Xiao Yan et al. 2010. "Inulin Hydrolysis and Citric Acid Production from Inulin Using the Surface-Engineered *Yarrowia Lipolytica* Displaying Inulinase." *Metabolic Engineering* 12: 469–76.
- Madhaiyan, Munusamy, Selvaraj Poonguzhali, Soon Wo Kwon, and Tong Min Sa. 2010. "*Bacillus Methylophilus* Sp. Nov., a Methanol-Utilizing, Plant-Growth-Promoting Bacterium Isolated from Rice Rhizosphere Soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2490–95.

- Mahoney RR, Nickerson TA, Whitaker JR (1975) Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J Dairy Sci* 58:1620–1629
- Manter, Daniel K, and Jorge M Vivanco. 2007. "Use of the ITS Primers, ITS1F and ITS4, to Characterize Fungal Abundance and Diversity in Mixed-Template Samples by qPCR and Length Heterogeneity Analysis." *Journal of microbiological methods* 71(1): 7–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17683818> (October 14, 2014).
- Martins DB, de Souza CG Jr, Simões DA, de Moraes MA Jr (2002) The b-galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. *Curr Microbiol* 44:379–382
- Mellado-Mojica, Erika, and Mercedes Gpe López-Pérez. 2013. "Análisis Comparativo Entre Jarabe de Agave Azul (agave Tequilana Weber Var. Azul) Y Otros Jarabes Naturales." *Agrociencia* 47(3): 233–44.
- Michel, Frederick C. 2013. "Production of Biobutanol from Inulin-Rich Biomass and Industrial Food Processing Wastes."
- Muñoz-Gutiérrez, Iván, María E. Rodríguez-Alegría, and Agustín López Munguía. 2009. "Kinetic Behaviour and Specificity of B-Fructosidases in the Hydrolysis of Plant and Microbial Fructans." *Process Biochemistry* 44(8): 891–98. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511309001342> (March 11, 2015).
- Nguyen, Quang D., Judit M. Rezessy-Szabó, Bálint Czukor, and Ágoston Hoschke. 2011. "Continuous Production of Oligofructose Syrup from Jerusalem Artichoke Juice by Immobilized Endo-Inulinase." *Process Biochemistry* 46(1): 298–303. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511310003399> (October 26, 2014).
- Nonklang, Sanom et al. 2008. "High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces Marxianus* DMKU3-1042." *Applied and environmental microbiology* 74(24): 7514–21. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2607150&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (October 21, 2014).
- Pimpakan, Podchamarn, Wichien Yongmanitchai, and Savitree Limtong. 2012. "Bioethanol Production from Sugar Cane Syrup by Thermo-Tolerant Yeast , *Kluyveromyces Marxianus* DMKU3-1042 , Using Fed-Batch and Repeated-Batch Fermentation in a Nonsterile System." 591: 582–91.
- Porcheron, Gaëlle et al. 2011. "Regulation of Fructooligosaccharide Metabolism in an Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia Coli* Strain." *Molecular Microbiology* 81(June): 717–33.
- Priest, F. G., M. Goodfellow, L. a. Shute, and R. C. W. Berkeley. 1987. "*Bacillus Amyloliquefaciens* Sp. Nov., Nom. Rev." *International Journal of Systematic Bacteriology* 37(17): 69–71.
- Ramirez-Zavala B, Mercado-Flores Y, Hernandez-Rodriguez C, VillaTanaca L (2004a) Purification and characterization of a lysine aminopeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Microbiol Lett* 235:369–375
- Ramirez-Zavala B, Mercado-Flores Y, Hernandez-Rodriguez C, VillaTanaca L (2004b) Purification and characterization of a serine carboxypeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Int J Food Microbiol* 91:245–252

- Raynal A, Guerineau M (1984) Cloning and expression of the structural gene for b-glucosidase of *Kluyveromyces fragilis* in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 195:108–115
- Ricca, Emanuele, Vincenza Calabrò, Stefano Curcio, and Gabriele Iorio. 2009. "Fructose Production by Chicory Inulin Enzymatic Hydrolysis: A Kinetic Study and Reaction Mechanism." *Process Biochemistry* 44(4): 466–70. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951130900021X> (March 11, 2015).
- Rica, Universidad De Costa et al. 2006. "Selección de Una Levadura Para La Producción de Biomasa: Crecimiento En Suero de Queso." *Agronomía Mesoamericana* 17: 151–60
- Rodicio, María del Rosario; Mendoza, María del Carmen; Identificación bacteriana mediante secuenciación del RNAr15s: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. 2004. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, ISSN 0213-005X, Vol. 22, N° 4, 2004, pags. 238-245
- Rouwenhorst RJ, Visser LE, van der Baan AA, Scheffers WA, van Dijken JP (1988) Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl Environ Microbiol* 54:1131–1137
- Rouwenhorst RJ, Hensing M, Verbakel J, Scheffers WA, van Dijken JP (1990a) Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl Environ Microbiol* 56:3337–3345
- Rouwenhorst RJ, Ritmeester WS, Scheffers WA, van Dijken JP (1990b) Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. *Appl Environ Microbiol* 56:3329–3336
- Singh, Ram S., and Rupinder P. Singh. 2010. "Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential." *Food Technology and Biotechnology* 48: 435–50.
- Tanaka, Toshio, Susumu Oi, Masaru Iizuka, and Takehiko Yamamoto. 2014. "Agricultural and Biological Chemistry_ (1967) ." (April 2015): 37–41.
- Wei, Wenling, Zhonghui Zheng, Yueying Liu, and Xinsheng Zhu. 1998. "Optimizing the Culture Conditions for Higher Inulinase Production by *Kluyveromyces* Sp. Y-85 and Scaling-up Fermentation." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86(4): 395–99. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0922338X99890114>.
- Workman WE, Day DF (1984) The cell wall-associated inulinase of *Kluyveromyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 50: 349–353
- Zhang, Sufang et al. 2012. "High-Level Secretory Expression and Characterization of the Recombinant *Kluyveromyces Marxianus* Inulinase." *Process Biochemistry* 47(1): 151–55. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511311003485> (October 26, 2014).