



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INULINASAS EN
Fusarium sp.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALEXA FERNANDA MIGUEL NAVA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2020





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: Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

VOCAL: Dra. Laura Carmona Salazar

SECRETARIO: Dra. Carmina Montiel Pacheco

1er. SUPLENTE: QFB. Genaro Jimenez Reyes

2do. SUPLENTE: M. en C. Karla Montserrat González Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 314 del Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Alexa Fernanda Miguel Nava

AGRADECIMIENTOS

Por el financiamiento a DGAPA UNAM
Proyecto PAPIIT IN219520
Facultad de Química PAIP 5000-9153 y a la Beca para Titulación
Egresados de Alto Rendimiento, UNAM

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Agave.....	9
1.2. Agaves en la industria tequilera.....	12
1.3. Fructanos.....	13
1.4. Inulina.....	15
1.5. Inulinasas.....	17
1.6. <i>Fusarium</i> sp.....	21
1.7. Importancia de las inulinasas.....	26
2. ANTECEDENTES.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1. Objetivo General.....	30
5.2. Objetivos particulares.....	30
6. METODOLOGÍA.....	31
6.1. Materiales.....	31
6.1.1. Reactivos.....	31
6.1.2. Cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	31
6.2. Crecimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	32
6.3. Verificación de la pureza de las cepas.....	32
6.4. Determinación de la velocidad radial y de crecimiento.....	33
6.5. Determinación de la actividad inulinolítica de las cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	33
6.6. Efecto de la fuente de carbono.....	33
6.7. Efecto de la fuente de nitrógeno.....	34
6.8. Ensayos para la determinación del consumo de carbohidratos, cuantificación de proteína y determinación de la actividad enzimática.....	35
6.8.1. Determinación del consumo de carbohidratos.....	35
6.8.2. Determinación de la actividad enzimática.....	35
6.8.3. Determinación de la cantidad de proteína.....	36

6.9. Efecto del pH sobre la actividad enzimática	36
6.10. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
7.1. Verificación de la pureza de las cepas	38
7.2. Determinación de la velocidad de extensión radial y de crecimiento	40
7.3. Determinación de la actividad inulinolítica de las cepas de <i>Fusarium</i> sp.	41
7.4. Identificación de las cepas de <i>Fusarium</i> sp.	42
7.5. Caracterización de la producción de inulinasas de <i>F. incarnatum</i> cepa CRT-197..	43
7.5.1. Efecto de la fuente de carbono	43
7.5.1.1. Determinación del consumo de carbohidratos	43
7.5.1.2. Determinación de la cantidad de proteína	46
7.5.1.3. Determinación de la actividad enzimática	48
7.5.2. Efecto de la fuente de nitrógeno	50
7.5.2.1. Determinación de la cantidad de proteína	50
7.5.2.2. Determinación de la actividad enzimática	52
7.5.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática	54
7.5.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	56
8. CONCLUSIONES	60
9. PERSPECTIVAS	60
10. REFERENCIAS	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de las plantas del género <i>Agave</i> en México.....	9
Figura 2. Anatomía del <i>Agave</i>	10
Figura 3. Diagrama del metabolismo ácido de las crasuláceas.....	11
Figura 4. Proceso de elaboración del tequila.....	12
Figura 5. Principales estructuras de los fructanos presentes en la naturaleza, producidos por microorganismos y plantas.....	14
Figura 6. Estructura propuesta de los fructanos presentes en <i>A. tequilana</i> Weber variedad azul.....	15
Figura 7. Mecanismo de acción de la inulinasa.....	18
Figura 8. Estructuras características del género <i>Fusarium</i>	22
Figura 9. Características macroscópicas y de cultivo de distintas especies del género <i>Fusarium</i>	23
Figura 10. Escala de gravedad de marchitez del <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul, causada por <i>Fusarium oxysporum</i>	25
Figura 11. Características microscópicas de las cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	38
Figura 12. Macroconidias de la cepa CRT-197 de <i>Fusarium</i> sp.....	40
Figura 13. Actividad inulinolítica de las cepas de <i>Fusarium</i> aisladas del agave.....	42
Figura 14. Efecto de la fuente de carbono sobre el consumo de carbohidratos.....	45
Figura 15. Efecto de la fuente de carbono sobre la cantidad de proteína.....	48
Figura 16. Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad enzimática.....	50
Figura 17. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la cantidad de proteína.....	51
Figura 18. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática.....	53

Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	55
Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Integración de los azúcares reductores totales contenidos en las diferentes fracciones de la planta de <i>A. tequilana</i> Weber var. azul.....	16
Tabla 2. Comparación del GPP y PMP de la inulina obtenida de distintas fuentes potenciales de fructanos.....	17
Tabla 3. Rendimiento de la inulinasa producida por distintos microorganismos.....	20
Tabla 4. Principales enfermedades en cultivos causadas por <i>Fusarium</i> spp.....	24
Tabla 5. Relación de cepas del género <i>Fusarium</i> sp. aisladas de la enfermedad de marchitez del agave.....	28
Tabla 6. Reactivos utilizados.....	31
Tabla 7. Composición del medio de cultivo empleado para el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp.....	32
Tabla 8. Composición del medio de cultivo empleado para el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. con fuentes variadas de carbono.....	34
Tabla 9. Composición del medio de cultivo empleado para el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. con fuentes variadas de nitrógeno.....	34
Tabla 10. Velocidad radial y velocidad de crecimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> aisladas del agave.....	41
Tabla 11. Identificación de las cepas del género <i>Fusarium</i> aisladas del agave.....	43

RESUMEN

La industria tequilera en México ha mostrado, a través de los años, un constante crecimiento tanto en valor como en cantidad de litros producidos. Sin embargo, aunado al proceso de producción de esta bebida alcohólica, se encuentra también la generación de una gran cantidad de residuos de *Agave tequilana* Weber variedad azul. Entre estos residuos se encuentran las hojas de la planta que contienen alrededor del 24% de inulina que puede ser empleada en la obtención de productos de valor agregado en la industria farmacéutica y de alimentos. Desafortunadamente existen muy pocas enzimas capaces de hidrolizar este compuesto ya que es altamente ramificado y las enzimas comerciales no son capaces de degradarlo.

Fusarium sp. es el principal hongo patógeno que afecta al agave azul, pero puede ser una fuente importante de inulinasas especialistas en inulina de agave.

En este trabajo se evaluó la producción de estas enzimas a partir de distintas cepas aisladas de agaves infectados por *Fusarium* sp. Se probaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para evaluar el crecimiento y producción de enzimas, así mismo se evaluó la cantidad de proteínas producidas y la actividad enzimática durante el crecimiento de *Fusarium* sp, determinando que la mejor fuente de carbono y nitrógeno es la inulina de agave y el extracto de levadura, respectivamente. Posterior a esto, se determinaron las mejores condiciones de pH y temperatura bajo las cuales se obtiene la mayor actividad enzimática, estableciendo un pH óptimo de 5.0 y una temperatura óptima de 50°C.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Agave

A los agaves se les conoce comúnmente con el nombre de “maguey” y se distribuyen en América teniendo su límite septentrional desde Dakota del Norte, en Estados Unidos de América, y se extiende a Sudamérica a través de los Andes hasta Bolivia y Paraguay; sin embargo, México es el centro con mayor riqueza y diversidad de agaves en el mundo. El género *Agave* cuenta con alrededor de 273 especies, de las cuales 205 tienen presencia en nuestro territorio, es decir, 75% del total y 151 especies son endémicas, equivalente al 55% (León *et al.*, 2015). Aunado a esto, las plantas del género *Agave* se encuentran distribuidas de forma asimétrica en más de tres cuartas partes del territorio del país. Son muy diversos en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte, pero su número disminuye drásticamente hacia las provincias húmedas y cálidas del sur, por lo que su ausencia es notoria en estados como Tabasco, Campeche y Quintana Roo. Son abundantes en las provincias florísticas de las Serranías Meridionales del centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano mexicano, península de Baja California y Sierra Madre Oriental (Fig. 1). Pero al subdividir México en cuadrantes de un grado de longitud por un grado de latitud, el área de mayor riqueza corresponde a un cuadrante ubicado en la provincia del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, con quince especies. (García, 2007).



Figura 1. Distribución geográfica de las plantas del género *Agave* en México
Tomado de CONABIO, (2005).

Los agaves son plantas xerófitas y perennes, las especies grandes alcanzan su madurez entre los 10 y 25 años, mientras que las especies pequeñas lo hacen después de crecer entre 4 y 5 años. La parte aérea del agave se compone de dos fracciones principales: las hojas y el tallo. Las hojas o “pencas” de estas plantas se encuentran dispuestas en espiral, arregladas en rosetas y de forma lanceolada (en forma de lanza), son rígidas, fibrosas, acabadas en espina y con los márgenes dentados y espinosos. El peso de las pencas varía ampliamente entre una especie y otra ya que entre las más pequeñas el peso puede ser menor a 20 gramos, en cambio, en especies grandes, pueden llegar a pesar más de 30 kilos cada una. El número de hojas puede ser de cinco a diez en *Agave gypsophila* y *Agave nizardensis*, hasta de 150 a 200 en *Agave rhodacantha* (García, 2007).

Como se muestra en la Figura 2, la zona donde reside la base de las hojas es el tallo, también conocido como “corazón” o “piña”, este puede ser corto y apenas sobrepasar unos centímetros del suelo, o bien, ser largo y erecto, alcanzando hasta los tres metros de altura. Posee inflorescencias, es decir, una distribución de las flores en espigas o racimos situados sobre un largo escapo floral o “quiote” (Aguirre *et al.*, 2001). Las flores tienen diferentes grados de succulencia, son bisexuales y tubulares. El fruto es una cápsula seca, con semillas que son negras, aplanadas y rodeadas por un ala corta en su parte distal redondeada.

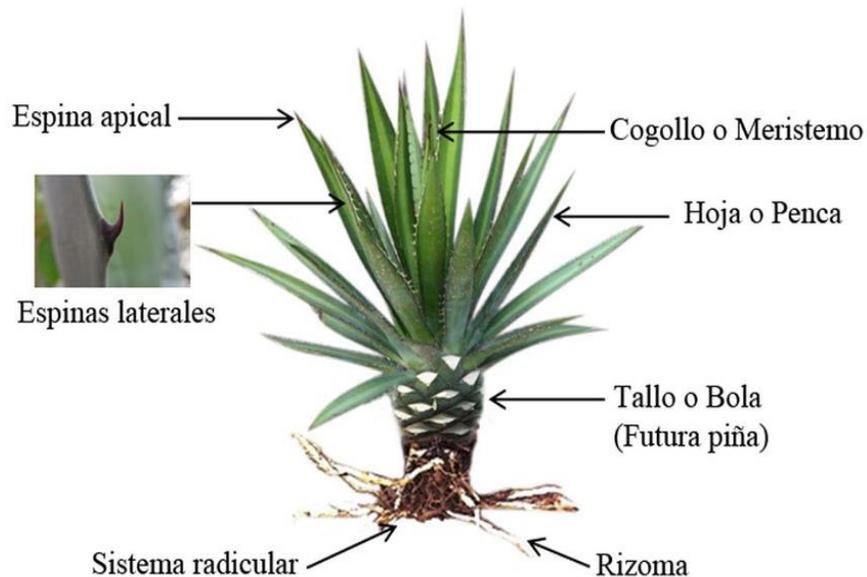


Figura 2. Anatomía del agave
Tomado de León *et al.*, (2015).

Los magueyes son plantas adaptadas a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas, gracias a las modificaciones en la estructura básica de la planta como respuesta a las presiones del ambiente. Los agaves poseen estrategias para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos, especialmente en el suelo, con fuertes fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, las cuales tienden a limitar la pérdida de agua por transpiración y a acumularla en tejidos especializados. El desarrollo de succulencia en las hojas es una de sus adaptaciones más conspicuas, ya que el agua almacenada durante la época de lluvias permite que las plantas sobrevivan durante algún tiempo en ausencia de suministro de agua del exterior, lo que ocurre cuando las condiciones del suelo son tales, que la raíz ya no es capaz de extraerla de él (García, 2007). Una de las adaptaciones estratégicas de los agaves es el uso del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). García (2007) explica que las plantas con metabolismo CAM tienen transpiración nocturna, abren sus estomas durante la noche, fijan el carbono en ácidos orgánicos y se acumulan en las vacuolas. Por otra parte, durante el día el ácido málico acumulado es descarboxilado y se obtiene carbono, el cual es utilizado por la planta para la producción de carbohidratos (Fig. 3). De esta forma, la planta obtiene ganancias netas de carbono con una pérdida mínima de agua. Este tipo de metabolismo es utilizado por diversas especies de agaves, entre ellas, *Agave americana*, *A. fourcroydes*, *A. lechugilla* y *A. tequilana*.

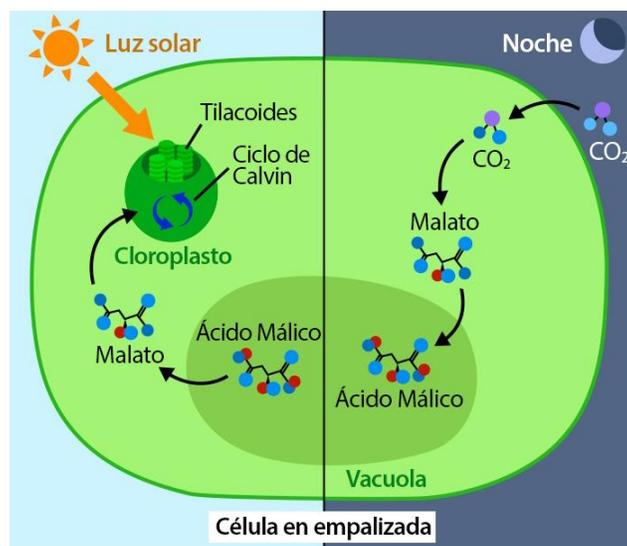


Figura 3. Diagrama del metabolismo ácido de las crasuláceas
Tomado de Kropp y Halasey, (2018).

1.2. Agaves en la industria tequilera

La industria tequilera es una de las más importantes en México, constituyendo junto con la industria del mezcal, la segunda actividad económica más importante dentro del conjunto de las bebidas alcohólicas (INEGI, 2019). La producción anual de tequila es de aproximadamente 351.7 millones de litros, de los cuales, 246.5 millones son exportados, siendo Estados Unidos de América el principal destino, seguido de Alemania y Colombia (CRT, 2019).

Como resultado de este proceso de producción, se encuentra la generación de una gran cantidad de residuos ya que el consumo de *Agave tequilana* Weber variedad azul para la elaboración de esta bebida alcohólica, es de aproximadamente 900 mil toneladas anuales (CRT, 2019). Esta especie perteneciente al género *Agave* es la única permitida en el proceso de elaboración del tequila, según la NOM-006-SCFI-2012, referente a la denominación de origen "Tequila".



Figura 4. Proceso de elaboración del tequila. Tomado de Gourmet de México, (2019).

El *Agave tequilana* Weber variedad azul es una planta de hojas color azul-verdoso, delgadas y casi planas; mide aproximadamente 1.25 metros de largo, 10 centímetros de ancho y tiene una espina terminal de color rojo oscuro de 2 centímetros (Granados, 1999). Bautista y colaboradores (2001) explican que la parte de la planta que es utilizada para la elaboración del tequila es la piña o cabeza, la cual se corta y posteriormente se somete a un proceso de cocimiento para lograr la degradación de los azúcares complejos que la conforman, en azúcares más simples que puedan ser utilizados posteriormente por las levaduras en la fase de fermentación. Como consecuencia de esta última fase, se obtiene una solución llamada “mosto muerto” que se somete a dos procesos de destilación. En el primero, se lleva a cabo la separación de vinazas, sólidos, aldehídos y cetonas y a continuación, en el segundo proceso, se separan los compuestos más volátiles que el etanol, principalmente el metanol, pues resulta nocivo para el ser humano. Finalmente, tras un periodo de reposo conocido como añejamiento, se obtiene como producto, un tequila de 45 a 50° GL (Fig. 4).

1.3. Fructanos

Dentro de los principales carbohidratos de reserva en muchas plantas se encuentran los polímeros de fructosa, llamados fructanos, que se sintetizan a partir de sacarosa como aceptor en la reacción primaria por lo que es común la presencia de un resto de glucosa en su estructura. Estos carbohidratos se encuentran de forma natural en plantas como la del agave, la alcachofa de Jerusalén, las raíces de achicoria y tubérculos de la planta de la dalia (Montañez *et al.*, 2011). Las estructuras de los fructanos presentes en cada especie difieren en la posición de los enlaces β donde se polimerizan las unidades de fructosa o bien, en la posición del residuo de glucosa presente. Como se muestra en la Figura 5, los principales tipos de fructanos presentes en la naturaleza son: a. Inulina, que presenta enlaces β -(2,1) en las unidades fructofuranosas b. Levana cuando los enlaces predominantes son β -(2,6), c. Neoseries de inulina que tienen algunas ramificaciones β -(2,6) y además tienen una molécula de glucosa entre las unidades de fructosa, d. Neoseries de levana son un caso similar pero en este caso las ramificaciones son β -(2,1), e. Fructanos ramificados (Trapala, 2017).

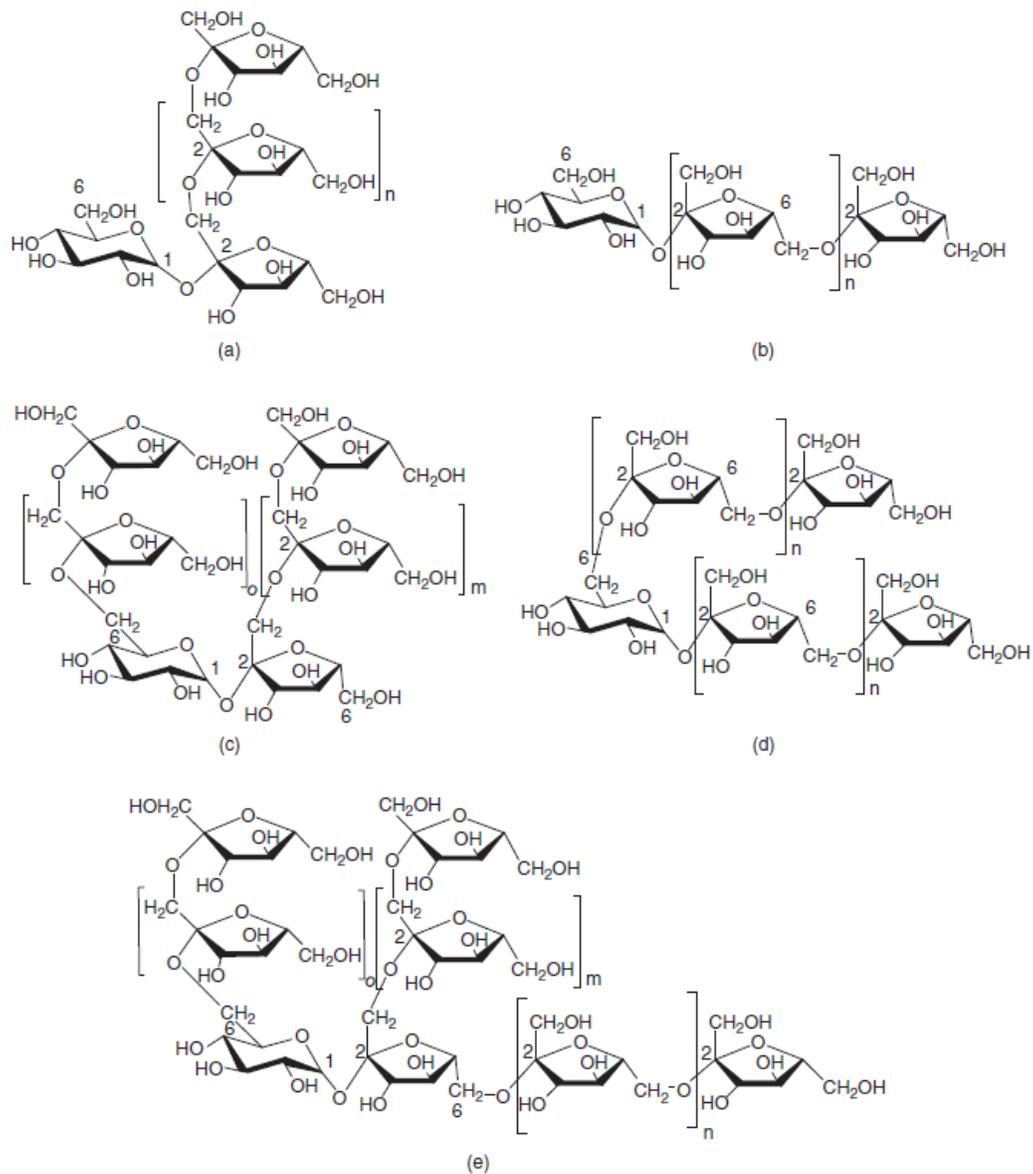


Figura 5. Principales estructuras de los fructanos presentes en la naturaleza, producidos por microorganismos y plantas. Inulina (a), Levana (b), Neoseries de inulina (c), Neoseries de levana (d), Fructanos ramificados (e). Tomado de Arrizón *et al.*, (2014).

1.4. Inulina

En el *Agave tequilana* el principal carbohidrato de reserva es la inulina, un fructano que, como se observa en la Figura 6, presenta una combinación de tres estructuras de fructanos conocidas (levana, inulina y neoinulina) y compuesto por enlaces tipo β -(2,1) y β -(2,6) entre las moléculas de fructosa, según la estructura propuesta por López y colaboradores (2003).

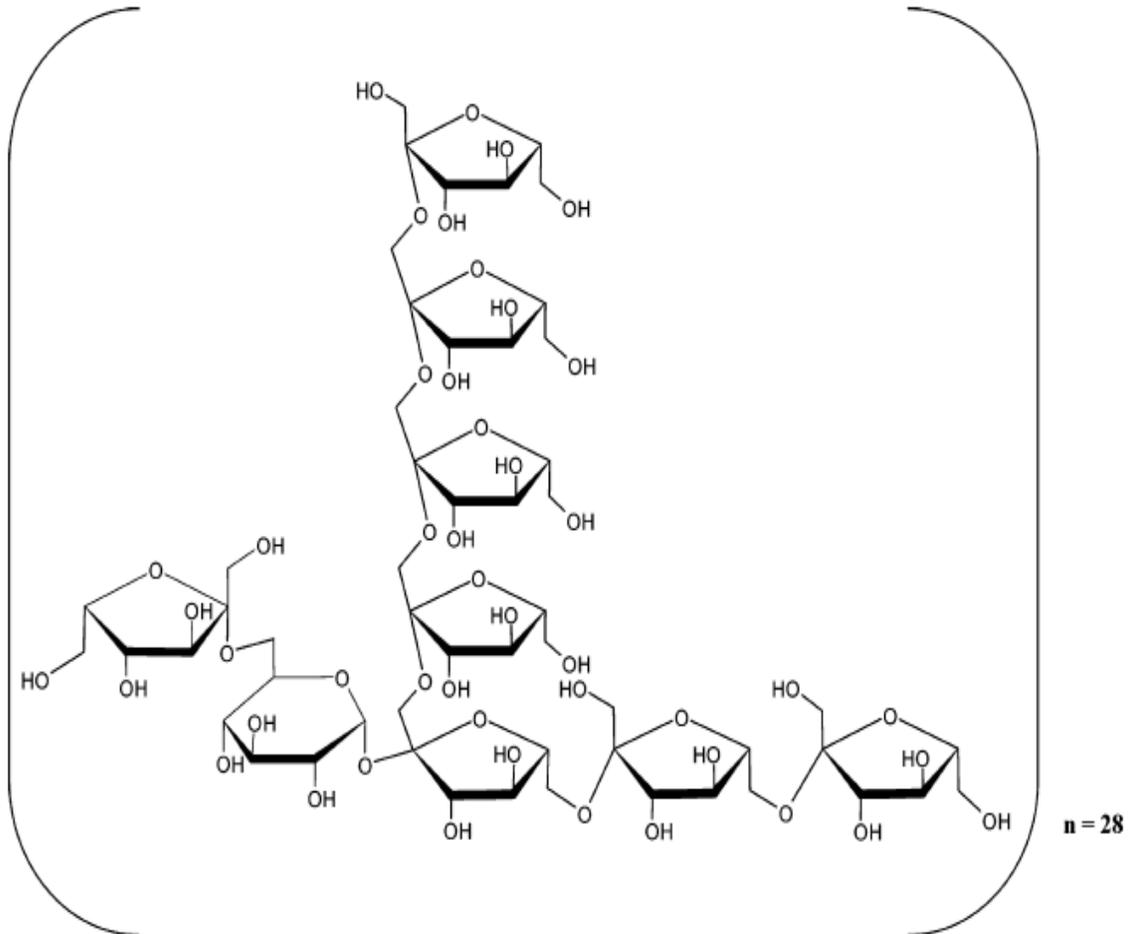


Figura 6. Estructura propuesta de los fructanos presentes en *A. tequilana* Weber variedad azul. Tomado de López *et al.*, (2003).

Los fructanos se almacenan en todos los componentes de la planta de agave, sin embargo, estudios realizados por Montañez y colaboradores (2011) indican que la mayor concentración de carbohidratos se encuentra en la cabeza del agave (23.02%), comparada con la encontrada en las bases y en las puntas de las hojas. Por otra parte, como se muestra en la Tabla 1, al evaluar la integración de los

carbohidratos contenidos en las diferentes fracciones de la planta de agave, el estudio llevado a cabo encontró que en las bases de las hojas prevaleció la inulina, seguida por los azúcares reductores directos (ARD) y por último los fructooligosacáridos (FOS). Tanto el contenido de FOS como de inulina fueron menores en la punta de la hoja y aumentaron hacia la cabeza de la planta. En esta última predomina la inulina, seguida por los FOS y una menor cantidad de ARD. Dado que los azúcares reductores totales (ART) constituyen la suma de ARD, FOS e inulina, su contenido resultó mayor en la cabeza y disminuyó hacia la punta de las hojas de la planta (Montañez *et al.*, 2011).

Tabla 1. Integración de los azúcares reductores totales contenidos en las diferentes fracciones de la planta de *A. tequilana weber* variedad azul. ARD: Azúcares reductores directos, FOS: fructooligosacáridos, ART: azúcares reductores totales. Modificado de Montañez *et al.*, (2011).

Fracción	Componente (% base seca)			
	ARD	FOS	Inulina	ART
Punta de hoja	17.81	6.24	2.25	26.30
Base de hoja	18.18	13.66	24.52	56.36
Cabeza	12.00	24.96	43.24	80.20

El contenido de carbohidratos reportado por Montañez en la cabeza de la planta de agave fue similar al que contiene la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), de entre 14 y 19% (Lingyun *et al.*, 2007), pero existen algunas variaciones entre las moléculas de inulina obtenidas de las distintas fuentes potenciales de fructanos, como son las plantas del género *Agave*, la alcachofa de Jerusalén, las raíces de achicoria y tubérculos de la planta de la dalia. Montañez y colaboradores (2011) reportan la inulina obtenida de *Agave tequilana* Weber variedad azul con un grado de polimerización promedio (GPP) de 25.75 unidades y un peso molecular promedio (PMP) de 4171 g·mol⁻¹, lo cual demuestra que es de menor tamaño, comparada con la inulina extraída de otras fuentes (Tabla 2). Esta diferencia resulta en una ventaja

ya que el tamaño de la molécula no es una limitante para su aprovechamiento como fuente de fibra dietaria en la elaboración de alimentos o como fuente de azúcares fermentables para la obtención de insumos de interés industrial.

Tabla 2. Comparación del GPP y PMP de la inulina obtenida de distintas fuentes potenciales de fructanos.

Fuente potencial de fructanos	Grado de polimerización promedio (GPP)	Peso Molecular Promedio (PMP)	Referencia
<i>Agave tequilana weber var. azul</i>	25.75 unidades	4171 g·mol ⁻¹	Montañez <i>et al.</i> , 2011
Tubérculos de la alcachofa de Jerusalén (<i>Helianthus tuberosus</i>)	35 unidades	5670 g·mol ⁻¹	Edelman y Jefford, 1968 Chabbert <i>et al.</i> , 1985
Raíces de achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	33.6 unidades	5443 g·mol ⁻¹	Ohta <i>et al.</i> , 1993
Tubérculos de dalia (<i>Dahlia variabilis</i>)	38.8-40.3 unidades	6286-6529 g·mol ⁻¹	Nakamura <i>et al.</i> , 1995 Ohta <i>et al.</i> , 1993

1.5. Inulinasas

Las inulinasas son enzimas capaces de hidrolizar a la inulina. Sobre la base de su acción sobre este sustrato, las inulinasas se clasifican como exoinulinasas y endoinulinasas. Las exoinulinasas actúan sobre la unidad terminal de fructosa de la inulina y producen fructosa, y las endoinulinasas actúan aleatoriamente en el enlace interno glucosídico β -(2,1) de la inulina y así, producen fructooligosacáridos (Figura 7) (Singh y Singh, 2017).

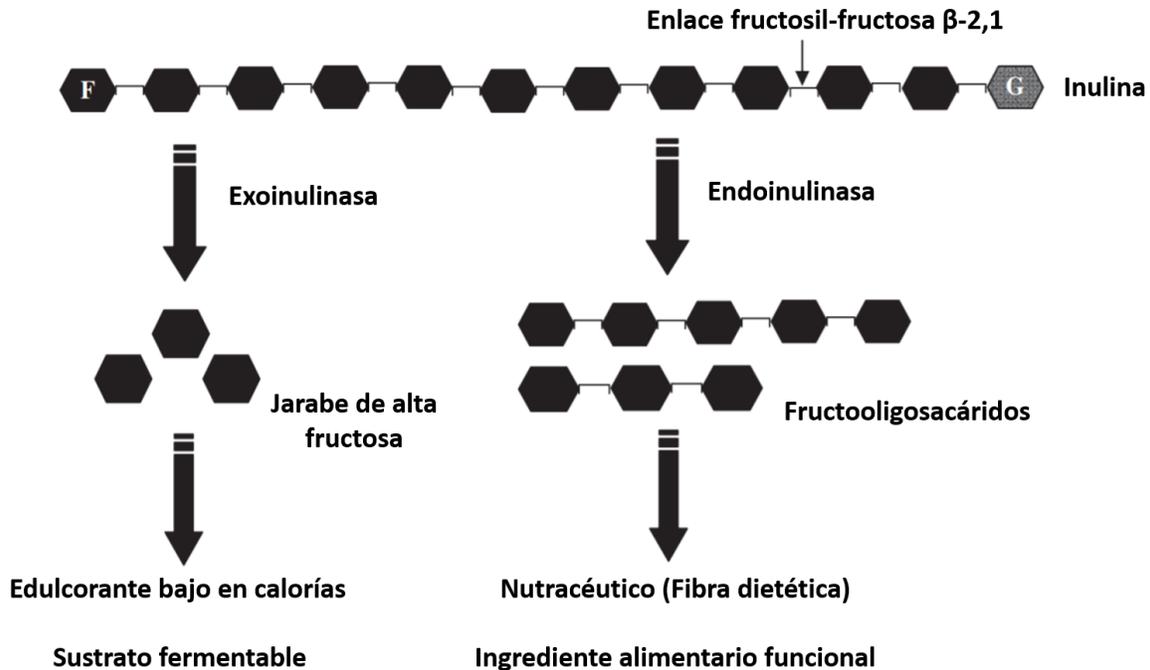


Figura 7. Mecanismo de acción de la inulinasa. Modificado de Kango y Jain, (2011).

Las inulinasas pueden ser producidas por una gran variedad de plantas y microorganismos como hongos, bacterias y levaduras pero se distinguen dependiendo la actividad enzimática y las propiedades que presentan las enzimas que generan.

Los estudios llevados a cabo en distintos microorganismos han demostrado también que la producción de inulinasas es dependiente de los ingredientes en la formulación del medio de cultivo en el cual se inocula el microorganismo productor de las mismas. Por lo tanto, la variación de la fuente de carbono o nitrógeno, puede provocar una mayor o menor producción de la enzima.

Por otra parte, se observa también una variación en la actividad enzimática de las inulinasas dependiendo del microorganismo productor que se trate. Como se observa en la Tabla 3, entre los microorganismos pertenecientes al reino Fungi, *Aspergillus* sp. se destaca con un valor de 75 U/mL. Respecto a las levaduras, la cepa de *K. marxianus* parece muy interesante con un valor de 3000 U/mL. Las bacterias, en cambio, no presentan valores tan altos de actividad enzimática, sin embargo, su naturaleza termofílica podría presentar una gran ventaja ya que se

podría llevar a cabo el proceso de fermentación a mayor temperatura y por consiguiente, aumentaría la solubilidad de los sustratos (Ricca *et al.*, 2007).

Por otro lado, el estudio sobre la producción de inulinasas por parte de distintas especies de *Fusarium* sp., si bien no es reciente, es limitado. El microorganismo más estudiado perteneciente a este amplio género es *Fusarium oxysporum*. Singh y Gill (2006) reportaron la producción de inulinasas en esta especie. Dichas inulinasas mostraron la mayor actividad enzimática a los nueve días de incubación a una temperatura de 25°C en un medio de pH=5.5 y una concentración de fructanos al 3% y 0.2% de nitrato de sodio. Sin embargo, exceptuando a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, la producción de inulinasas del género *Fusarium* no ha sido evaluada hasta el momento.

Tabla 3. Rendimiento de la inulinasa producida por distintos microorganismos. Los rendimientos se expresan en U/mL si no se indica lo contrario. Los datos marcados con (*) se expresan en U/g. Tomado de Ricca *et al.*, (2007).

Micro-organism	Enzyme yield [U/ml]	Reference
FUNGI		
<i>Aspergillus sp.</i>	75	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. aureus</i> MTCC 151	160	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. ficuum</i>	3000*	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. fischeri</i> MTCC 150	1–1.2	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. flavus</i> MTCC 277	1–1.2	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. nidulans</i> MTCC 344	1–1.2	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. niger</i>	60	Poorna and Kulkarni, 1995
<i>A. niger</i> 817	0.0685	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. niger</i> A42	4600*	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. niger</i> MTCC 281	1–1.2	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. niger</i> mutant 817	160	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. niger</i> mutant selection	35.18	Skowronek and Fiedurek, 2003
<i>A. niger</i> mutant UV1	120	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>A. parasiticus</i>	2.9	Ertan <i>et al.</i> , 2003
<i>Cladosporium sp.</i>	10.9	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Fusarium sp.</i>	0.080	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium sp.</i>	50	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium sp.</i> 91–4	3.74	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>P. rugulosum</i>	54	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>P. spinulosum</i>	1.67	Ertan <i>et al.</i> , 1999
<i>P. trzebinskii</i>	11	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces sp.</i>	32	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>S. rochei</i> E87	1	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Trichoderma viride</i>	1.18	Ertan <i>et al.</i> , 1999; Pandey <i>et al.</i> , 1999
BACTERIA		
<i>Bacillus sp.</i>	5.14	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>B. subtilis</i> 430 A	50–70	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Clostridium acetobutylicum</i> IFP 912	43.7	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>C. acetobutylicum</i> ABKn8	6.06	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>C. thermosuccinogenes</i>	0.011	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Flavobacterium mulivorum</i>	0.456	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas sp.</i> 65	15*	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Staphylococcus sp.</i>	0.634	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces sp.</i> GNDU 1	0.552	Gill <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces sp.</i> ALKC4	0.524	Gill <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptomyces sp.</i> ALKC4	9400*	Sharma <i>et al.</i> , 2007; Pandey <i>et al.</i> , 1999
YEASTS		
<i>C. pseudotropicalis</i> IP513	25000*	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	7	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	355	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. lactis</i>	43.7	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i>	56000*	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i>	176	Silva-Santisteban and Filho, 2005
<i>K. marxianus</i>	127	Kalil <i>et al.</i> , 2001
<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	260	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> ATCC 52466	0.418	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> CDBB-L-278	82	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	107	Kushi <i>et al.</i> , 2000
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> CBS 6556	3000	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	58000*	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i> UCD (FST) 55–82	212	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Pichia guilliermondii</i>	60.1	Gong <i>et al.</i> , 1999

1.6. *Fusarium* sp.

Las especies pertenecientes al género *Fusarium* son comúnmente conocidas como “hongos de campo” ya que son la causa de una gran variedad de enfermedades en cultivos, incluido el de *Agave tequilana*. *Fusarium* es un género de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en suelos y plantas, entre los cuales se encuentran especies fitopatógenas y patógenos oportunistas en humanos. Como se observa en la Figura 8, al microscopio, la fiálide es fina en forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Los microconidios, por su parte, variadas formas, agrupaciones, en cadenas largas o cortas. Otro tipo de conidios que pueden encontrarse en estas especies son los mesoconidios, similares a los macroconidios pero de menor tamaño. Por último, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo (Tapia y Amaro, 2014).

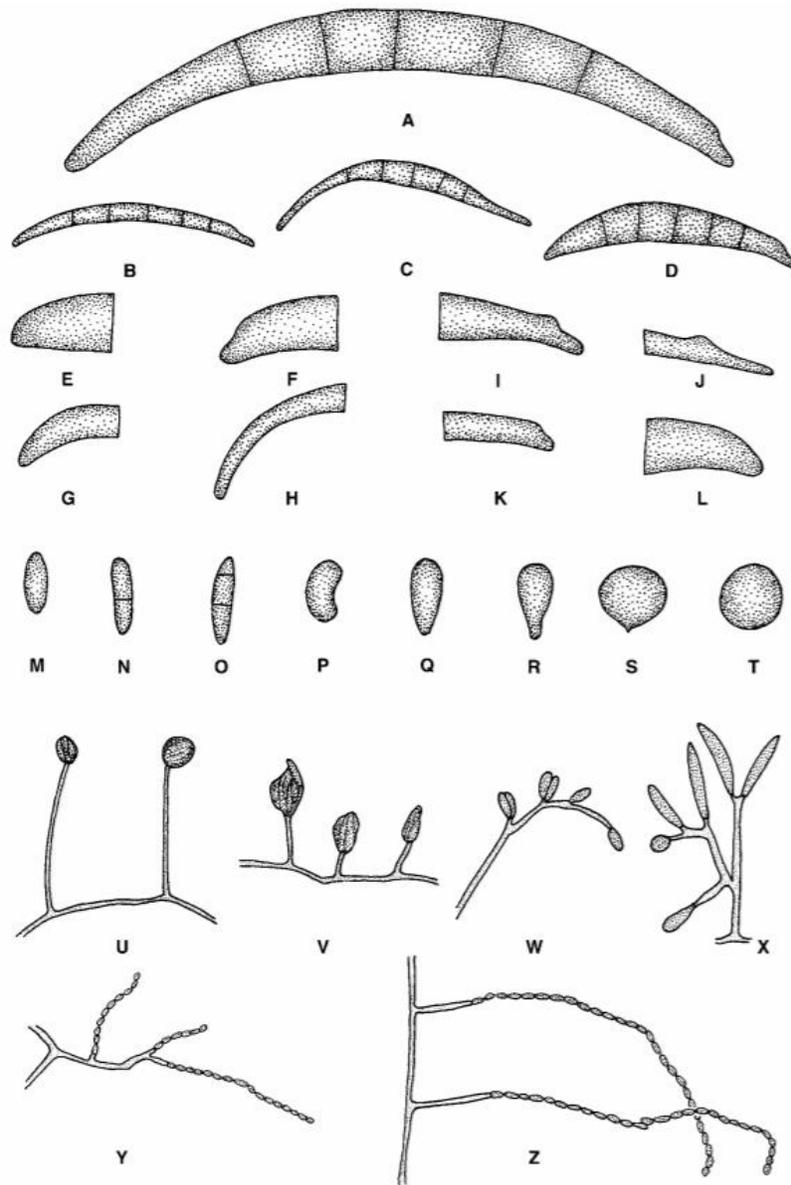


Figura 8. Estructuras características del género *Fusarium*. (A-D): Formas de macroconidios. (A) Macroconidio típico, B) Macroconidio recto, C) Macroconidio con curvatura dorsiventral, D) Macroconidio con lado dorsal más curvado que el lado ventral; (E-H): Formas de células apicales de macroconidios. E) Célula apical roma, F) Célula apical papilar, G) Célula apical en forma de gancho, H) Célula apical estrecha; (I-L): Formas de células basales de macroconidios. I) Célula basal en forma de pie, J) Célula basal en forma de pie alargada, K) Célula basal claramente muesca, L) Célula basal ligeramente muesca; (M-T): Forma de microconidios. M) Oval, N) Oval bicelular, O) Oval de tres células, P) Reniforme, Q) Obovoide con base truncada, R) Piriforme, S) Napiforme, T) Globoso; (U-X): Morfología de fiálides. U, V) Monofiálides, W,X) Polifiálides; (Y-Z) Cadenas de microconidios. Y) Cadenas cortas, Z) Cadenas largas. Tomado de Leslie y Summerell, (2006).

La clasificación taxonómica de las distintas especies de *Fusarium* es muy compleja. A lo largo del tiempo el concepto de especies ha cambiado dentro del género *Fusarium*, dependiendo de los grupos de investigadores. Un trabajo nodal dentro de la taxonomía de este género fue el tratado de Wollenweber y Reinking en el cual se identificaron 65 especies agrupadas en 16 secciones (De la Torre *et al.*, 2014). Así mismo, como se muestra en la Figura 9, existe una amplia variación exhibida por las especies pertenecientes a este género con respecto a la morfología, fisiología y caracterización de crecimiento.

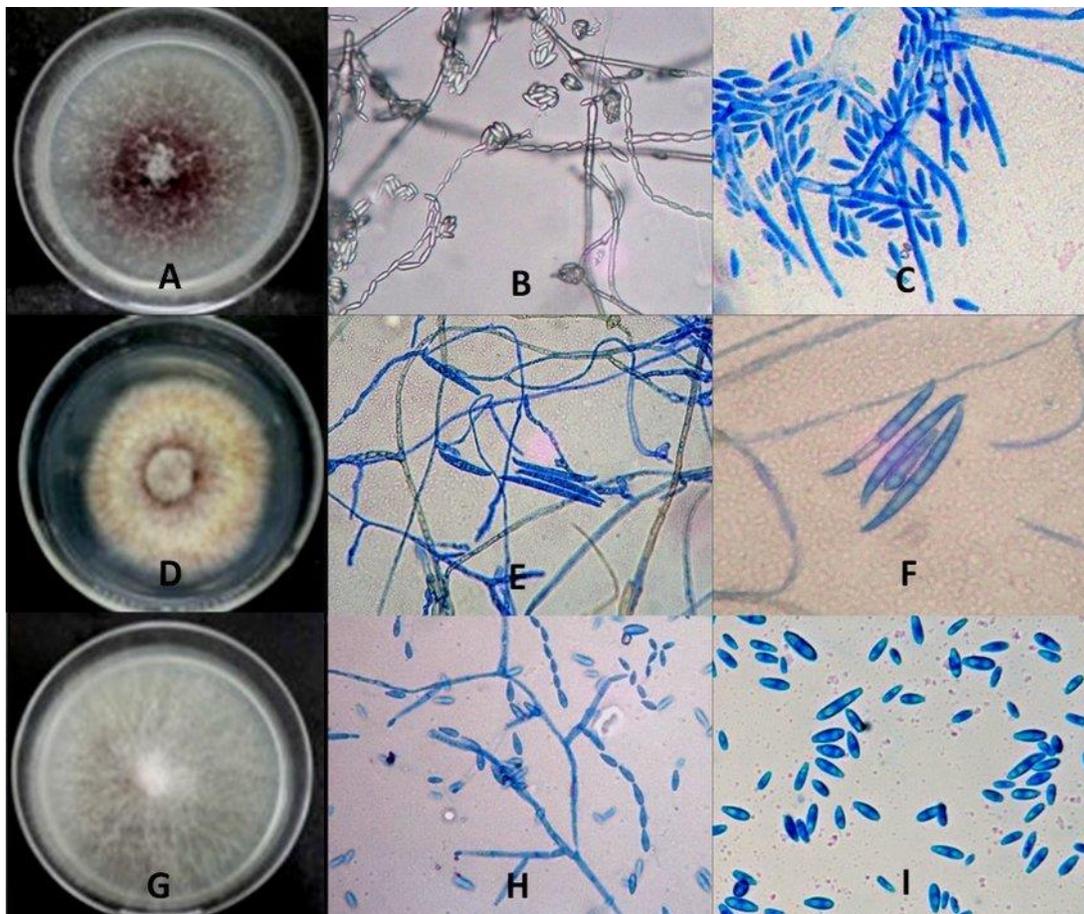


Figura 9. Características macroscópicas y de cultivo de distintas especies del género *Fusarium*. (A-C): *F. verticillioides*, A) Crecimiento en medio PDA, B) Microconidios en cadenas y racimos, C) Microconidios formados de monofiálides; (D-F): *F. graminearum*, D) Crecimiento en medio PDA, E) Macroconidios con células basales en forma “de pie”, F) Macroconidios con número de septas entre 5 y 6; (G-I): *F. proliferatum*, G) Crecimiento en medio PDA, H) Microconidios en cadenas formados en monofiálides y polifiálides, I) Macroconidios con número de septas entre 3 y 5. Tomado de Pascual *et al.*, (2016).

Las enfermedades que *Fusarium* sp. causa en diversos cultivos como el del tomate, maíz, calabaza, y agave se caracterizan por generar marchitez, tizones y pudriciones en las plantas que infecta (Tabla 4). Estas enfermedades resultan en importantes pérdidas económicas del sector agrícola. Entre los casos más conocidos en los que se refleja el impacto social que pueden tener las enfermedades en plantas causadas por *Fusarium*, se encuentra el caso de la gran afectación a la industria bananera en Panamá, América Central, debido a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causante de la marchitez de la variedad de banana “Gros Michel” (Dita *et al.*, 2018).

Tabla 4. Principales enfermedades en cultivos causadas por *Fusarium* spp.
Tabla modificada de Villa *et al.*, (2014).

Especie de <i>Fusarium</i>	Enfermedad y cultivo	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitez vascular de <i>Agave tequilana</i> Enfermedad de Panamá o fusariosis del banano	Ávila <i>et al.</i> , 2010 Sharma <i>et al.</i> , 2009
<i>Fusarium solani</i>	Marchitez del agave	Ramírez <i>et al.</i> , 2017
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lupine</i> y <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lupini</i> Snyder y Hansen	Marchitez de raíz de Lupino	Abdel-Monahim <i>et al.</i> , 2011
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (con el nemátodo <i>Meloidogyne incognita</i>)	Marchitez y nudo de raíz del tomate	Hadian <i>et al.</i> , 2011
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Marchitez del tomate	Singha <i>et al.</i> , 2011
<i>Fusarium verticillioides</i>	Contaminación micotoxigénica del maíz	García <i>et al.</i> , 2012

La especificidad del huésped varía entre las especies de *Fusarium*. *F. verticillioides* causa pudrición de la mazorca principalmente en maíz y sorgo, pero puede infectar muchas otras plantas. Por otra parte, los miembros del complejo de especies *F. oxysporum* tienen la capacidad de causar enfermedades de marchitez en más de cien especies de plantas agrónomicamente importantes. Sin embargo, los aislamientos individuales de *F. oxysporum* exhiben un alto grado de especificidad

del huésped. Los miembros que muestran especificidad para el mismo huésped son agrupados en la misma *forma specialis*, por ejemplo, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* para patógenos de tomate (Ma *et al.*, 2013).

En el caso particular del agave, el principal causante de la marchitez vascular es *Fusarium oxysporum*. Los síntomas reportados de dicha enfermedad son: clorosis (hojas amarillas claras), plegamiento de los bordes de las hojas, secado de las hojas más viejas desde el ápice hasta la base, pudrición extensa de color granate en la corona, y finalmente, si la planta se empuja lateralmente, cae fácilmente debido a la pudrición de la raíz. Ávila y colaboradores (2010) llevaron a cabo un estudio en plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul, afectadas por esta enfermedad en distintos niveles de severidad (Fig. 10). El objetivo del estudio fue identificar los microorganismos causantes de dicha enfermedad. Como resultado, se encontró un total de 29 distintas especies pertenecientes al género *Fusarium*, de las cuales, 27 especies correspondían a *F. oxysporum*.



Figura 10. Escala de gravedad de marchitez del *Agave tequilana* Weber variedad azul, causada por *Fusarium oxysporum*. Nivel 0) plantas asintomáticas con hojas extendidas de color azul verdoso; Nivel 1), pequeñas plantas verdes con hojas inferiores enrolladas hacia arriba en los márgenes; Nivel 2) plantas amarillentas con la mayoría de las hojas enrolladas hacia arriba en los márgenes y áreas secas en las hojas inferiores; Nivel 3) plantas atrofiadas con áreas secas en la punta de las hojas a diferentes niveles de altura; Nivel 4) plantas con muy pocas áreas verdes y cerca de la muerte. Tomado de Ávila *et al.*, (2010).

Fusarium sp emplea una amplia gama de estrategias de infección, la mayoría se puede clasificar como hemibiotróficos ya que su forma de infectar a las plantas hospederas es parecida a la de un patógeno que depende de un huésped vivo (biotrófico) pero eventualmente pasa a causar la muerte y consumir células huésped (necrotroficas). Ma y colaboradores (2013) explican que las distintas especies de *Fusarium* tienen la capacidad de permanecer en el suelo como micelio o como esporas, de forma que cuando encuentran una planta hospedera, la infección puede iniciar en las raíces, en partes de la planta por encima del suelo, a través del aire o el agua. Ejemplificaron que *F. oxysporum* penetró las raíces de forma asintomática, posteriormente colonizó el tejido vascular y desencadenó marchitamiento masivo y necrosis. Por otra parte, *F. graminearum*, la principal especie de *Fusarium* causante del tizón de los cereales en todo el mundo, produce necrosis limitada ya que infecta los tejidos florales durante la antesis y se propaga en flores no infectadas a través del eje central de la inflorescencia, que eventualmente daña los granos y los contamina con toxinas. Aunado a sus variadas vías de infección, las especies pertenecientes al género *Fusarium* son capaces de inactivar sustancias tóxicas producidas por la planta que infectan, al mismo tiempo que producen toxinas propias que aumentan su virulencia, tales como las eniatinas y el ácido fusárico, además de producir una gran batería de enzimas capaces de hidrolizar los componentes de las paredes celulares así como los carbohidratos de reserva (Villa *et al.*, 2014).

1.7. Importancia de las inulinasas

La capacidad que poseen las inulinasas de hidrolizar la agavina, permite la obtención de fructosa, que en la actualidad es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica y de alimentos, representando una gran competencia para la sacarosa, cuyo consumo conlleva a problemas de salud como obesidad, cariogenicidad, arteriosclerosis y diabetes (Vandamme y Derycke, 1983).

Según Gupta y colaboradores (1992), la fructosa es obtenida convencionalmente por inversión de la sacarosa con invertasas o por isomerización de la glucosa por acción de la glucosa isomerasa, que es el método más empleado industrialmente, sin embargo este proceso tiene una limitante termodinámica que son los valores de

concentración al equilibrio de fructosa y glucosa los cuales son alrededor del 50% por lo que el jarabe final que se obtiene de esta reacción contiene aproximadamente 42% de fructosa, 50% de glucosa y 8% de oligosacáridos. El ajuste a la concentración deseada de fructosa en los jarabes se realiza por cromatografía o con el uso de aditivos, sin embargo estos procesos son muy costosos e implican problemas de toxicidad.

Kochhar y colaboradores (1999) evidenciaron la producción de fructosa a través de la hidrólisis ácida de inulina en un intervalo de pH de 1.0-2.0 y una temperatura de 80-100°C durante un intervalo de 1-2h. No obstante, el proceso tiene la desventaja de dar lugar a la formación de productos que dan un color o sabor indeseables y al aumento en el contenido de cenizas, cuya eliminación por medio de resinas de intercambio iónico es muy caro. Por tanto, la hidrólisis enzimática de inulina resulta en una gran alternativa que supone ventajas económicas en industrias como la tequilera, ya que puede llevarse a cabo a temperaturas moderadas de reacción (50-60°C), a valores de pH a los que normalmente se obtiene el jugo de agave (4.7-5.5) y a tiempos cortos de reacción (Singh y Gill, 2006).

2. ANTECEDENTES

En el mes de Marzo 2019 se recibieron 10 cepas de *Fusarium* sp. del laboratorio de Fitopatología del Consejo Regulador del Tequila (CRT). Como se muestra en la Tabla 5, estas cepas provenían de agaves infectados que se ubicaban en plantaciones de distintos municipios del estado de Jalisco y se encontraban sembradas en cajas Petri con medio agar Papa-Dextrosa (PDA).

Un integrante de nuestro equipo de investigación evaluó previamente la producción de inulinasas de las cepas proporcionadas por el CRT y determinó que las cepas que producían una mayor cantidad de la enzima de interés eran las identificadas con los códigos: CRT-098, CRT-142, CRT-153 y CRT-197. Por lo tanto se decidió utilizar estas cuatro cepas en el presente trabajo de investigación con el fin de evaluar y caracterizar la producción de inulinasas de *Fusarium* sp.

Tabla 5. Relación de cepas del género *Fusarium* sp. aisladas de la enfermedad de marchitez del agave.

Relación de cepas del género <i>Fusarium</i> sp. aisladas de la enfermedad de marchitez del agave						
Código	ID	Cultivo	Año plantación	Referencia Predio	Municipio	Estado
CRT-098	67133	Agave	2011	Carrizo de fuentes	Jesús María	Jalisco
CRT-142	52673	Agave	2009	Monte largo	Atotonilco El Alto	Jalisco
CRT-153	59703	Agave	2012	Los robles	Arandas	Jalisco
CRT-197	58331	Agave	2011	San José de Pilas	Jesús María	Jalisco

3. JUSTIFICACIÓN

La industria tequilera es una de las más importantes para el sector económico de México. Sin embargo, aunado a la producción de 351.7 millones de litros anuales, se encuentra la generación de aproximadamente 900 mil toneladas de residuos de la materia prima utilizada: *Agave tequilana* Weber variedad azul. Entre los residuos generados se encuentran estructuras de dicha planta que contienen un porcentaje cercano al 24% de inulina que al ser hidrolizada genera productos de valor agregado para la industria farmacéutica y de alimentos. De esta forma, la búsqueda de enzimas llamadas inulinasas, capaces de degradar a la inulina de agave, han sido estudiadas en diversos microorganismos, desde bacterias y levaduras hasta hongos filamentosos. Empero, la producción de inulinasas de especies del género *Fusarium* ha sido escasamente evaluada.

Fusarium sp. es el principal hongo patógeno que afecta al agave azul, pero puede ser una fuente importante de inulinasas especialistas en inulina de agave ya que posee una gran variedad de enzimas que utiliza para degradar la pared celular e infectar la planta, por lo tanto, resulta de suma importancia evaluar la posible producción de inulinasas y encontrar las mejores condiciones para optimizar dicho proceso.

4. HIPÓTESIS

Las distintas cepas de *Fusarium sp.* aisladas del *Agave tequilana* Weber variedad azul tendrán la capacidad de producir enzimas con actividad inulinolítica y el nivel de producción de estas enzimas se verá afectado por las condiciones del medio de crecimiento en el que el microorganismo crezca.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar y caracterizar la producción de inulinasas de diferentes cepas de *Fusarium* sp.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar el crecimiento de las diferentes cepas de *Fusarium* en medio sólido usando agavina como única fuente de carbono.
- Establecer las mejores condiciones de crecimiento de las cepas de *Fusarium* sp.
- Determinar la actividad enzimática de la inulinasasa producida por *Fusarium* sp.
- Establecer las mejores condiciones de la hidrólisis enzimática sobre agavina.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

6.1.1. Reactivos

Tabla 6. Reactivos utilizados

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Reactivo de Bradford	BIO-RAD
Ácido 3,5-dinitrosalicílico, D-(+)-Glucosa, D-(-)-Fructosa, Cloruro de sodio, Tartrato de sodio-potasio, Hidróxido de sodio, Nitrato de potasio, Fosfato sódico, Sulfato de magnesio heptahidratado, Glicerina, Etanol, Azul de lactofenol, Bactopeptona, Extracto de levadura, Albúmina sérica	Sigma-Aldrich
Fosfato monopotásico, Ácido acético	J.T. Baker
Sacarosa	Merck
Inulina de Agave	Nekutli, S.A.
Inulina de Achicoria	BENEO

6.1.2. Cepas de *Fusarium* sp.

En el mes de Marzo 2019 se recibieron 10 cepas no identificadas de *Fusarium* sp. del laboratorio de Fitopatología del Consejo Regulador del Tequila (CRT), provenientes de agaves infectados de plantaciones ubicadas en distintos municipios del estado de Jalisco. Las cepas se encontraban sembradas en cajas Petri con medio agar Papa-Dextrosa (PDA). Un integrante de nuestro equipo de investigación evaluó previamente la producción de inulinasas de las cepas proporcionadas por el CRT y determinó que las cepas que producían una mayor cantidad de la enzima de interés eran las identificadas con los códigos: CRT-098, CRT-142, CRT-153 y CRT-197. Por lo tanto se decidió utilizar estas cuatro cepas en el presente trabajo de investigación con el fin de evaluar y caracterizar la producción de inulinasas de *Fusarium* sp.

6.2. Crecimiento de las cepas de *Fusarium* sp.

A las cepas de *Fusarium* sp. sembradas en agar Papa-Dextrosa (PDA) se les agregó una solución al 15% de glicerol a modo de cubrir la superficie. Posteriormente se sometieron a agitación a 15 rpm durante una hora. Transcurrido este tiempo, en condiciones estériles y con ayuda de una espátula, se realizó un barrido de microconidios desde el centro del cultivo hacia las orillas del mismo. Además, se tomaron 1.5 mL de sobrenadante del cultivo que fue colocado, junto con los microconidios aislados, en un tubo de microcentrífuga para su posterior transferencia a un medio de cultivo sólido con agavina al 1.0%. Para este fin, se tomaron 8.5 µL del sobrenadante recolectado de las cuatro cepas de *Fusarium* sp. y fueron sembrados en el centro de una caja Petri con medio de cultivo sólido (Tabla 7), sobre un disco de papel filtro. Los cultivos monoconidiales se incubaron a 30°C durante 190 horas.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo empleado para el crecimiento de *Fusarium* sp.

Componente	Cantidad (% m/v)
Inulina de agave	1.0
Nitrato de potasio	0.36
Fosfato monopotásico	0.1
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.05
Cloruro de sodio	0.038
Agar bacteriológico	1.5

6.3. Verificación de la pureza de las cepas

De los cultivos incubados durante 190 horas de las 4 cepas de *Fusarium* sp., se tomó una pequeña porción de micelio y se colocó sobre un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. Posteriormente se realizaron observaciones al microscopio con objetivos de 10x y 40x y se estudiaron las características microscópicas de cada cepa, al mismo tiempo que se verificó su pureza.

6.4. Determinación de la velocidad radial y de crecimiento

Tras la comprobación de la pureza de las 4 cepas de *Fusarium* sp. a evaluar, se realizó una resiembra de cada una en medios de cultivo cuya composición se indica en la Tabla 7. Posterior a la inoculación por duplicado de las 4 cepas, se sometieron a incubación a 30°C, durante 190 horas. El radio de crecimiento de cada cepa de *Fusarium* se midió y se registró cada 24 horas.

6.5. Determinación de la actividad inulinolítica de las cepas de *Fusarium* sp.

A las cajas inoculadas con las cepas CRT-098, CRT-142, CRT-153 y CRT-197 e incubadas a 30°C durante 190 horas, se les agregaron algunas gotas de Lugol a modo de cubrir la parte del agar en la cual no había crecimiento fúngico. Se cubrió la caja con parafilm y se dejó actuar por algunos minutos. Posteriormente se observó si se llevó a cabo la formación de un halo alrededor del crecimiento de la cepa. Con base en los resultados obtenidos de este ensayo y de la determinación de velocidad radial y de crecimiento, se eligió la cepa que presentó una mayor velocidad de crecimiento y una mayor actividad inulinolítica para continuar con las siguientes evaluaciones.

6.6. Efecto de la fuente de carbono

Después de elegir la cepa a evaluar, con base en los resultados obtenidos de los experimentos previos, se llevó a cabo la resiembra de dicha cepa, en medios de cultivo líquidos cuya formulación variaba en la fuente de carbono utilizada, como se muestra en la tabla 8.

Los medios de cultivo preparados fueron previamente esterilizados en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Se tomó una pequeña porción de medio sólido inoculado con la cepa elegida de *Fusarium* sp. y se incubó a 30°C con agitación a 200 rpm durante 190 horas. Cada 24 horas, durante todo el tiempo de incubación, se realizó una toma de muestra de 1.5 mL en condiciones asépticas de cada medio de cultivo inoculado. Las muestras tomadas se conservaron a -80°C para evitar el crecimiento fúngico. Posteriormente las muestras fueron descongeladas y

centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se conservó a -80°C para evaluaciones posteriores.

Tabla 8. Composición del medio de cultivo empleado para el crecimiento de *Fusarium sp* con fuentes variadas de carbono. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: Inulina de agave, inulina de Achicoria, Fructosa, Sacarosa y Glucosa.

Componente	Cantidad (% m/v)
Fuente de carbono	1.0
Nitrato de potasio	0.36
Fosfato monopotásico	0.1
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.05
Cloruro de sodio	0.038

6.7. Efecto de la fuente de nitrógeno

Tras establecer la mejor fuente de carbono a utilizar, se decidió evaluar el efecto de distintas fuentes de nitrógeno para la producción óptima de enzimas de la cepa elegida de *Fusarium sp*. Por lo tanto, se utilizó la formulación del medio de cultivo indicado en la Tabla 9, variando únicamente la fuente de nitrógeno: Peptona, extracto de levadura o nitrato de potasio.

Tabla 9. Composición del medio de cultivo empleado para el crecimiento de *Fusarium sp* con distintas fuentes de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron: Extracto de levadura, peptona y nitrato de potasio.

Componente	Cantidad (% m/v)
Fuente de carbono establecida	1.0
Fuente de nitrógeno	0.36
Fosfato monopotásico	0.1
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.05
Cloruro de sodio	0.038

Los medios de cultivo preparados fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Cada medio se inoculó con 1cm² del medio sólido previamente inoculado con la cepa elegida de *Fusarium*, posteriormente se realizó el mismo procedimiento descrito previamente en la sección 6.6.

6.8. Ensayos para la determinación del consumo de carbohidratos, cuantificación de proteína y determinación de la actividad enzimática

6.8.1. Determinación del consumo de carbohidratos

Para este ensayo se cuantificó el contenido de azúcares reductores en el sobrenadante con el método de DNS (Ghose, 1987), empleando 100 µL de muestra, 200 µL de agua destilada y 600 µL de reactivo de DNS. Se sometió a calentamiento a 90°C por 5 minutos en un baño de glicerina y posteriormente se hizo un choque térmico con hielo para detener la reacción. Se añadieron 4 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm. La concentración de sustrato consumido en el sobrenadante se determinó con base en una curva patrón de fructosa previamente realizada.

6.8.2. Determinación de la actividad enzimática

Para llevar a cabo este ensayo se utilizó el sobrenadante libre de células recuperado de las muestras tomadas cada 24 horas durante 190 horas del crecimiento de *Fusarium* sp. bajo las distintas condiciones que se evaluaron.

Se preparó una solución al 1.0% de inulina de agave en buffer de acetatos 50 mM pH 5.0. Después, en tubos de microcentrífuga se añadieron 500 µL de la solución preparada de inulina de agave y 500 µL del sobrenadante de las muestras. Además de las muestras, se preparó un control añadiendo a un tubo de microcentrífuga 500 µL de la solución de inulina de agave al 1.0% y 500 µL de agua destilada. Todos los tubos fueron incubados a 50°C con agitación constante a 300 rpm durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó un choque térmico con hielo para detener la reacción. La actividad enzimática de las muestras se determinó empleando el método de DNS (Ghose, 1987) para cuantificar el contenido de azúcares reductores en el blanco y al final de la reacción enzimática. Una unidad de inulinasa fue definida

como la cantidad de enzima que produce 1.0 μmol de fructosa por minuto bajo las condiciones de reacción establecidas.

6.8.3. Determinación de la cantidad de proteína

Con el fin de determinar la cantidad de proteína en las muestras recolectadas, se utilizó el método de Bradford (1976). Como primer paso se preparó una curva patrón de albúmina sérica (0-100 $\mu\text{g/mL}$). Para este ensayo se utilizó el sobrenadante libre de células recuperado de las muestras tomadas cada 24 horas durante las 190 horas de crecimiento de *Fusarium* sp. bajo las distintas condiciones que se evaluaron. De cada muestra se tomaron 200 μL y se agregaron 1800 μL de reactivo de Bradford, en un tubo de ensayo. La mezcla se homogeneizó en un vórtex y se dejó reposar durante 5 minutos. Posterior al tiempo de reposo, se midió la absorbancia de la reacción colorimétrica llevada a cabo, en espectrofotómetro a 595 nm y con ayuda de la curva patrón se obtuvo la cantidad de proteína.

6.9. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Tras establecer las mejores fuentes de carbono y nitrógeno a emplear, se realizó la evaluación del efecto del pH sobre la acción de la enzima producida.

Para este ensayo se utilizó el sobrenadante recolectado de las muestras tomadas a las 190 horas de incubación de la cepa elegida de *Fusarium* sp. en el medio de cultivo optimizado. Se prepararon diferentes soluciones de buffer de acetatos 50 mM a pH= 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 y soluciones de buffer de fosfatos 50 mM a pH= 7.0 y 8.0. Posteriormente se llevó a cabo el procedimiento de determinación de actividad enzimática antes descrito (sección 6.8.2).

6.10. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Tras establecer el pH óptimo de reacción, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la acción de la enzima producida. Para este ensayo se utilizó el sobrenadante libre de células recolectado de las muestras tomadas a las 190 horas de incubación de la cepa elegida de *Fusarium* sp. en el medio de cultivo optimizado. Se preparó una solución al 1.0% de inulina de agave en buffer de acetatos 50 mM a pH=5.0. Luego, en tubos Eppendorf se agregaron 500 μL de la solución de inulina de agave

al 1.0% en buffer pH=5.0 y 500 μ L del sobrenadante de la muestra. El control se preparó con 500 μ L de la solución de inulina de agave y 500 μ L de agua destilada. Cada tubo se sometió a agitación en termomixer durante 2 horas a distintas temperaturas con agitación constante a 300 rpm. Las temperaturas a evaluar fueron: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C. Una vez transcurridas las 2 horas, se hizo un choque térmico con hielo para detener la reacción. La actividad enzimática de las muestras se determinó por medio del método de DNS para cuantificar los azúcares reductores presentes en el blanco y al final de la reacción enzimática.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Verificación de la pureza de las cepas

Con el fin de verificar la pureza de las cepas de *Fusarium* sp. sembradas en medios de cultivo con inulina de agave al 1.0% m/v, se llevó a cabo una tinción simple con azul de lactofenol y su posterior observación al microscopio (Fig. 11).

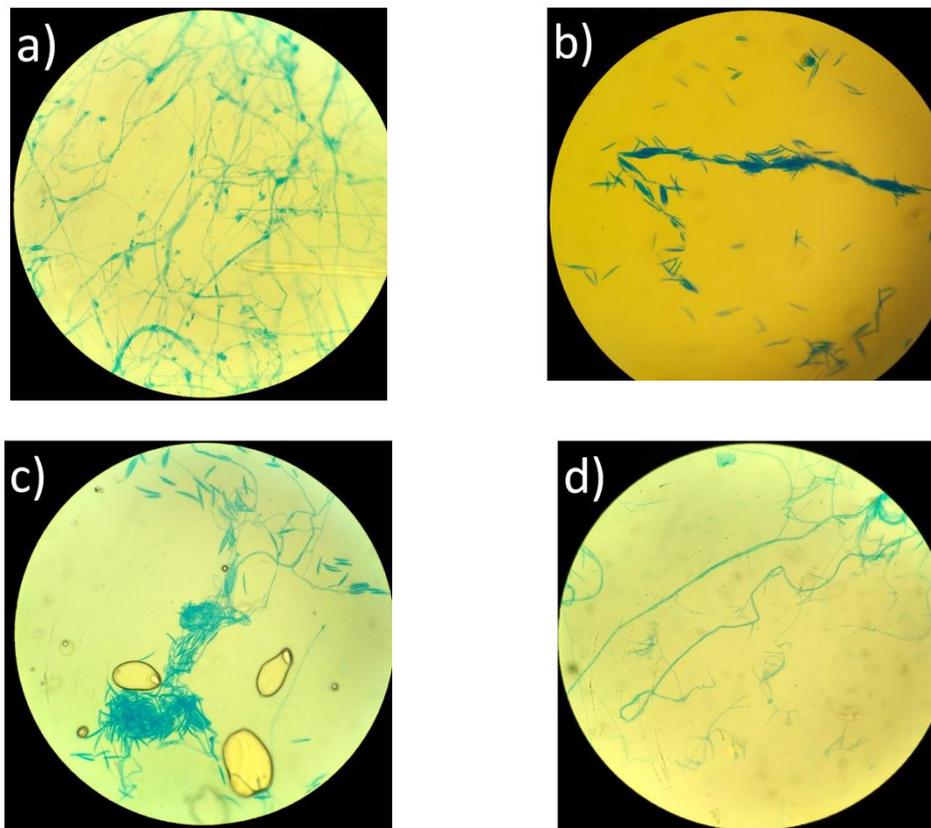


Figura 11. Características microscópicas de las cepas de *Fusarium* sp. Tinción simple con azul de lactofenol. (40x) . (a) Cepa CRT-098 (b) Cepa CRT-153 (c) Cepa CRT-197 (d) Cepa CRT-142. Las imágenes mostradas son una representación de 5 réplicas.

Leslie y Summerell (2006) propusieron un método de identificación de *Fusarium* sp. en el cual se contempla la observación de las características microscópicas y macroscópicas de la cepa de interés. Además, describieron “la esencia de la identificación morfológica” de *Fusarium* sp., enlistando e ilustrando las estructuras más características del microorganismo. La característica más importante en la

identificación de *Fusarium* sp. son los macroconidios en forma de media luna, hialinos y septados. Leslie y Summerell afirman que en muchos casos, la presencia de estas estructuras es suficiente para identificar un cultivo de especies pertenecientes al género *Fusarium*. Los microconidios, por su parte, son estructuras que no se presentan en todas las especies de *Fusarium*, por lo cual su observación resulta importante. Las formas más comunes de los microconidios son: ovales, ovoides, reniformes (por ejemplo en forma de riñón), piriformes, globosas y fusiformes.

Las cepas identificadas con clave CRT-142 y CRT-098, presentaron características de hongos filamentosos, con presencia de microconidias en forma oval y tamaño homogéneo pero con ausencia de macroconidias. Por otra parte, las cepas con clave CRT-153 y CRT-197 sí presentaron estructuras de macroconidias de tamaño homogéneo con un número de septos de entre 4 y 6. Las macroconidias observadas en ambas cepas, fueron de forma recta y se encontraron aisladas y agrupadas. La morfología de las células apicales observadas fue curva y levemente afilada y, por su parte, la morfología de las células basales fue “en forma de pie”, según la clasificación de estas estructuras establecida por Leslie y Summerell (2006).

Las características observadas coinciden con las reportadas por Pascual *et al.*, (2016), quienes observaron la presencia de macroconidias con células basales en forma “de pie” y un número de septos entre 5 y 6, cuando una cepa pura de *Fusarium graminearum* se incubó en medio Agar Papa Dextrosa (PDA). Por otra parte, observaron microconidios en cadenas formados en monofiálides y polifiálides, con número de septos de entre 3 y 5 en una cepa pura de *F. proliferatum* que se incubó en medio Agar Papa Dextrosa (PDA). Por último, identificaron la presencia de microconidios en cadenas y racimos formados de monofiálides, en una cepa pura de *F. verticillioides*.

Las características morfológicas de cada cepa de *Fusarium* sp. fueron homogéneas, con lo cual, se verificó la pureza de las cuatro cepas aisladas. Además, la similitud en características microscópicas de las cepas identificadas con clave CRT-197 y

CRT-153 (Fig. 11 b,c) fue muy notable, por lo cual, se sugirió que estas cepas probablemente pertenecían a la misma especie del género *Fusarium*.



Figura 12. Macroconidias de la cepa CRT-197 de *Fusarium* sp. Tamaño homogéneo y forma recta con número de septos de entre 4 y 6. La morfología de las células apicales observadas es curva y levemente afilada y, por su parte, la morfología de las células basales es “en forma de pie”. La imagen mostrada es una representación de 5 réplicas.

7.2. Determinación de la velocidad de extensión radial y de crecimiento

Tras la verificación de la pureza de las cuatro cepas de *Fusarium*, se llevó a cabo la medición del radio de crecimiento de dichas cepas cada 24 horas en un medio de cultivo sólido con inulina de agave al 1.0%, con el fin de identificar a la cepa de *Fusarium* sp. aislada del agave que creció a mayor velocidad cuando utilizó inulina de agave como fuente de carbono.

A partir de los resultados obtenidos se determinó la velocidad de crecimiento y la velocidad de extensión radial de cada cepa. Como se observó en la Tabla 10, los mayores valores de velocidad de extensión radial determinados fueron 0.33 mm/h y 0.34 mm/h, correspondientes a las cepas identificadas como CRT-153 y CRT-197. Estas cepas presentaron también los valores máximos de velocidad de crecimiento: 0.028 h⁻¹ y 0.030 h⁻¹, respectivamente. El aprovechamiento de la agavina por parte

del hongo podría sugerir que el microorganismo es capaz de producir inulinasas, enzimas que hidrolizan dicha fuente de carbono y dan lugar a la formación de productos que el hongo puede consumir y favorecer su crecimiento.

Tabla 10. Velocidad de extensión radial y velocidad de crecimiento determinadas de las cepas de *Fusarium* aisladas del agave. *Fusarium incarnatum* CRT-197 se incubó a 30°C durante 190 horas en medios de cultivo sólidos con inulina de agave al 1.0% m/v como única fuente de carbono. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas correspondientes a 12 muestras biológicas independientes.

Cepa	Vr (mm/h)	μ (h ⁻¹)
CRT-098	0.31 \pm 0.006	0.024 \pm 0.001
CRT-142	0.29 \pm 0.006	0.025 \pm 0.001
CRT-153	0.33 \pm 0.011	0.028 \pm 0.001
CRT-197	0.34 \pm 0.010	0.030 \pm 0.001

7.3. Determinación de la actividad inulinolítica de las cepas de *Fusarium* sp.

El siguiente ensayo se llevó a cabo con el fin de evaluar de manera cualitativa, la actividad inulinolítica que poseía cada cepa de *Fusarium* aislada del agave.

El Lugol es un reactivo que permite identificar la presencia de polisacáridos en el medio de cultivo tiñendo dicho medio de color marrón intenso, donde la intensidad depende de la cantidad de polisacáridos en la muestra. Por otra parte, las enzimas inulinasas degradan los fructanos convirtiéndolos en moléculas de fructosa. De esta forma, el medio que se torna de color transparente evidencia la actividad inulinolítica (Li *et al.*, 2011).

La adición de Lugol sobre los cultivos de las distintas cepas de *Fusarium* provocó la formación de un halo alrededor del crecimiento fúngico, con lo cual se comprobó que todas las cepas proporcionadas por el Consejo Regulador del Tequila poseen actividad inulinolítica, siendo más notable visualmente en las cepas identificadas como CRT-197 y CRT-153 (Fig. 13 b,c).

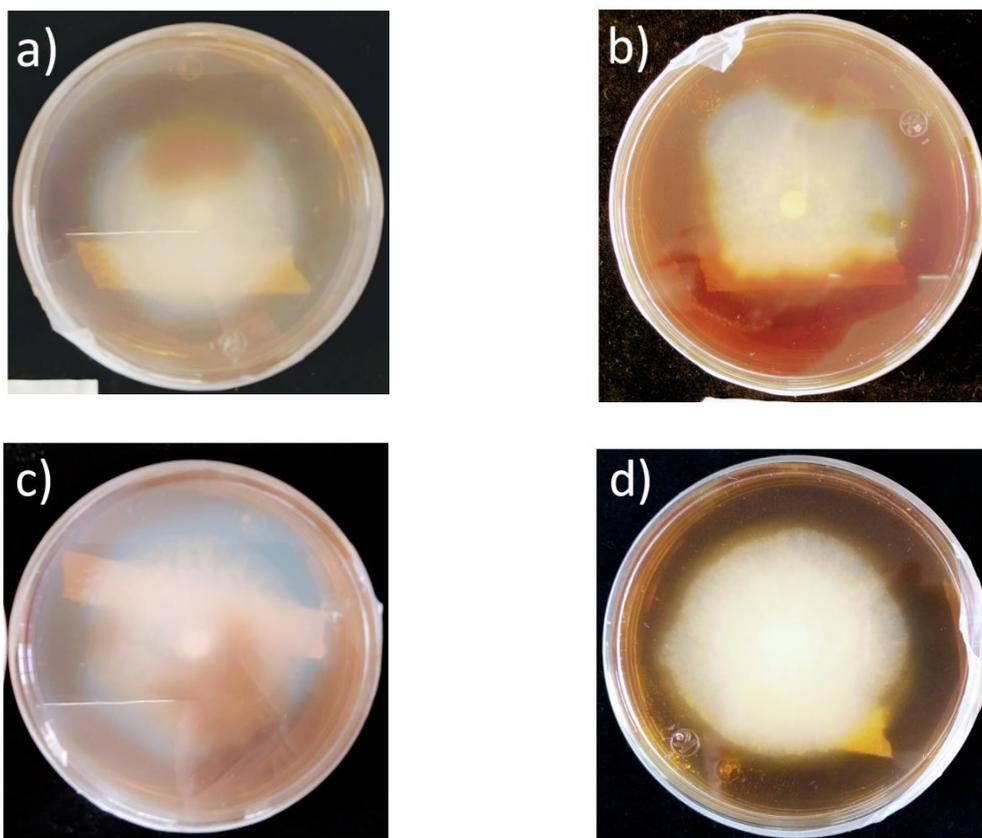


Figura 13. Actividad inulinolítica de las cepas del género *Fusarium* aisladas del agave. (a) Cepa CRT-098 mostrando actividad inulinolítica, (b) Cepa CRT-153 mostrando actividad inulinolítica, (c) Cepa CRT-197 mostrando actividad inulinolítica, (d) Cepa CRT-142 mostrando actividad inulinolítica. Las imágenes mostradas son una representación de 5 réplicas.

Los resultados obtenidos en este estudio acerca de la producción de inulinasas por *Fusarium* sp. coincidieron con los reportados por Neera y colaboradores (2018), quienes determinaron la actividad inulinolítica mediante la adición de Lugol en cepas de hongos aislados de *Dahlia rhizosphere* y registraron actividad inulinolítica presente en la cepa de *Fusarium* sp. debido al halo formado alrededor de la colonia.

7.4. Identificación de las cepas de *Fusarium* sp.

La identificación molecular de las cepas fue llevada a cabo por el grupo de investigación a cargo del Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra. Los resultados obtenidos se presentaron en la siguiente tabla:

Tabla 11. Identificación de las cepas del género *Fusarium* aisladas del agave.

Cepa	Especie
CRT-098	<i>Fusarium oxysporum</i>
CRT-142	<i>Fusarium proliferatum</i>
CRT-153	<i>Fusarium incarnatum</i>
CRT-197	<i>Fusarium incarnatum</i>

Gracias a estos resultados, fue posible comprobar lo que en resultados anteriores se había sugerido: las cepas identificadas con las claves CRT-153 y CRT-197 pertenecieron a la misma especie: *Fusarium incarnatum*.

Con base en los resultados de la cepa CRT-197 obtenidos en la determinación de actividad inulinolítica (Fig. 13), en conjunto con los resultados recabados de esta cepa con la verificación de pureza y la determinación de la velocidad de crecimiento y radial en medios de cultivo con inulina de agave al 1.0% como única fuente de carbono (Tabla 10), se eligió esta cepa para evaluar y caracterizar la producción de inulinasas en *Fusarium* sp.

7.5. Caracterización de la producción de inulinasas de *F. incarnatum* cepa CRT-197

7.5.1. Efecto de la fuente de carbono

7.5.1.1. Determinación del consumo de carbohidratos

La cepa CRT-197, correspondiente a la especie *Fusarium incarnatum*, se sembró por duplicado en cinco distintos medios de cultivo líquidos, cuya composición varió en la fuente de carbono. Los sustratos utilizados fueron: fructosa, sacarosa, glucosa, inulina de agave (agavina) o inulina de achicoria. La concentración de la fuente de carbono en todos los casos fue al 1.0% m/v.

Posterior a su incubación durante 190 horas, se determinó el consumo de carbohidratos de *F. incarnatum* en cada medio. Como se puede observar en la Figura 14, en el medio con fructosa se presentó una disminución constante en la

cantidad de azúcares reductores. A las 0 horas la concentración es de 42.283 $\mu\text{mol/mL}$ y a las 190 horas la concentración se vió reducida en un 63.6%. En el caso del medio con glucosa se observó, de igual forma, una disminución constante en la cantidad de estos azúcares. La concentración inicial fue de 33.872 $\mu\text{mol/mL}$ y, tras 190 horas de incubación, la concentración final disminuyó en un 84.4%.

Por otra parte, en el caso de los medios de cultivo que contuvieron inulina de agave e inulina de achicoria, se presentó un aumento en la cantidad de azúcares reductores entre las 40 y 60 horas de incubación. Posteriormente se observó una disminución hasta llegar a la eliminación total de estos azúcares. Este comportamiento pudo deberse a que la inulina, al ser un fructano complejo, requirió ser hidrolizada antes de poder ser utilizada por el hongo. Por consiguiente, este dato sugiere que *Fusarium incarnatum* fue capaz de generar inulinasas: enzimas que hidrolizan los enlaces β -(2,1) y β -(2,6) de la agavina y dieron lugar a productos que son cuantificados por el método de DNS, por lo cual, la cantidad de azúcares reductores aumentó momentáneamente y después disminuyó rápidamente debido a que el microorganismo fue capaz de consumirlas (Fig. 14).

Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, demostraron mediante cromatografías en capa fina (TLC) que las inulinasas que *Fusarium* sp. produjo pertenecen al grupo de exoinulinasas, por lo tanto, se consideró que el producto de la hidrólisis enzimática de la inulina de agave, fueron moléculas de fructosa y glucosa.

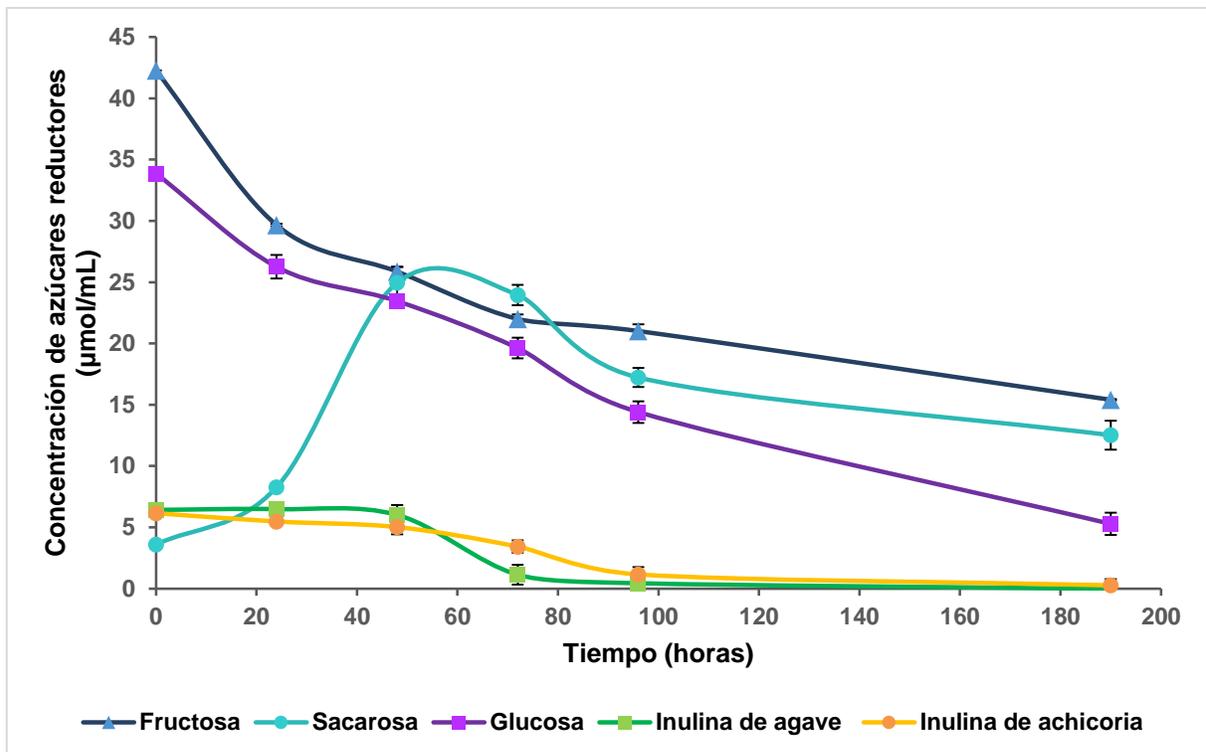


Figura 14. Efecto de la fuente de carbono sobre el consumo de carbohidratos. *Fusarium incarnatum* CRT-197 se incubó a 30°C, 200 rpm, durante 190 horas en medios de cultivo con fuentes variadas de carbono al 1.0% m/v: Fructosa, sacarosa, glucosa, inulina de agave e inulina de achicoria. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas correspondientes a 15 muestras biológicas independientes.

En la evaluación de consumo de carbohidratos del microorganismo sembrado en el medio de cultivo con sacarosa como única fuente de carbono, inicialmente la concentración de azúcares reductores fue menor a 4.0 $\mu\text{mol/mL}$, debido a que la sacarosa no es un azúcar reductor, por lo tanto, no se cuantificó con el método DNS utilizado para esta determinación. Sin embargo, entre las 40 y 60 horas de incubación se observó un aumento considerable en la cantidad de azúcares reductores, lo cual indicó que el microorganismo evaluado produjo enzimas que son capaces de hidrolizar a la sacarosa presente en el medio. Se sugiere que los productos liberados fueron glucosa y fructosa, generados como consecuencia de la actividad de la enzima invertasa o de la inulinasa que es capaz de reconocer los enlaces β -(2,1) de la inulina.

Actualmente existen estudios que evidencian que algunas especies pertenecientes al género *Fusarium* son capaces de producir tanto inulinasas, como enzimas que hidrolizan la sacarosa. Rawat y colaboradores (2015) reportaron que *Fusarium oxysporum* fue capaz de producir ambos tipos de enzimas al ser incubado en tres distintos medios de cultivo con fuentes de carbono vegetales ricas en inulina, como la raíz de espárragos (*Asparagus racemosus*), el tubérculo de Dahlia (*Dahlia pinnata*) y el extracto de raíz de diente de león (*Taraxacum officinale*). En el caso de *F. incarnatum*, el presente estudio evidenció por primera vez, que esta especie es capaz de producir inulinasas.

7.5.1.2. Determinación de la cantidad de proteína

Los resultados obtenidos tras la determinación del consumo de carbohidratos de *Fusarium incarnatum* CRT-197 en medios de cultivo con distintas fuentes de carbono, permiten sugerir que *F. incarnatum* puede producir inulinasas cuando es incubado en los medios con sacarosa, inulina de agave o inulina de achicoria como únicas fuentes de carbono. De esta forma, se decidió evaluar la producción de proteínas en los medios de cultivo con estos sustratos con el fin de identificar la fuente de carbono óptima para la producción de inulinasas en *Fusarium incarnatum*.

En la Figura 15 se observó que la concentración de proteínas presente en todos los medios, se incrementó conforme transcurre el tiempo de incubación. La mayor cantidad de proteínas registrada fue de 0.773 mg y se presentó cuando el microorganismo fue incubado en el medio con inulina de agave (agavina) como única fuente de carbono. En contraste, la menor cantidad de proteínas se registró en los medios en los que se utilizó inulina de achicoria como fuente de carbono.

La cantidad de proteínas presente a las 24 horas en el medio de cultivo con inulina de agave fue de 0.296 mg. Transcurridas 190 horas de incubación, la cantidad aumentó aproximadamente tres veces (0.773 mg) con respecto a la cantidad presente a las 24 horas. En el medio de cultivo con inulina de achicoria se presentó la misma situación, la cantidad de proteínas a las 24 horas fue de 0.186 mg y a las 190 horas transcurridas, la cantidad aumentó aproximadamente tres veces (0.495

mg). Sin embargo, en el medio con inulina de agave, la máxima cantidad de proteínas registrada a las 190 horas fue 1.5 veces mayor que la máxima cantidad determinada en el medio de cultivo con inulina de achicoria.

Los resultados obtenidos con los dos tipos de inulina utilizadas son distintos debido, probablemente, a la diferencia estructural entre ambas. En el caso de la inulina de achicoria, los enlaces que predominan son del tipo β -(2,1) mientras que los enlaces presentes en la inulina de agave son β -(2,1) y β -(2,6). En consecuencia, la producción de inulinasas por *Fusarium incarnatum* pudo verse afectada dependiendo del sustrato en cuestión. Además, la cepa evaluada, al ser un patógeno del género *Agave* (Villa *et al.*, 2014), es especialista en la agavina, ya que para infectar a la planta requiere de una gran batería de enzimas capaces de degradar la pared celular.

En el caso del medio de cultivo con sacarosa como fuente de carbono en su formulación, se presentó un incremento en la cantidad de proteínas al paso del tiempo. A las 24 horas cantidad presente fue de 0.165 mg mientras que a las 190 horas, la cantidad fue alrededor de seis veces la cantidad inicial: 0.684 mg.

En conclusión, la mayor cantidad de proteínas se obtuvo cuando *Fusarium incarnatum* CRT-197 creció en un medio de cultivo con inulina de agave como única fuente de carbono. Sin embargo, no se puede afirmar que este incremento se debió exclusivamente a la producción de inulinasas, pero se puede suponer que una fracción corresponde a estas. Para comprobar dicha suposición se podría realizar la determinación del peso molecular de la enzima producida por *F. incarnatum* mediante un zimograma.

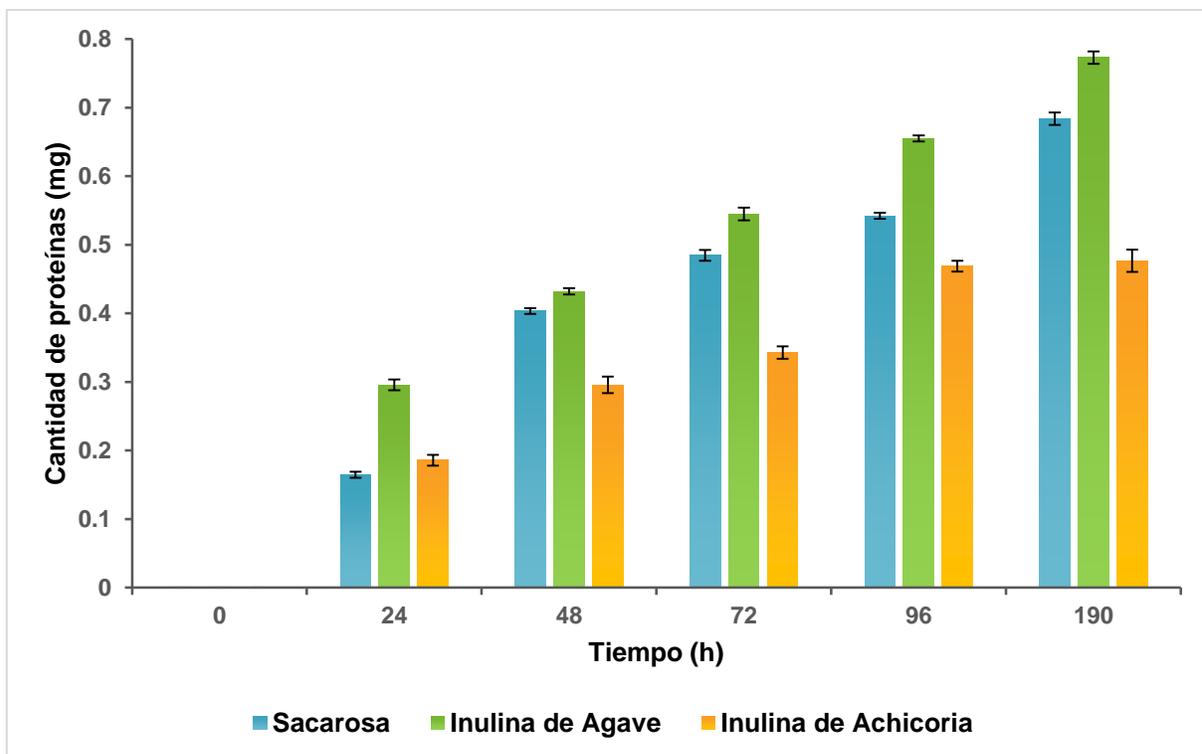


Figura 15. Efecto de la fuente de carbono sobre la cantidad de proteína. *Fusarium incarnatum* CRT-197 se incubó a 30°C, 200 rpm, durante 190 horas en medios de cultivo con fuentes variadas de carbono al 1.0% m/v: Sacarosa, inulina de agave e inulina de achicoria. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas correspondientes a 9 muestras biológicas independientes.

7.5.1.3. Determinación de la actividad enzimática

El método utilizado para la valoración de la actividad de la inulinasa producida por la cepa *F. incarnatum* CRT-197 fue el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Dicho método es utilizado comúnmente para identificar y cuantificar azúcares reductores. El procedimiento se basa en una reacción de óxido-reducción que ocurre entre el azúcar reductor y el ácido 3,5-dinitrosalicílico, provocando la formación de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico que absorbe luz a 575 nm (Miller, 1959). Un mol de azúcar reductor reacciona con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. En consecuencia, el método de DNS es ampliamente utilizado para determinar la actividad de enzimas que son capaces de

hidrolizar compuestos que liberan como productos azúcares reductores, como es el caso de las celulasas (Lin *et al.*, 1998) e inulinasas (Neera *et al.*, 2018).

Los resultados se presentaron en la Figura 16. Como se observó, aunque *F. incarnatum* creció en el medio con sacarosa y, como se observó en la Figura 15, la cantidad de proteínas en dicho medio fue de 0.684 µg, al evaluar la actividad enzimática del extracto libre de células no se observó actividad hidrolítica sobre la agavina. Considerando que se consumió el sustrato presente en el medio de crecimiento, probablemente podría estar presente en el sistema una invertasa. Las invertasas son proteínas funcionalmente similares a las inulinasas pero difieren en la especificidad para degradar polímeros complejos de fructosa de elevado peso molecular (Zavala, 1995).

En el medio con inulina de agave, la actividad enzimática se observó a partir de las 24 horas. La mayor actividad enzimática que se registró fue la producida por *Fusarium incarnatum* CRT-197 incubado en medio de cultivo con inulina de agave al 1.0% como única fuente de carbono. A las 24 horas la actividad enzimática fue de 0.075 U/mL, posteriormente, a las 96 horas, la actividad enzimática máxima se presentó con un valor de 0.275 U/mL, es decir, hubo un aumento de 3.6 veces respecto a la inicial. Por otra parte, en el caso del medio con inulina de achicoria, se encontró actividad enzimática de la inulinasa producida por la cepa CRT-197, a partir de las 72 horas de incubación, con un valor de 0.003 U/mL que aumentó al paso del tiempo, llegando a una actividad enzimática máxima de 0.050 U/mL tras 190 horas de incubación (Fig. 16).

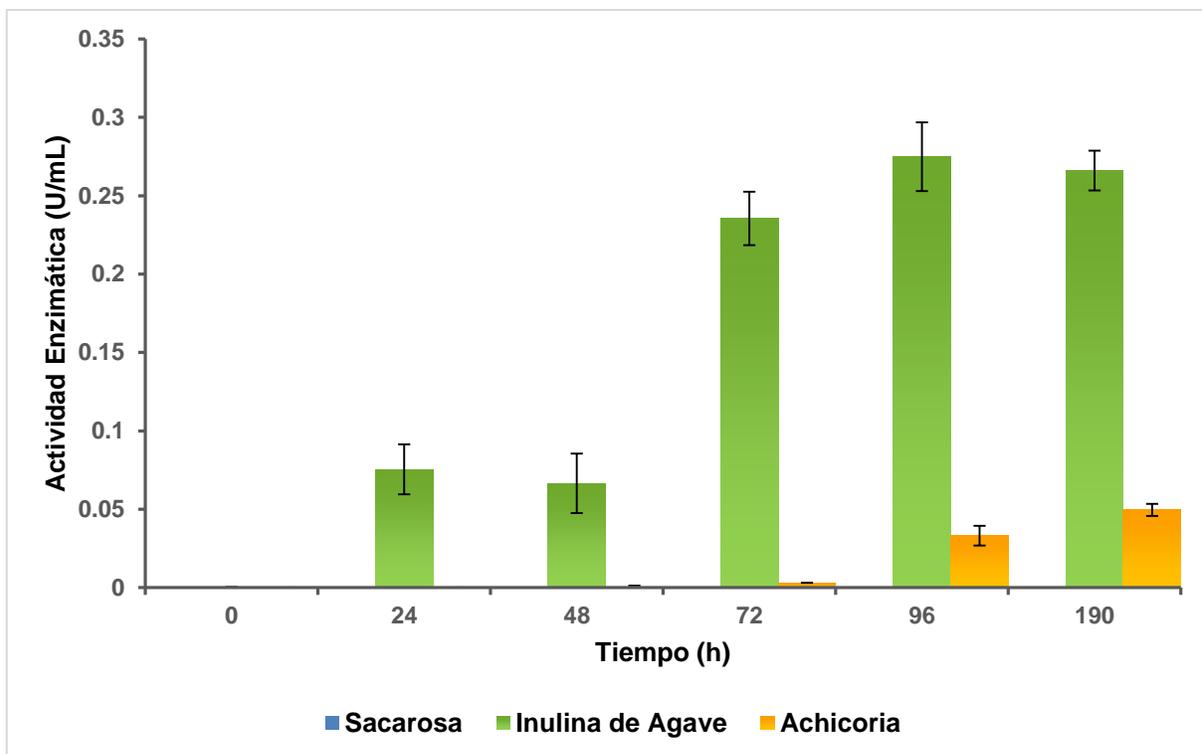


Figura 16. Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad enzimática. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave al 1.0% m/v, 50°C, pH=5.0, 300 rpm, por 2 horas. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas correspondientes a 9 muestras biológicas independientes.

Los resultados obtenidos indicaron que la actividad de la inulinasa producida por *Fusarium incarnatum* CRT-197 se vió afectada dependiendo de la fuente de carbono que el microorganismo utilizó para su crecimiento. Así mismo, tras la evaluación del consumo de carbohidratos, cantidad de proteínas y actividad enzimática, se concluyó que la mejor fuente de carbono para la producción de inulinasas de *Fusarium incarnatum* CRT-197 es la inulina de agave (agavina).

7.5.2. Efecto de la fuente de nitrógeno

7.5.2.1. Determinación de la cantidad de proteína

Una vez que se determinó la fuente de carbono óptima para la producción de inulinasas en *Fusarium incarnatum* CRT-197, se evaluó la concentración de proteínas en los medios de cultivo con fuentes variadas de nitrógeno. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford, con el objetivo

de demostrar que la fuente de nitrógeno que *F. incarnatum* utiliza para su crecimiento, puede influir en la cantidad de proteínas que produce.

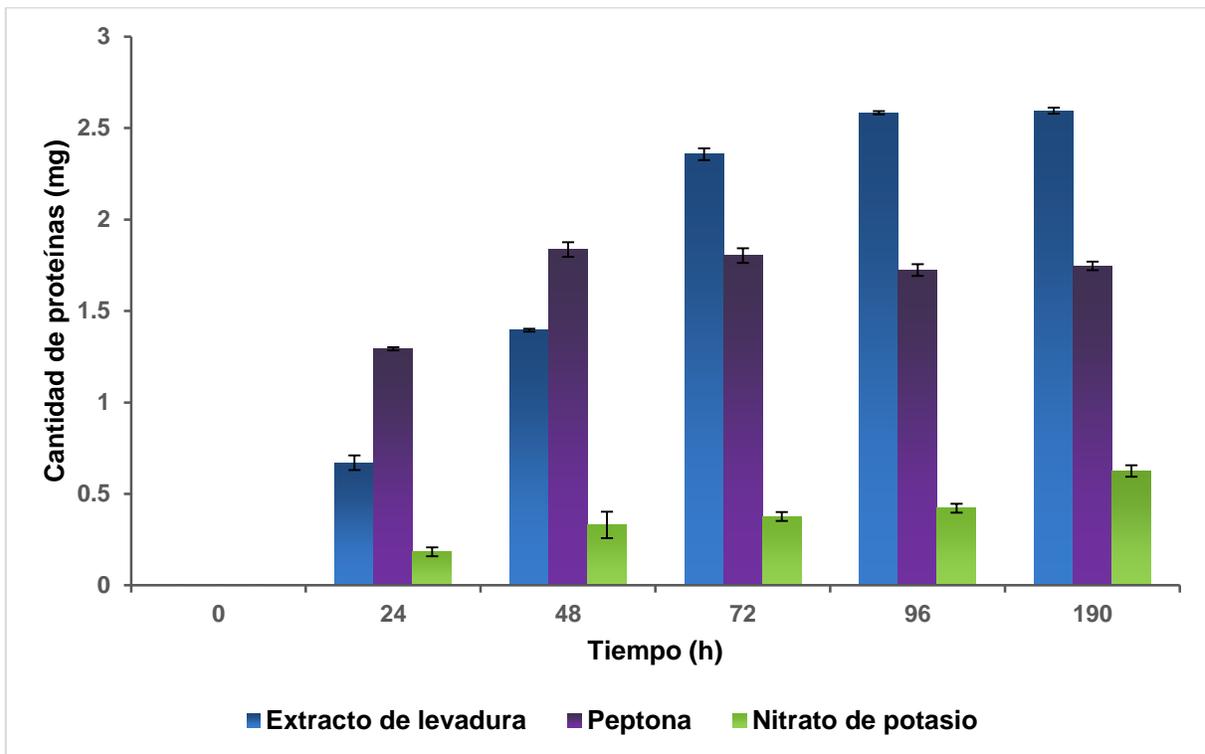


Figura 17. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la cantidad de proteína. *Fusarium incarnatum* CRT-197 se incubó a 30°C, 200 rpm, durante 190 horas en medios de cultivo con fuentes variadas de nitrógeno al 1.0% m/v: Extracto de levadura, peptona y nitrato de potasio. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas correspondientes a 9 muestras biológicas independientes.

Los resultados se presentaron en la Figura 17. Como se observó la mayor cantidad de proteínas que se registró fue de 2.596 mg y se presentó cuando el hongo fue incubado en el medio con extracto de levadura como única fuente de nitrógeno. Al contrario, la menor cantidad de proteínas se manifestó cuando el microorganismo utilizó nitrato de potasio como fuente de nitrógeno. En este último, la cantidad de proteínas a las 24 horas fue de 1.835 mg y durante las 96 horas posteriores, la cantidad aumentó paulatinamente hasta alcanzar un valor máximo de 0.625 mg tras 190 horas de incubación. Por lo tanto, cuando *F. incarnatum* CRT-197 utilizó nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno, se presentó un aumento máximo en la

cantidad de proteínas cercano al 240.75% respecto a la cantidad inicial presente a las 24 horas de incubación.

En el medio de cultivo con peptona como única fuente de carbono, la cantidad de proteínas a las 24 horas de incubación fue de 1.293 mg. Después de 48 horas de incubación, la cantidad aumentó en un 42.03% a un valor máximo de 1.834 mg y se mantuvo parcialmente estable durante las siguientes 72 horas de incubación.

Por último, en el medio de cultivo con extracto de levadura como única fuente de nitrógeno, a las 24 horas la cantidad de proteínas fue igual a 0.670 mg y aumentó progresivamente durante las siguientes 96 horas de incubación, alcanzando una cantidad máxima de 2.596 mg a las 190 horas. La mayor cantidad de proteínas determinada en dicho medio, sugirió que *F. incarnatum* CRT-197 fue capaz de producir una cantidad hasta 76.0% mayor de proteínas cuando creció con el extracto de levadura como fuente de nitrógeno, en comparación a cuando utilizó nitrato de potasio. Se sugiere que esto se debió a que el extracto de levadura es una fuente de mezclas de aminoácidos y péptidos que favorecen el crecimiento del microorganismo así como la producción de proteínas.

7.5.2.2. Determinación de la actividad enzimática

Tras la evaluación de la actividad de la inulinasa producida por la cepa *F. incarnatum* CRT-197 por el método de DNS, se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 18. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones establecidas durante dos horas con agitación a 300 rpm, utilizando como sustrato inulina de agave (agavina).

Se observó que la acción de la inulinasa que produjo *F. incarnatum* puede variar ampliamente dependiendo de la fuente de nitrógeno que el microorganismo utilice para su crecimiento. En todos los casos, la actividad de la enzima se presentó a partir de las 24 horas, sin embargo, varió considerablemente a través del tiempo dependiendo del sustrato en cuestión. En el caso del medio de cultivo con nitrato de potasio, se observó que la actividad enzimática fue de 0.085 U/mL a las 24 horas e incrementó al paso del tiempo, llegando a un máximo de 0.251 U/mL a las 96 horas

de incubación. Por otro lado, en el medio con peptona como fuente de nitrógeno, la actividad enzimática a las 24 horas fue de 0.081 U/mL, es decir, muy similar a la acción de la enzima al mismo tiempo de evaluación en el medio con nitrato de potasio. Sin embargo, en el medio con peptona la máxima actividad enzimática alcanzada a las 190 horas fue de 0.350 U/mL, lo cual correspondió a un valor 39.44% mayor que el correspondiente a la máxima actividad registrada en el medio con nitrato de potasio.

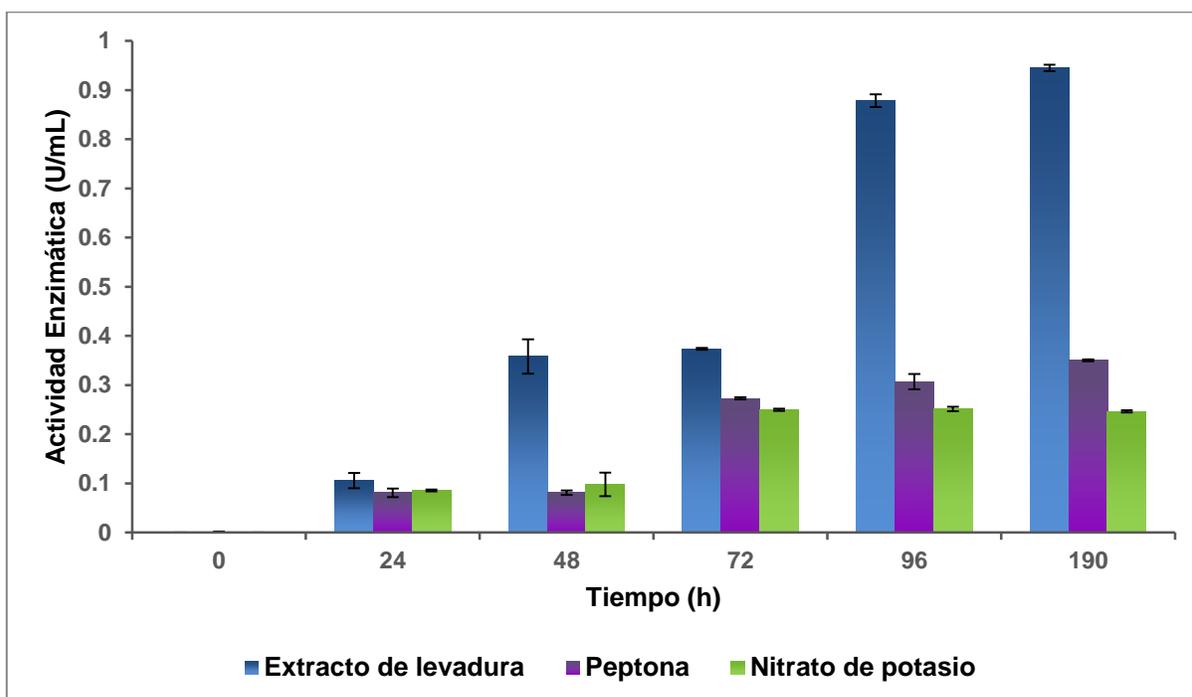


Figura 18. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave al 1.0% m/v, 50°C, pH=5.0, 300 rpm, por 2 horas. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas correspondientes a 9 muestras biológicas independientes.

Por otra parte, en el medio con extracto de levadura se observó un aumento considerable a todos los tiempos evaluados. A las 24 horas, la actividad enzimática fue de 0.106 U/mL, es decir, 24.71% mayor que la actividad que se registró con la inulinasa de la cepa CRT-197 al ser incubada durante 24 horas en un medio con nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno. Además, a las 190 horas la actividad máxima en el medio con extracto de levadura fue de 0.945 U/mL, esto es,

2.7 veces mayor que la máxima actividad registrada en el medio con peptona y 3.8 veces mayor que la máxima acción de la enzima producida por *F. incarnatum* cuando fue incubado en un medio con nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno.

Los resultados obtenidos de actividad enzimática también coincidieron con los resultados de la determinación de proteínas por el método de Bradford, ya que la mayor cantidad de proteínas registrada fue de 2.596 mg en el medio con extracto de levadura. En conclusión, la máxima actividad enzimática que presentó la inulinasa de *F. incarnatum* CRT-197 se obtuvo cuando el microorganismo fue incubado en un medio de cultivo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Como se mencionó anteriormente, el extracto de levadura es una fuente de mezclas de aminoácidos y péptidos que pudieron haber favorecido el crecimiento del microorganismo, así como la producción de proteínas. El resultado que se obtuvo en este ensayo coincide con el reportado por Neera *et al.*, (2018), en el cual se reportó que la actividad enzimática de la inulinasa producida por *Fusarium* sp. aislado de *Dahlia rhizosphere*, incrementó cerca de un 14.0% cuando el microorganismo fue incubado en un medio con extracto de levadura en comparación a cuando fue incubado en un medio con peptona de soya.

7.5.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Una vez definido que la inulina de agave y el extracto de levadura funcionaron como las mejores fuentes de carbono y de nitrógeno, respectivamente, para el crecimiento y producción de inulinasas de la cepa *F. incarnatum* CRT-197, se llevó a cabo la evaluación del efecto de distintos valores de pH en la acción de la enzima. Estas reacciones se llevaron a cabo utilizando inulina de agave como sustrato. Los resultados obtenidos en este ensayo se mostraron en la Figura 19.

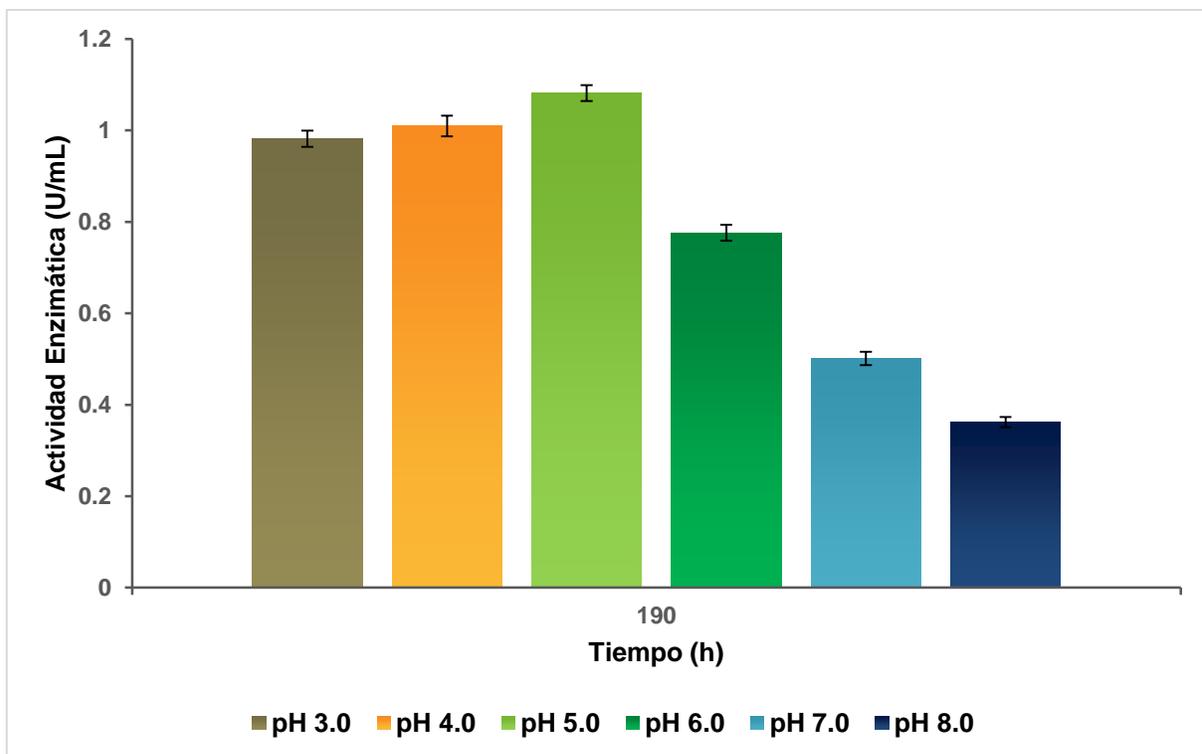


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad enzimática. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave al 1.0% m/v, 50°C, 300 rpm, por 2 horas a distintos valores de pH: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas correspondientes a 18 muestras biológicas independientes.

Se observó que la mayor actividad de la inulinasa producida por la cepa CRT-197 fue de 1.082 U/mL y se mostró a un valor de pH igual a 5.0. En general, analizando los resultados obtenidos, se encontró que la enzima fue más activa a valores de pH ácidos que a valores de pH por encima de 5.0.

Los valores óptimos de pH y temperatura han sido ampliamente estudiados en diversos microorganismos productores de inulinasas. Pandey y colaboradores (1999) reportaron que usualmente el pH óptimo en hongos se encuentra entre 4.5 y 7.0. Dentro del género *Fusarium*, Gupta y colaboradores (1992) reportaron que el valor óptimo de pH de la inulinasa producida por *Fusarium oxysporum* es 6.2. Por otro lado, Neera y colaboradores (2018) encontraron un valor de pH óptimo de 5.0 para conseguir la mayor actividad de la inulinasa producida por una cepa de

Fusarium sp. aislada de *Dahlia rhizosphere*. Por lo tanto, el resultado obtenido en este ensayo, coincidió con lo reportado por Neera *et al.*, (2018).

A pH igual a 3.0 y 4.0 la actividad enzimática fue 9.25% y 6.75% menor respecto al resultado obtenido a pH 5.0. En cambio, a valores de pH cercanos a la neutralidad, entre 6.0 y 8.0, la actividad enzimática disminuyó drásticamente. A pH 6.0 la acción de la enzima disminuyó en un 28.28%. A valor de pH igual a 7.0 la actividad disminuyó un 53.70% y a pH igual a 8.0, se presentó una disminución del 66.54% respecto a la máxima actividad enzimática registrada a pH 5.0.

La disminución de actividad enzimática que se observó cuando *F. incarnatum* se sembró en medios de cultivo con valores de pH menores a 5.0 podría deberse a la represión catabólica causada por los azúcares residuales que se obtienen como producto de la hidrólisis de la agavina. Estudios llevados a cabo Corona y colaboradores (2005) sobre la inulinasa producida por *Saccharomyces* sp. analizaron que a valores de pH cercanos a 5 las polifruktosas en el medio de cultivo son el principal sustrato para el microorganismo pero a pH 4, el sustrato es hidrolizado a fructosa y glucosa que causan una represión catabólica, es decir, una disminución de la actividad enzimática de la inulinasa producida.

7.5.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Después de determinar el pH óptimo para la producción de inulinasas de *Fusarium incarnatum* CRT-197, se evaluó el efecto de distintas temperaturas sobre la acción de la enzima producida: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C. De igual forma, estas reacciones se llevaron a cabo utilizando agavina como sustrato.

Los resultados se presentaron en la Figura 20. Se observó que el máximo de actividad enzimática fue de 1.062 U/mL, cuando se analizó a una temperatura de 50°C y al seguir aumentando la temperatura se perdió la actividad. A los 60°C la actividad disminuyó cerca de un 71.09% respecto a la actividad máxima alcanzada. Finalmente, a los 70°C se presentó un descenso del 80.32%. Esta disminución de la actividad puede deberse a un proceso de desnaturalización, ya que la temperatura afecta la estructura general de las proteínas responsables.

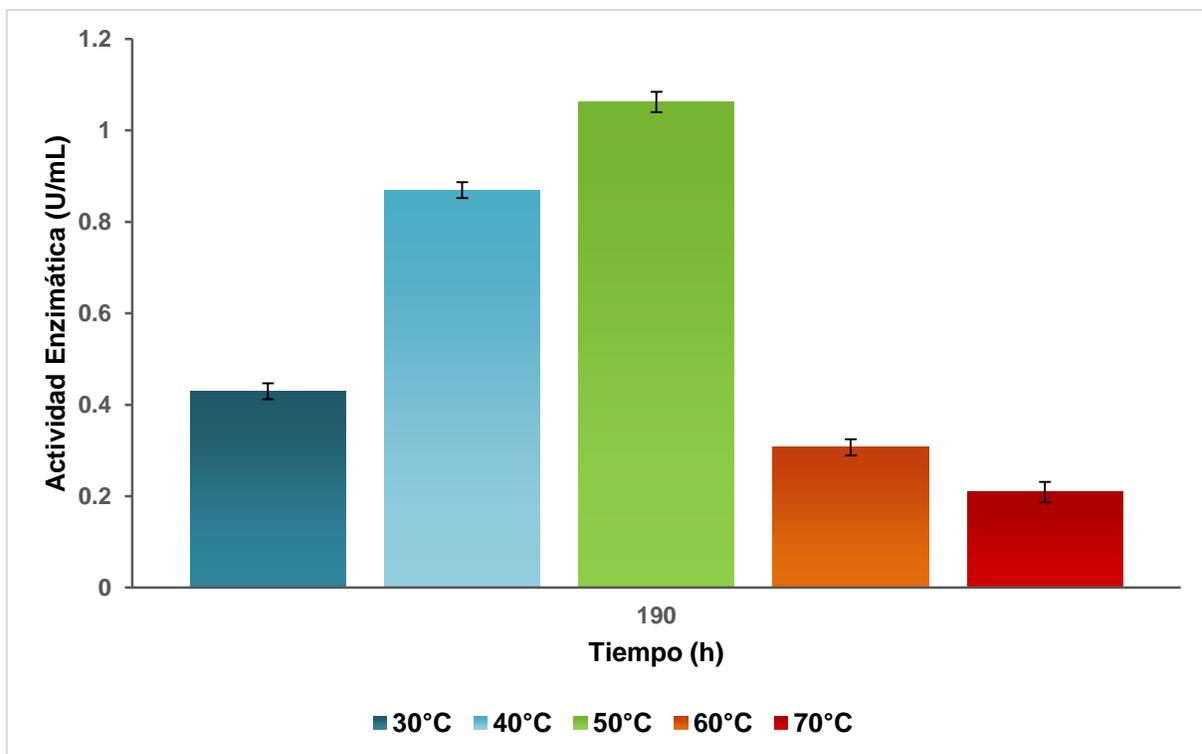


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave al 1.0% m/v, pH 5.0, 300 rpm, por 2 horas a distintas temperaturas: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas correspondientes a 15 muestras biológicas independientes.

Por otra parte, como se observó en la Figura 20, al disminuir la temperatura óptima también se presentó un descenso en la acción de la inulinasa. A 40°C, la actividad enzimática disminuyó un 18.17% respecto a la máxima obtenida a 50°C. De la misma forma, al reducir la temperatura a 30°C, la actividad de la inulinasa evaluada, decreció aproximadamente en un 59.51% respecto a la actividad máxima registrada.

Evaluar el efecto de la temperatura en la actividad enzimática resultó de suma importancia ya que es usualmente una limitante de la estructura de las proteínas. Además, la temperatura a la cual ocurre la desnaturalización de las enzimas, es distinta en cada caso. La relación que se observó entre la temperatura y la actividad enzimática reflejó un doble efecto de la temperatura: positivo a bajos valores, debido al incremento general que experimentó la velocidad de la reacción química al existir

un aumento en la temperatura, y negativo a valores altos, debido a la desnaturalización térmica de la enzima. Esto es, la velocidad de una reacción enzimática se incrementó al aumentar la temperatura dentro de un determinado rango, alcanzando un valor máximo a la denominada temperatura óptima. Sin embargo, a valores superiores la actividad disminuyó debido a que la enzima sufrió procesos de desnaturalización y, por lo tanto, de inactivación (Bisswanger, 2019).

Pandey y colaboradores (1999) señalaron que la temperatura óptima para la producción de inulinasas en hongos, es comúnmente menor que la óptima para bacterias y levaduras. Sin embargo, la temperatura óptima determinada para la inulinasa producida por la cepa de *Fusarium incarnatum* CRT-197 (50°C) fue similar a la temperatura óptima que ha sido determinada para la inulinasa producida por levaduras y bacterias como *Kluyveromyces fragilis*, con una temperatura óptima de 55°C (Kaur *et al.*, 1994) y *Arthrobacter* sp. con un valor óptimo de temperatura igual a 50°C (Kang *et al.*, 1998).

Respecto al género *Fusarium*, Gupta (1992) reportó que el valor óptimo de temperatura para la mayor actividad de la inulinasa producida por *Fusarium oxysporum* fue de 37°C. Por otra parte, Neera y colaboradores (2018) reportaron una temperatura óptima de 55°C para conseguir la mayor actividad de la inulinasa producida por una cepa de *Fusarium* sp. aislada de *Dahlia rhizosphere*.

De esta forma, se distingue que la temperatura óptima puede variar de especie en especie dentro de un mismo género y, en consecuencia, es vital evaluar su efecto en la actividad de la inulinasa producida por cada microorganismo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, como analizaron Ricca y colaboradores (2007), los valores de pH y temperatura óptimos encontrados en estos ensayos no son necesariamente los que se utilizan a nivel industrial, ya que existen muchos otros factores que deben tomarse en cuenta, como son la estabilidad térmica de la enzima, el riesgo de contaminación y la solubilidad de la inulina.

Tras la optimización del medio de cultivo en el cual fue incubada la cepa de *F. incarnatum* CRT-197, con inulina de agave como fuente de carbono y extracto de

levadura como fuente de nitrógeno, se determinaron los valores de pH=5.0 y temperatura igual a 50°C, como los óptimos para conseguir la mayor acción de la inulinasa producida: 1.062 U/mL, lo cual es un valor mínimo comparado con la actividad enzimática que muestran otros microorganismos productores de inulinasas, como *Aspergillus niger* que presentaron actividades enzimáticas en un rango de valores de 35.18 U/mL (Skowronek y Fiedurek, 2003) hasta 60 U/mL (Poorna y Kulkarni, 1995).

Sin embargo, la evaluación de la producción de inulinasas en una especie perteneciente al género *Fusarium* resultó relevante ya que ha sido escasamente evaluada únicamente en dos especies: *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Por lo tanto, el presente estudio demostró por primera vez la capacidad de *Fusarium incarnatum* de producir inulinasas.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó que las cepas de *Fusarium* sp. aisladas del agave fueron capaces de producir enzimas con actividad inulinolítica y que el nivel de producción de estas enzimas se vió afectado por las condiciones del medio de cultivo en el que el microorganismo creció.
- Se encontró que la mejor fuente de carbono para la producción de inulinasas por la cepa de *Fusarium incarnatum* CRT-197 fue la inulina de *Agave tequilana* Weber variedad azul. Por otra parte, la mejor fuente de nitrógeno para este fin, es el extracto de levadura.
- Se estableció un valor de pH óptimo igual a 5.0 y una temperatura óptima de reacción igual a 50°C para conseguir la máxima actividad igual a 1.062 U/mL de la inulinasa producida por *F. incarnatum* CRT-197.

9. PERSPECTIVAS

- Purificación de la inulinasa producida por *Fusarium incarnatum* CRT-197 y su posterior caracterización cinética.
- Estudio sobre la posible estructura y peso molecular de las inulinasas producidas por *Fusarium incarnatum* CRT-197.
- Identificación del gen codificante de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT-197 para su posible sobreexpresión con el fin de conseguir una mayor producción de inulinasas.

10. REFERENCIAS

Abdel-Monaim, M. F.; Abo-Elyousr K. A. M., y Morsy, K. M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop protection*, 30(2), 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.016>

Aguirre, J.R., Charcas, H. y Flores, J.L. (2001). *El maguey mezcalero potosino*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. <http://www.campopotosino.gob.mx/phocadownload/Documentos/Descargas/MAGUEY-MEZCALERO-POTOSINO.pdf>

Arrizón, J., Urias, J., Sandoval, G., Mancilla, N., Gschaedler, A., Morel, S. y Monsan, P. (2014). Production and Bioactivity of Fructan-Type Oligosaccharides. *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*, 184-199. <https://doi.org/10.1002/9781118817360.ch11>

Ávila, M.E., López, J.G., Arias, C., Rodríguez, M., Guzmán, D.A., Vera, J.A. y Peña, J.J. (2010). Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 12, 166-180. <http://jpacd.org/jpacd/article/view/106/85>

Bautista, J.M., García, L., Barboza, J.E. y Parra, L.A. (2001). El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria*, 11 (2), 26-34. <https://www.redalyc.org/pdf/416/41611203.pdf>

Bisswanger, H. (2019). *Practical Enzymology*. Wiley-Blackwell. <https://www.wiley.com/en-us/Practical+Enzymology,+3rd+Edition-p-9783527346042>

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Chabbert, N., Braun, P., Guiraud, J. y Arnoux, M. (1985). Productivity and fermentability of Jerusalem artichoke according to harvesting date. *Biomass*, 3 (3), 209-224. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(83\)90013-6](https://doi.org/10.1016/0144-4565(83)90013-6)

CONABIO: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2005). *Primera edición del mapa “Agave, mezcales y diversidad”*. <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/mezcales/mMapa.html>

Consejo Regulador del Tequila. (2019). *Anuario estadístico de producción del sistema agave-tequila*. <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>

Corona, R. I., Pelayo, C., González, V. y Zúñiga, V. (2005). Optimización de la producción de inulinasas por *Saccharomyces* sp. a partir de Agave tequilana Weber variedad azul. *e-Gnosis*, 003. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000308>

Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. y Staver, C. (2018). Fusarium wilt of Banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>

Edelman, J. y T. Jefford. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytology*, 67: 517-531. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1968.tb05480.x>

García, A. J. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México*, 087 (1).
<http://www.revistas.unam.mx/index.php/cns/article/view/12113>

García, D.; Ramos, A. J.; Sanchis, V., y Marín, S. (2012). Effect of Equisetum arvense and Stevia rebaudiana extracts on growth and mycotoxin production by Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides in maize seeds as affected by water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 21-27.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.010>

Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 59 (2), 257-268.
<https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

Gourmet de México. (2019). *Tequila: El arte de la destilación jalisciense*.
<https://gourmetdemexico.com.mx/turista-gastronomico/tequila-el-arte-de-la-destilacion-jalisciense/>

Granados, D. (1999). *Los Agaves en México*. Universidad Autónoma Chapingo. pp. 235-252. <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000009579>

Gupta, A. K., Kaur, M., Kaur, N., y Singh, R. (1992). A comparison of properties of inulinases of *Fusarium oxysporum* immobilized on various supports. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 53, 293–296.
<https://doi.org/10.1002/jctb.280530310>

Hadian, S.; Rahnema, K.; Jamali, S., y Eskandari, A. (2011). Comparing neem extract with chemical control on Fusarium oxysporum and Meloidogyne incognita complex of tomato. *Advances in Environmental Biology*, 5(8), 2052-2057.
<https://doi.org/10.1002/jctb.280530310>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2019). *Conociendo la industria del tequila y el mezcal*. Colección de estudios sectoriales y regionales. <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825189600>

Kang, S., Chang, Y., Oh, S. y Kim, S. (1998) Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. *Biotechnology Letters*, 20 (10), 983-986. <https://doi.org/10.1023/A:1005440910352>

Kango, N. y Jain, S.C. (2011) Production and Properties of Microbial Inulinases: Recent Advances. *Food Biotechnology*, 25 (3), 165-212. <https://doi.org/10.1080/08905436.2011.590763>

Kaur, N., Gupta, A. K., Singh, D. P. y Singh, R. (1994). Production purification and immobilisation of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 59, 377. <https://doi.org/10.1002/jctb.280590411>

Kochhar, A., Gupta, A. y Kaur, N. (1999). Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 549-554. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990315\)79:4%3C549::AID-JSFA216%3E3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990315)79:4%3C549::AID-JSFA216%3E3.0.CO;2-0)

Kropp, H. y Halasey, A. (2008). *Plantas CAM*. <https://askabiologist.asu.edu/plantas-c-a-m>

León, E., Violante, J., Monks, S., Cadena, J. y Araujo, C. (2015). Los agaves mezcaleros del altiplano Potosino y Zacatecano. *Estudios en Biodiversidad*, 20. <http://digitalcommons.unl.edu/biodiversidad/20>

Leslie, J. y Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>

Li, A., Guo, L., Fu, Q. y Lu, W. (2011). A simple and rapid plate assay for screening of inulindegrading microorganisms using Lugol's iodine solution. *African Journal of Biotechnology*, 10(46), 9518-9521. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1367>

Lin, W., Guosheng, L., Linsong, W., Zhihong, Z., Jinhui, H. y Huimin, G. (1998). The optimal conditions for cellulase activity measurement with DNS method. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 26(3), 66-69.

Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F. y Fan, Z. (2006). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering*, 79 (3), 1087-1093. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.03.028>

López, M., Mancilla, N. y Mendoza, G. (2003) Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27), 7835-7840. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>

Ma, L., Geiser, D., Proctor, R., Rooney, A., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D., Manners, J. y Kazan, K. (2013). *The Annual Review of Microbiology*, 67, 399-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>

Macías, G., Veana, F., Contreras, J.C., Aguilar, C.N. y Rodríguez, R. (2016) Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum* cultivado en diferentes niveles de glucosa y pectina. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 67(1), 33-37. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/674/674446178005/index.html>

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 3 (3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Montañez, J., Venegas, J., Vivar, M. y Ramos, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro*, 23 (3), 199-206. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85721149007>

Nakamura, T., Ogata, Y., Shitara, A., Nakamura, A. y Ohta, K. (1995). Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of Fermentations Bioengineering*, 80(2): 164-169. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)93213-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)93213-4)

Neera, Ramana, K.V., Gopalan, N. y Sharma, R.K. (2018) Production of Inulinase by *Fusarium* sp. and its Application for Fructooligosaccharide Production for use as Prebiotics. *Defence Life Science Journal*, 3(1), 45-50. <https://doi.org/10.14429/dlsj.3.12411>

Ohta, K., Hamada, S. y Nakamura, T. (1993). Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 729-733. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.729-733.1993>

Pandey, A., Soccol, C. R., Selvakumar, P., Soccol, V. T., Krieger, N., y Fontana, J. D. (1999). Recent developments in microbial inulinases. *Applied biochemistry and biotechnology*, 81 (1), 35–52. <https://doi.org/10.1385/ABAB:81:1:35>

Pascual, C., Barcos, A., Mandap, J. & Ocampo, E. (2016). Fumonisin-Producing Fusarium Species Causing Ear Rot of Corn in the Philippines. *Philippine Journal of Crop Science*, 41 (1), 12-21. https://www.researchgate.net/profile/Ana_Barcos/publication/305809751_Fumonisin-Producing-Fusarium-Species-Causing-Ear-Rot-of-Corn-in-the-Philippines/links/57a2c8c008ae5f8b258cb55b/Fumonisin-Producing-Fusarium-Species-Causing-Ear-Rot-of-Corn-in-the-Philippines.pdf

Poorna, V. y Kulkarni, P. R. (1995). A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. *Bioresource Technology*. 54 (3), 315–320. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00156-5)

Ramírez, M., Mancilla, A., Meza, L., Turincio, R., Guzmán, D. y Ávila, M.E. (2017). Epidemiology of Fusarium agave wilt in Agave tequilana Weber var. azul. *Plant Protection Science*, 53(3), 144-152. <https://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>

Rawat, H.K., Ganaie, M.A. y Kango, N. Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 799–811. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0373-3>

Ricca, E., Vincenza, C., Curcio, S. y Iorio, G. (2007). The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical reviews in biotechnology*, 27, 129-145. <https://doi.org/10.1080/07388550701503477>

Sharma, B., y Kumar, P. (2009). In vitro antifungal potency of some plant extracts against *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Green Pharmacy*, 3(1), 63-65. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.49377>

Singh, P. y Gill, P.K. (2006). Production of inulinases: Recent Advances. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 151–162.

Singh, R.S. y Singh, R.P. (2017) Inulinases. En Ashok Pandey (Ed.), Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products (pp. 423-446). *Elsevier Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00018-X>

Singha, I. M.; Kakoty, Y.; Unni, B. G.; Kalita, M. C.; Das, J.; Naglot, A., y Singh, L. (2011). Control of Fusarium wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of Piper betle L.: a preliminary study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11), 2583-2589. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0730-6>

Skowronek, M. y Fiedurek, J. (2003). Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *Journal of Applied Microbiology*. 95(4), 686–692. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02027.x>.

Tapia, C. y Amaro, J. (2014) Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 31 (1), 85-86. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012>

Trapala, J. (2017). *Obtención y caracterización de inulinasas a partir de Kluyveromyces sp. en la hidrólisis de agavina*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/GX2F8ESBLJTBEN3C6NH69PNASBRCHLUF63XLTNK8VUUJKQGDAC-51071?func=full-setset&set number=007198&set entry=000008&format=999>

Vandamme, E.J. y Derycke, D.G. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 29, 139-176. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70356-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70356-3)

Villa, A., Pérez, R., Morales, H.A., Basurto, M., Soto, J.M. y Martínez, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64 (2), 194-205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

Zavala, M.A. (1995). *Caracterización de inulinasa de Kluyveromices fragilis CDBL- 278 y de invertasa de Saccharomyces cereviseae por dicroismo circular*. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=508&docs=UAM0508.PDF>