



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de *Fusarium verticillioides* para la
producción de enzimas de interés
biotecnológico**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA :

PABLO ADRIÁN MENDOZA LEYTE



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.,2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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:	Profesor: Eduardo Barzana García
VOCAL:	Profesora: Beatriz Ruiz Villafán
SECRETARIO:	Profesora: Carmina Montiel Pacheco
1er. SUPLENTE:	Profesora: Norma Angelica Castellanos Chávez
2° SUPLENTE:	Profesor: Genaro Jiménez Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 314, Departamento de alimentos y biotecnología, conjunto "E", Facultad de Química, circuito de la investigación científica s/n, Ciudad Universitaria, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra: Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Pablo Adrián Mendoza Leyte

Agradecimiento al proyecto DGAPA PAPIIT IN219520 por el financiamiento otorgado a este proyecto y al PAIP 9153 de la Facultad de Química.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	10
2.2 Mecanismo de patogénesis.....	15
3. Agave	17
3.1.1 <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul.....	18
3.1.2 Residuos agroindustriales del agave.....	20
4. Fructanos	20
4.1.1 Aplicaciones y producción de fructanos	22
5. Enzimas	24
5.1.1 Inulinasas	26
6. Hipótesis	30
7. Objetivo General	30
7.1 Objetivos particulares.....	30
8. Materiales y Métodos	31
8.1 Materiales	31
8.2. Métodos.....	32
8.2.1 Preparación de medios de cultivo	32
8.3 Determinación de la actividad de inulinasas	32
8.3.1 Determinación de azúcares reductores por DNS	33
8.3.2 Reacción enzimática	34
8.3.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	34
8.3.5 Determinación de actividad enzimática por cromatografía en capa fina (CCF).....	35
8.4 Conteo de conidios por el método de Neubauer	35
8.5 Purificación y mantenimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> spp.....	36
8.6 Determinación de proteínas por método Bradford.	38
9. Resultados	39
9.1 Tinción por impronta con azul de lactofenol a <i>F. verticillioides</i> y <i>F. oxysporum</i>	39
9.1.2 Evaluación del crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. en medio sólido.....	40

9.1.3 Efecto de la concentración de inulina sobre el crecimiento de <i>F. verticillioides</i>	42
9.2 Comparación de crecimiento entre las distintas cepas de <i>Fusarium</i> spp. donadas por consejo regulador de tequila (CRT).....	44
9.3 Prueba cualitativa de la actividad enzimática de <i>Fusarium</i> spp.	50
9.4 Evaluación del consumo de inulina de agave por <i>F. verticillioides</i> en medio líquido de cultivo	52
9.5 Evaluación de la actividad inulinolítica de los extractos de <i>F. verticillioides</i> sobre inulina de agave	54
9.6 Efecto del pH inicial sobre el consumo de inulina y la actividad enzimática de <i>F. verticillioides</i>	56
9.6.1 Cromatografía en capa fina prueba complementaria de actividad enzimática	58
9.7 Efecto de la temperatura en el consumo de inulina por <i>F. verticillioides</i> en medio líquido	60
9.8 Cuantificación de proteína.....	61
9.9 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la inulinasa de <i>F. verticillioides</i>	63
10. Efecto de pH sobre la actividad enzimática.....	64
11. Efecto del sustrato sobre la actividad enzimática (<i>F. verticillioides</i>)...64	64
12. Conclusiones	66
13. Perspectivas	67
14. Anexo.....	68
15. Bibliografía.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología microscópica de <i>Fusarium</i> spp.....	12
Figura 2. Morfología de clamidospora <i>Fusarium</i> spp.	13
Figura 3. Morfología general de <i>F. verticillioides</i>	14
Figura 4: Morfología general de <i>F. oxysporum</i>	15
Figura 5. Patrón de patogénesis de <i>F. verticillioides</i> al maíz	16
Figura 6: Estructura de inulina y levana	21
Figura 7. A: inulina. B: Levana. C: inulina presente en <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul.	22
Figura 8. Estructura de una fructosilhidrolasa de la familia GH32, invertasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (PDB 2AC1).	28
Figura 9. Estructura cristalográfica de una exo-inulinasa de <i>A. awamori</i> . Representación de la superficie y del sitio activo con sustrato (fructosa).	29
Figura 10. Estructura cristalina de una endo-inulinasa (<i>A.ficum</i>).....	29
Figura 11: Características microscópicas y macroscópicas de <i>F. verticillioides</i> y <i>F. oxysporum</i> , muestras tomadas de medio inulina de agave 1%.....	40
Figura 12. Crecimiento radial de <i>F.verticillioides</i> y <i>F. oxysporum</i> (mm/h). Medio con inulina al 1% (tiempo [h] contra radio [mm]).	41
Figura 13. Efecto de la concentración de inulina en el medio sobre el crecimiento de <i>F.verticillioides</i> . Medio con inulina de agave a concentraciones de 0.1 a 3 % como única fuente de carbono.	43
Figura 14. Efecto de la concentración de sustrato en el crecimiento de <i>F.verticillioides</i> en medio sólido.....	44
Figura 15. Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> spp. medio sólido con Inulina de agave al 1%.	45
Figura 16. Crecimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> spp. donadas por el CRT, en medio sólido con inulina de agave 1%.	45
Figura 17. Velocidades de crecimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> spp. en medio con inulina 1%	47
Figura 18. Velocidad radial de las cepas de <i>Fusarium</i> spp. en medio con inulina al 1%.....	47
Figura 19. Muestra de cepas no puras/Muestra de selección de micro-colonia	49

Figura 20. Cepas de <i>Fusarium</i> spp. purificadas sembradas en medio PDA 50%.	50
Figura 21. Cepas de <i>Fusarium</i> spp. sometidas a la prueba cualitativa de actividad inulinolítica (Reacción con lugol).	51
Figura 22. Comparativo del Crecimiento y consumo de inulina por <i>F. verticillioides</i> .	53
Figura 23. Cromatografía en capa fina pruebas 1 y 2	54
Figura 24. CCF para observar los productos de la actividad enzimática del sobrenadante posterior al consumo total de inulina.	55
Figura 25. Efecto del pH sobre la producción de azúcares reductores generados por <i>F. verticillioides</i> .	56
Figura 26. Efecto del pH inicial del medio de cultivo, sobre la actividad enzimática (mU/ml) de <i>F. verticillioides</i> .	57
Figura 27. Imágenes de los medios líquidos fijados a pH 4, 6 y 7 a 168 h de incubado	58
Figura 29. Efecto de la temperatura sobre la producción de fructosa por <i>F. verticillioides</i> .	60
Figura 30. Efecto de la temperatura inicial del medio de cultivo sobre la actividad enzimática.	61
Figura 31. Concentración de proteína generada a distintos pH de medio de cultivo con inulina de agave 1%	62
Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.	63
Figura 33. Efecto del pH sobre la actividad enzimática, utilizando extracto tomado del sobrenadante de medio de cultivo (<i>F. verticillioides</i>) a pH 6 a 30 °C.	64
Figura 34. Actividad enzimática con distintas fuente de inulina (agave vs achicoria).	65
Figura 1A. Curva patrón de fructosa para análisis cuantitativos.	68
Figura 2A. Curva pátron (BSA) para cuantificación de proteína método Bradford.	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tipos de agave, estado donde se encuentra y uso.....	18
Tabla 2: Composición química de las fracciones de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul (% base húmeda)	19
Tabla 3: Azúcares reductores totales contenidos en las fracciones de la planta <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul (% base seca)	19
Tabla 4. Aplicaciones de los FOS (fructooligosacáridos) en la industria alimentaria	23
Tabla 5. Plantas que contienen inulina y su contenido referido a producto fresco.....	24
Tabla 6: Clasificación internacional de las enzimas.....	26
Tabla 7. Microorganismos productores de inulinasa.....	27
Tabla 8. Preparación de muestras para determinación de azúcares reductores.....	34
Tabla 9. Conteo de conidios de cepas puras <i>Fusarium</i> spp.	36
Tabla 10. Cepas <i>Fusarium</i> spp. donadas por el consejo regulador del tequila (CRT).....	37
Tabla 11. Crecimiento de <i>F. verticillioides</i> y <i>F.oxysporum</i> en medio con inulina 1%	41
Tabla 12. Crecimiento radial (V_r) y velocidad de crecimiento(μ) de <i>F. verticillioides</i> a distintas concentraciones de inulina	42
Tabla 13. Velocidad de crecimiento(μ), velocidad radial (V_r) de <i>Fusarium</i> spp.....	46

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son una clase considerablemente versátil de organismos comprendida principalmente por saprofitos. Un número relativamente pequeño ha desarrollado un estilo de vida parasitario que se caracteriza por su habilidad de reconocer y penetrar a un hospedero específico, aprovechando sus nutrientes y superando su mecanismo de defensa innata, de esta forma se consolidan y desarrollan causando enfermedad y muerte en organismos eucariotas (Ortoneda *et al.*, 2004).

Para causar enfermedad, los hongos patógenos muestran un arsenal de factores de virulencia específicos entre los cuales podemos encontrar complejos enzimáticos y micotoxinas que inciden de forma directa o indirecta en los mecanismos de defensa del hospedero (Casadevall, 2007).

El género *Fusarium* spp., comprende un amplio y diverso grupo de especies de distribución mundial, frecuentemente aislados como saprofitos en aguas, suelos y substratos orgánicos en descomposición (Sanabria *et al.*, 2002). La distribución de este género se debe a su capacidad para crecer en diferentes substratos y a sus eficientes métodos de dispersión (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

Como fitopatógenos las especies del género *Fusarium* spp., infectan un gran número de cultivos de importancia económica, por lo que la presencia de estas especies en los suelos impide la siembra continua de campos de cultivo (Agrios, 2005, Sanabria *et al.*, 2002).

En México este microorganismo se ha aislado del agave y del maíz en donde se ha observado marchitez, generando grandes pérdidas económicas. Dentro de las enzimas que produce *Fusarium* spp., al infectar a las plantas se pueden encontrar, celulasas, pectinasas, glucosidasas e incluso inulinasas.

Dado la gran habilidad de este hongo para causar enfermedad en plantas, animales y humanos, este trabajo se plantea resolver si es posible utilizar con

fines biotecnológicos la capacidad enzimática inulinolítica del hongo *Fusarium verticillioides*, aislado de maíz infectado y utilizando únicamente inulina de agave como fuente de carbono.

2. MARCO TEÓRICO

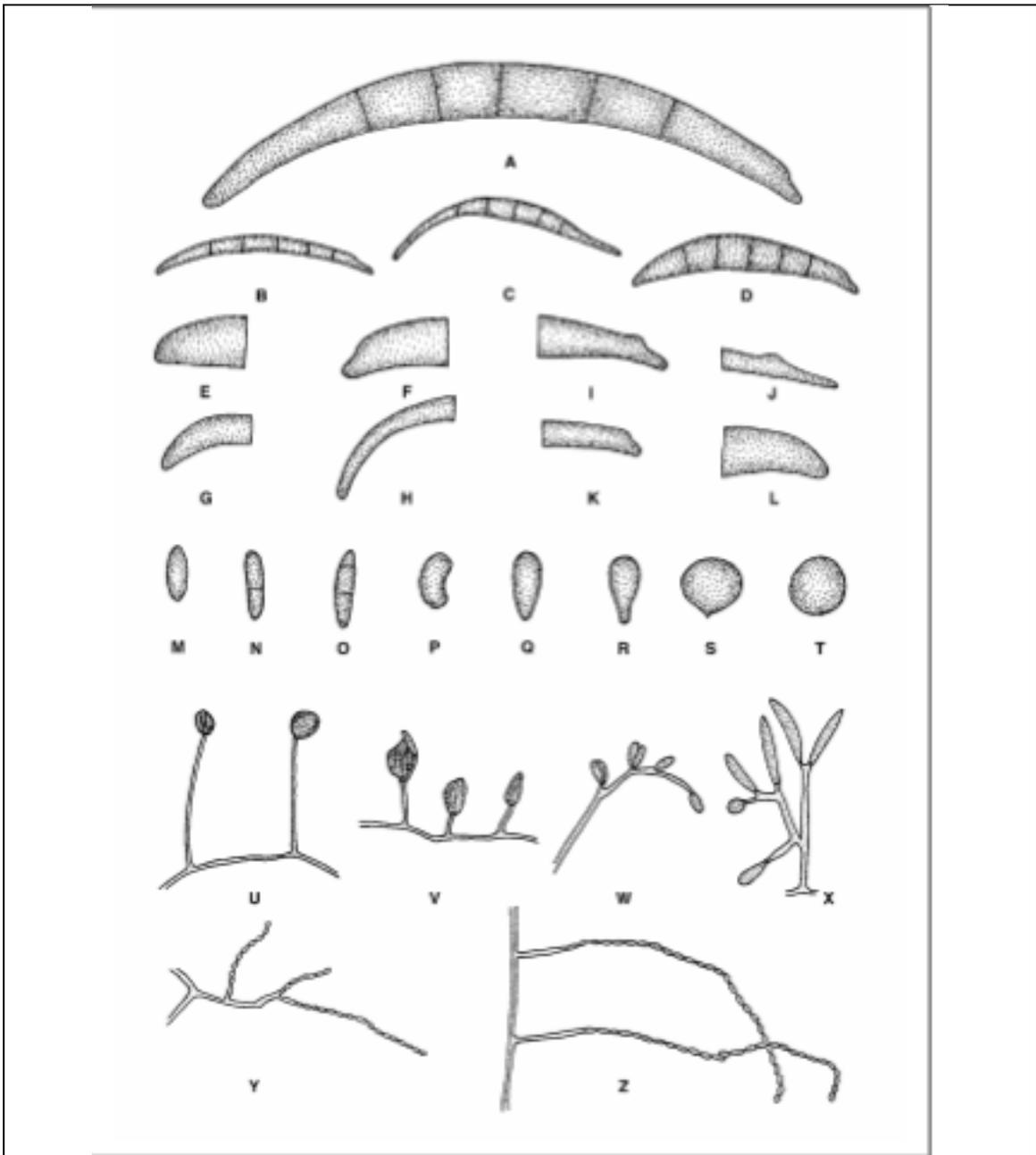
Fusarium spp., es un hongo filamentoso ampliamente distribuido en el suelo y plantas. Este género es responsable del marchitamiento vascular en plantas afectando un gran número de cultivos importantes económicamente como el ajo, el algodón, la arveja, el banano, el brócoli, la calabaza, el chile, la fresa, la linaza, el tomate, el melón, el maíz, el trigo, el sorgo, el arroz, el clavel, los crisantemos y los tulipanes, entre otros (Ortoneda *et al.*, 2004; Groenewald, 2006). Es un patógeno emergente de animales y humanos, algunas especies producen toxinas que los afectan, además debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas. Pueden causar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, con una alta mortalidad. De las más de 100 especies de *Fusarium* descritas, sólo 12 de ellas pueden considerarse patógenas para el humano, entre ellas destacan *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, en orden decreciente de frecuencia (Leslie, J., y Summerell, A., 2006).

Existen muchas especies aún no identificadas del género *Fusarium*, esto se debe a un alto grado de variaciones morfológicas y fisiológicas entre las especies de este género, esto explica la alta capacidad de *Fusarium* spp., para colonizar distintos nichos ecológicos en distintas áreas geográficas (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

2.1 *Fusarium* spp.

Fusarium spp., crece rápidamente en medio PDA a 25°C produciendo un micelio algodonoso e incoloro al principio, conforme madura el micelio adquiere una pigmentación color crema-pálido, amarillo-pálido y bajo ciertas condiciones adquiere una tonalidad rosa-pálido, rojo o púrpura (Díaz de Castro *et al.*, 2007). Crece en un rango óptimo de temperaturas que van de los 22.5 a 27.5°C, con un máximo de 32-37° C y mínimo de 2.5-5°C (Bacon y Nelson, 1994 citado por Granjo *et al.*, 2007).

Al microscopio (figura 1) *Fusarium* spp., presenta hifa simple o ramificada con forma cilíndrica, monofiálide o polifiálide. Los macroconidios presentan forma de medialuna u hoz, hialinos (sin color) y septados, los microconidios poseen varias formas (fusiformes, forma oval o clavadas) y en algunas especies pueden observarse las clamidosporas con doble pared, lisa o gruesa de manera aislada o agrupadas (Leslie, J. y Summerell, A., 2006).



A-D: Forma de macroconidias. **E-H:** Formas de células apicales de las macroconidias. **K-L:** Formas de las células basales de las macroconidias. **M-T:** Forma de microconidias. **U-X:** Morfologías de la fiálide (U y V monofiálide; W y X polifiálide). **Y-Z:** Forma de la hifa al microscopio (Y ramificada y Z simple).

Figura 1: Morfología microscópica de *Fusarium* spp. (imagen tomada y modificada de Leslie y Summerell, 2006).

Las clamidosporas (figura 2) contienen un material lipídico que le permite al hongo sobrevivir en situaciones adversas, pueden estar solas, en pares, cadenas o grupos. Este tipo de esporas se forman en los cultivos de hongo dependiendo de la especie de *Fusarium* spp., así como en el suelo en donde sobreviven durante más tiempo (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

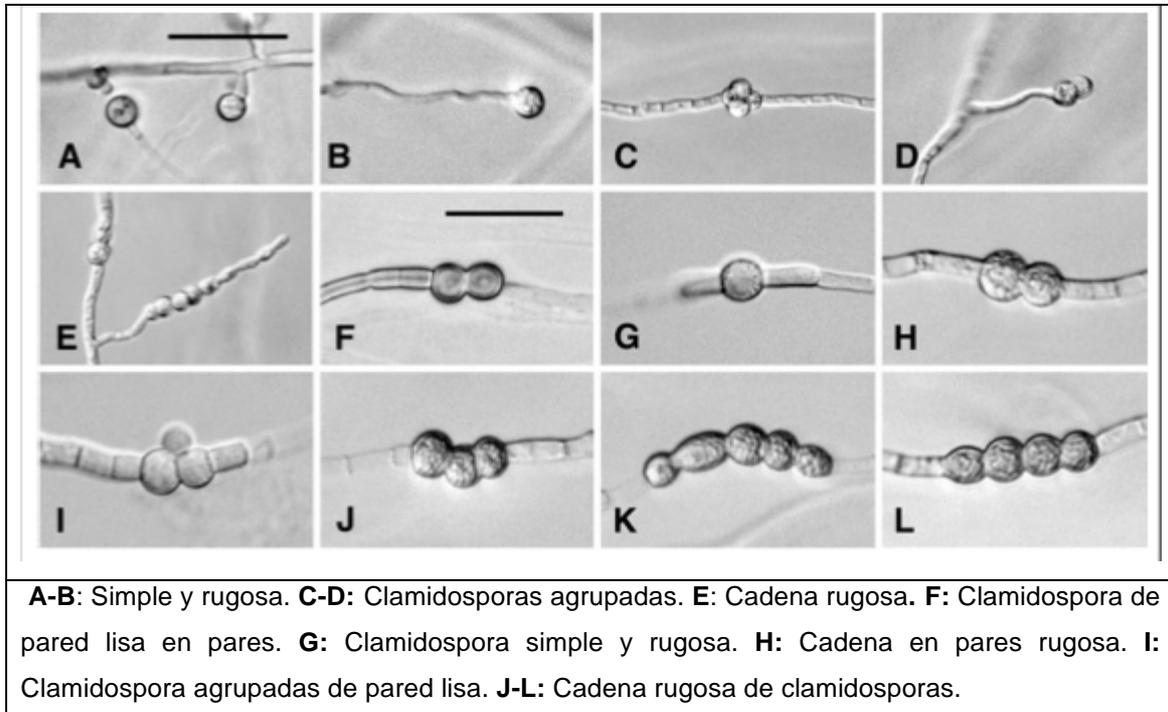


Figura 2. Morfología de clamidospora *Fusarium* spp. (imagen tomada y modificada de Leslie y Summerell, 2006).

2.1.1 *Fusarium verticillioides*

F. verticillioides (*F.moniliforme*) es un hongo filamentoso perteneciente a la sección liseola del complejo de especies de *Gibberella fujikuroi* (Leslie y Summerell, 2006). Es responsable de producir enfermedades en plantas, particularmente en zonas tropicales y subtropicales, también ha sido aislado de otros cereales de importancia como el arroz, sorgo, trigo y avena (Bacon y Nelson, 1994 citado por Granjo *et al.*, 2007). Su importancia biotecnológica radica en su potencial infeccioso en la agricultura, ocasionado por la producción de complejos enzimáticos y micotoxinas, siendo el patógeno primario del maíz en todo el mundo.

Las colonias son de crecimiento moderadamente rápido de 8 cm a los 7-8 días de color blanco y violeta en medio PDA. Las microconidias son abundantes, generalmente de una célula, oval a ovoide, las hifas pueden ser monofiáides y polifiáides. Las macroconidias están presentes, pero son escasas y varía su forma levemente de curva (3-5 septos en forma de hoz) a casi rectas. Las clamidosporas están ausentes en esta especie (Leslie y Summerell, 2006).

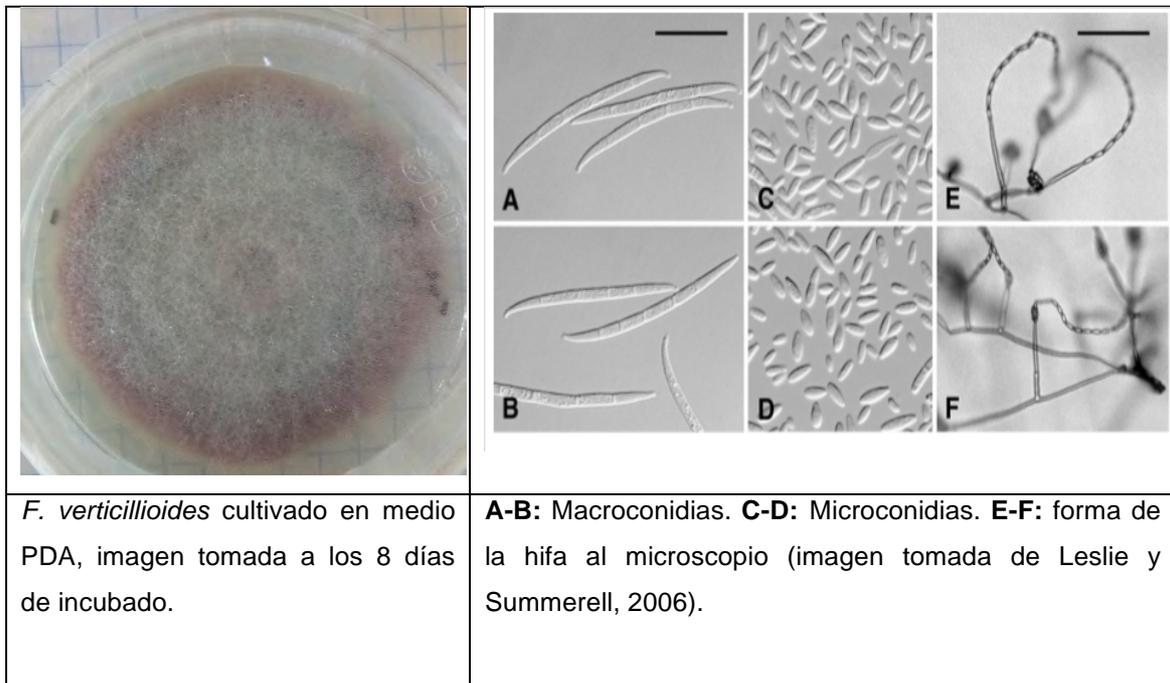


Figura 3. Morfología general de *F. verticillioides*.

2.1.2 *Fusarium oxysporum*

Las colonias presentan un aspecto veloso en el centro y difuso en el resto del micelio, es de crecimiento ligeramente lento (7 cm a los 8 días de inoculado) un aspecto importante es el desarrollo de pigmento en su micelio, inicialmente es blanco y conforme pasan los días se torna de color púrpura. Las microconidias son hialinas de forma oval con una o dos células, la hifa puede ser corta, simple o ramificada, las macroconidias se forman en el esporodoquio, son septadas con 3-5 septos. A diferencia de *F. verticillioides*, las clamidosporas existen y son terminales o intercalares y generalmente redondeadas (Sanabria *et al.*, 2002, Agrios, 2005).

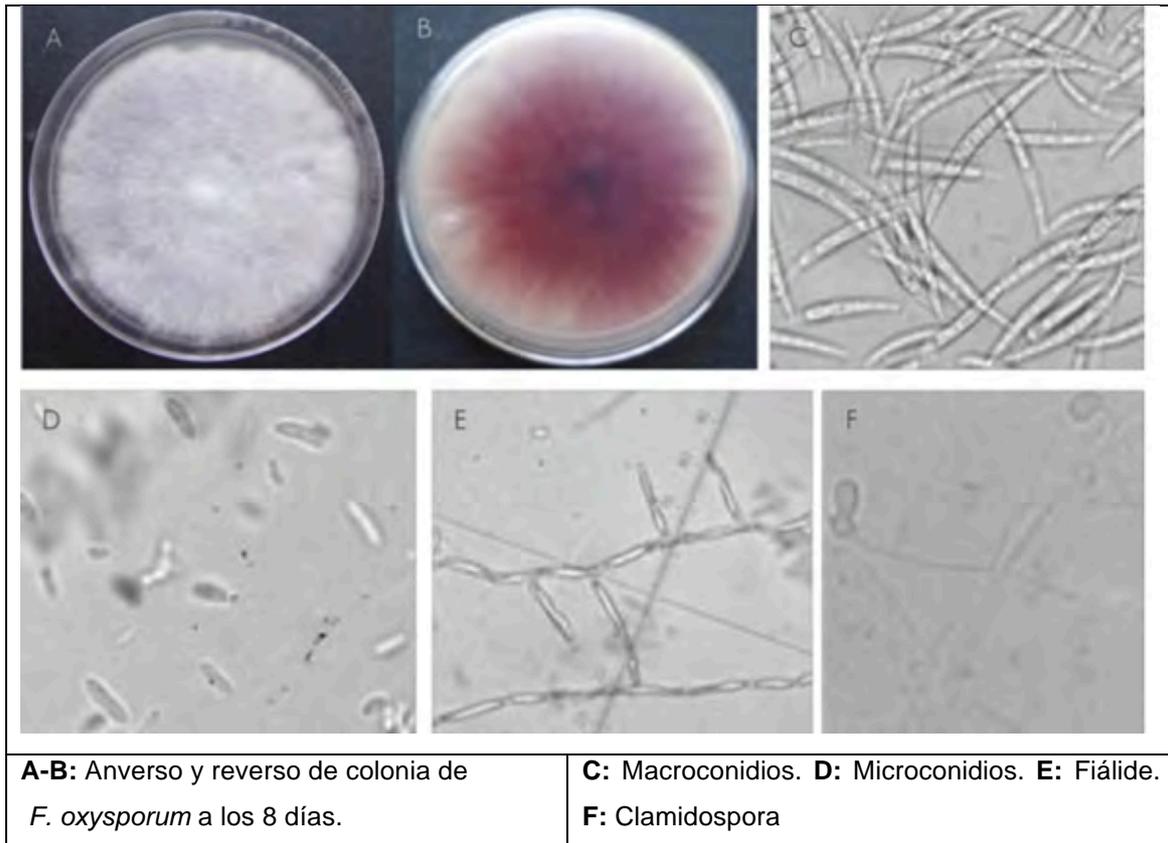


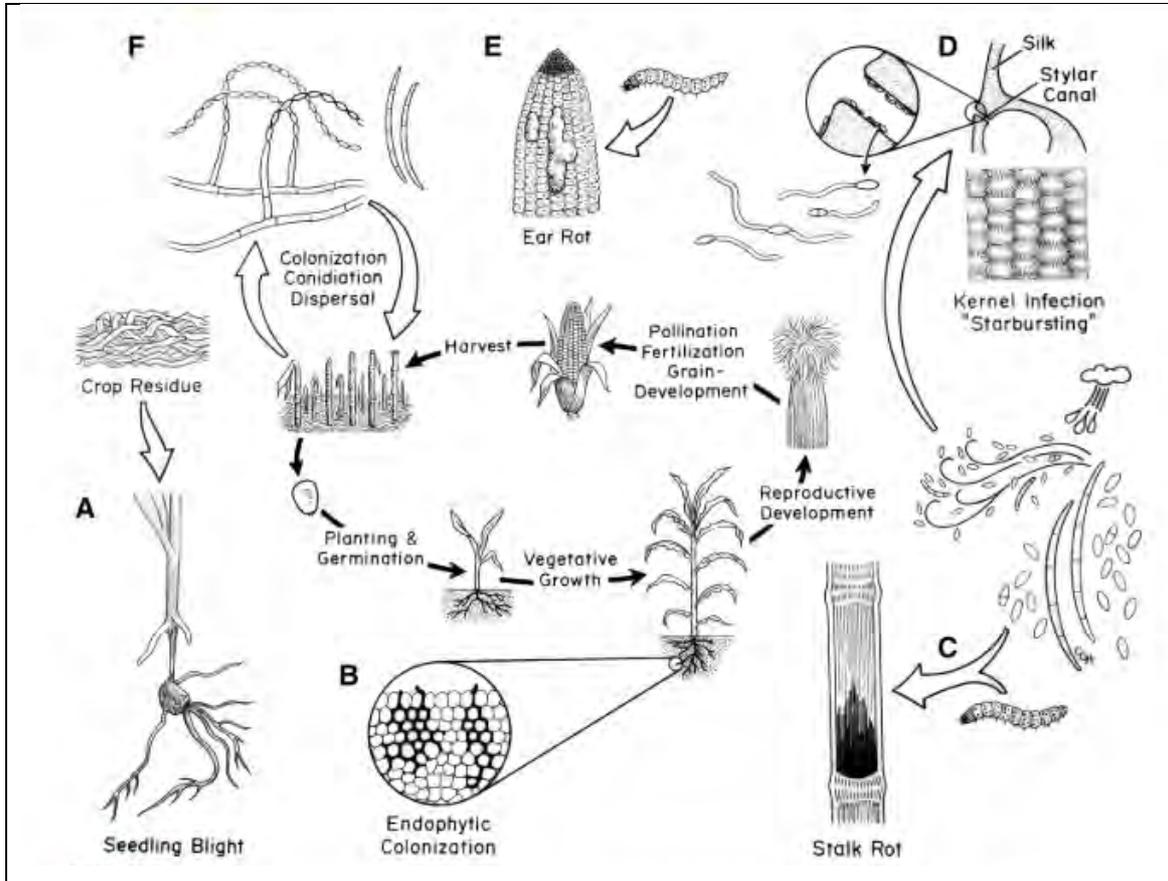
Figura 4: Morfología general de *F. oxysporum*. La imagen fue tomada de Robles et al. 2016.

2.2 Mecanismo de patogénesis

Se cree que los hongos patógenos perjudican a las células del hospedero causando enfermedad mediante la acción individual o combinado de 4 mecanismos de patogénesis (Estrada y Ramírez, 2019).

- 1.- La producción o liberación de enzimas que degradan barreras celulares.
- 2.- La producción o liberación de sustancias tóxicas como las "fumonisinas" que interfieren en el metabolismo o afectan la estructura normal del citoplasma (animal y humano) o protoplasma (plantas).
- 3.- La producción o liberación de sustancias que interfieren con el control normal de crecimiento y desarrollo (compuestos hormonales, anti-hormonales u otros).
- 4.- La interferencia mecánica propia del crecimiento del hongo con los movimientos normales del agua, nutrientes y metabolitos.

En la Figura 5 podemos observar el mecanismo de patogénesis de *F. verticillioides* por el cual afecta/infecta al maíz (Blacutt et al., 2018).



*Ciclo de la enfermedad causado por *F. verticillioides* asociado al ciclo de crecimiento del maíz.

A: las semillas que germinan en suelos infestados con *Fusarium* spp., pueden desarrollar una putrefacción agresiva y una plaga de plántulas. **B:** la colonización endofítica ocurre bajo condiciones que no promueven la enfermedad. **C:** las heridas del tallo por daños mecánicos o la alimentación de insectos se convierten en sitios de infección para *F. verticillioides* y pueden provocar la pudrición del tallo. **D:** en la etapa de la seda, el hongo puede colonizar los granos de maíz a través del canal del estilar, dando lugar al "estallido estelar", patrón en granos. **E:** las larvas y/o insectos que afectan al maíz se alimentan de hojas, tallos, orejas y tejidos de collar, proporcionando cortes de infección para el tallo. **F:** después de la cosecha, el hongo es capaz de sobrevivir y esporular en los residuos del cultivo, proporcionando inóculo para infecciones posteriores.

Figura 5. Patrón de patogénesis de *F. verticillioides* al maíz imagen tomada de Blacutt et al. 2018.

3. Agave

El género *Agave* es endémico de América con alrededor del 75% de sus especies en México; están distribuidos a lo largo del país, en estados como Oaxaca que cuenta con 37 especies, Puebla con 31, Sonora con 30 y Durango con 24 (García, 2007).

Es una planta xerófita, adaptada a vivir en condiciones climáticas desfavorables, es decir largos periodos de sequía y altas temperaturas. El agave posee mecanismos para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos; así como con marcadas fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, las cuales tienden a limitar la pérdida de agua por transpiración y la acumulan en tejidos especializados (García, 2007).

Estas plantas generan gran interés a nivel comercial pues su principal uso es la fabricación de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal (Díaz-Montaña 2013), aunque existen otras propuestas para el aprovechamiento de la planta como lo son en las áreas de textiles, bioenergética y alimentaria entre otros. En la industria la planta se divide en dos partes siendo la piña lo que se ocupa principalmente para bebidas alcohólicas-fermentación, las hojas de esta planta quedan como residuos los cuales contienen cantidades importantes de fibra, Sus raíces son una de las características favorables, estas están en la superficie, lo que facilita la absorción de agua de lluvia; la planta depende del volumen de almacenamiento de agua y de carbohidratos. Así pues, el agua que es almacenada ayuda a mantener las reacciones bioquímicas y la apertura de estomas para la asimilación de CO₂, aun en condiciones de sequía, la asimilación de carbono se da en la noche, en donde se fija el carbono de los ácidos orgánicos, principalmente del ácido málico que se acumula en las vacuolas. Durante el día el ácido málico es descarboxilado obteniendo así carbono con una pérdida de agua mínima, este carbono es utilizado para la producción de carbohidratos; el proceso se denomina metabolismo ácido crasuláceo (CAM) y es característico de plantas que crecen en zonas con altas temperaturas y baja humedad como el caso del *Agave tequilana* (García,

2007), en la tabla 1 se mencionan algunos tipos de agave que crecen en México, así como su uso.

Tabla 1: Tipos de agave, estado donde se encuentra y uso.

Especie de agave	Estado en donde se produce	Uso
<i>Agave tequilana</i> Weber	Jalisco, Nayarit, Michoacán, Tamaulipas y Guanajuato	Producción de Tequila
<i>Agave rhodacanta</i> Trel	Oaxaca, San Luis	Producción de mezcal
<i>Agave shrevel</i> Gentry	Potosí, Durango	
<i>Agave wocomahi</i> Gentry	y Jalisco	
<i>Agave drangensis</i>		
<i>Agave atrovensis</i>	Tlaxcala, Ciudad	Producción de pulque
<i>Agave lehmannii</i>	de México,	
<i>Agave cochlearis</i>	Querétaro, Puebla, Morelos y San Luis Potosí	
<i>Agave angustifolia.</i>	Sonora	Producción Bacanora

3.1.1 *Agave tequilana* Weber var. azul

Es una especie de gran importancia económica en nuestro país debido a que es la materia prima que se utiliza para la elaboración de una de las bebidas alcohólicas más populares en nuestro país como lo es el tequila; también es importante por los productos de valor agregado (como los fructooligosacáridos) que se pueden generar de los residuos orgánicos.

Los análisis realizados a esta planta indican que el *A. tequilana* Weber var. azul contiene en la piña alrededor de 20-24% en base húmeda de fructanos en comparación con especies como *A. salmiana* o *A. agustifolia* (Bautista-Justo M *et al.*, 2001). Se ha reportado que el agave presenta diferentes estructuras en los fructanos que lo componen según el origen de la planta, la región en la que

crece, los nutrientes del lugar, la estación del año, el clima o la cantidad de agua, por ejemplo, el *Agave americana* contiene mayormente fructanos lineales (Nandra y Bhatia 1979), mientras que el *A. tequilana* Weber var. azul contiene mayor cantidad de enlaces β -(2,6) o ramificaciones en su estructura (López, Mancilla-Margalli y Mendoza-Díaz 2003), en las tablas 2 y 3 podemos observar la composición química (%) de las hojas que forman parte de los residuos orgánicos del *A. tequilana* Weber var. Azul. En las tablas 2 y 3 se muestran los principales componentes químicos del *A. tequilana*

Tabla 2: Composición química de las fracciones de *Agave tequilana* Weber var. azul (% base húmeda) tomado de Montañez-Soto, 2011

Fracción	Humedad	Cenizas	Proteína	Lípidos	Fibra cruda	Carbohidratos
Punta de hoja	81.13	2.68	0.96	0.26	9.86	5.11
Base de hoja	79.41	1.76	0.64	0.12	6.24	11.83
Cabeza	71.10	1.16	0.62	0.10	4.00	23.02

Tabla 3: Azúcares reductores totales contenidos en las fracciones de la planta *Agave tequilana* Weber var. azul (% base seca) según Montañez-Soto, 2011

Fracción	Azúcares reductores directos	FOS (fructooligosacáridos)	Azúcares reductores totales	Inulina
Punta de la hoja	17.81	6.24	26.30	2.25
Base de la hoja	18.18	13.66	56.36	24.52
Cabeza	12.00	24.96	80.20	43.24

3.1.2 Residuos agroindustriales del agave.

Estos residuos se generan en distintas etapas de la producción de las bebidas alcohólicas, en el caso del tequila y mezcal se producen durante el "jimado" (se cortan las hojas del tallo convirtiéndose en un desecho), después del cocimiento de las piñas se genera el bagazo que es un residuo, el cual también es desechado después de la fermentación (Aceves, 2003).

Aproximadamente 1 millón de toneladas de plantas de *A. tequilana* Weber var. azul son procesadas anualmente por la industria tequilera mexicana, esto genera residuos agrícolas alrededor de 300 mil toneladas (Huitrón *et al.*, 2008).

Algunos de estos materiales pueden ser reutilizados por su alto contenido de azúcares, fibra, proteína, lignina, polifenoles, pigmentos, entre otros compuestos, esta es la razón por la cual se ha buscado la forma de utilizarlos para obtener productos de valor agregado ya sea en la elaboración de alimentos como jarabes de fructosa, remedios para la salud, forraje, en construcción, obtención de bio-combustibles, etc. (Barragán-Huerta *et al.*, 2008). Al mismo tiempo estos residuos se han utilizado para la obtención de enzimas mediante el aislamiento de microorganismos que infectan a este tipo de plantas tal es el caso de *Aspergillus niger* el cual se aisló para obtener enzimas que degradan inulina (inulinasas) así como su caracterización (Huitrón *et al.*, 2008).

4. Fructanos

Los fructanos son polímeros de más de 10 moléculas fructosa unidas por enlaces glucosídicos β -(2,1) y/o β -(2, 6). Los fructanos menores de 10 unidades son conocidos como fructooligosacáridos (FOS) (Olvera, 2007).

Por su tipo de enlace a los fructanos se les clasifica en levanas, que son polímeros lineales constituidos por unidades de fructofuranosa unidas por enlaces β -(2,6), inulinas fructano lineal conformadas por unidades de fructofuranosa unidas mediante enlaces β -(2,1) (Figuras 6 y 7) (Cuevas, 2016),

neoserias de inulina que tienen algunas ramificaciones β -(2,6) y además contienen una glucosa entre las unidades de fructosa, neoserias de levana que tienen ramificaciones β -(2,1) y son similares a las neoserias de inulina (Mancilla-Margalli y López 2006).

Así mismo se ha encontrado que los fructanos presentes en el *A. tequilana* Weber var. azul, contienen uniones β -(2,1) y β -(2,6) con unidades internas y externas de glucosa a los que se les denomina agavinas (Figura 7) (Mancilla-Margalli y López 2006). En la inulina de origen vegetal, se ha observado que las unidades de fructosa enlazadas a la glucosa terminal pueden variar desde algunas unidades hasta 70, lo que significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros, definiéndose como un poli-fructano con grado de polimerización mayor a 30 unidades (Pedreschi *et al.*, 2003; Ricca *et al.*, 2007; Seminario *et al.*, 2003).

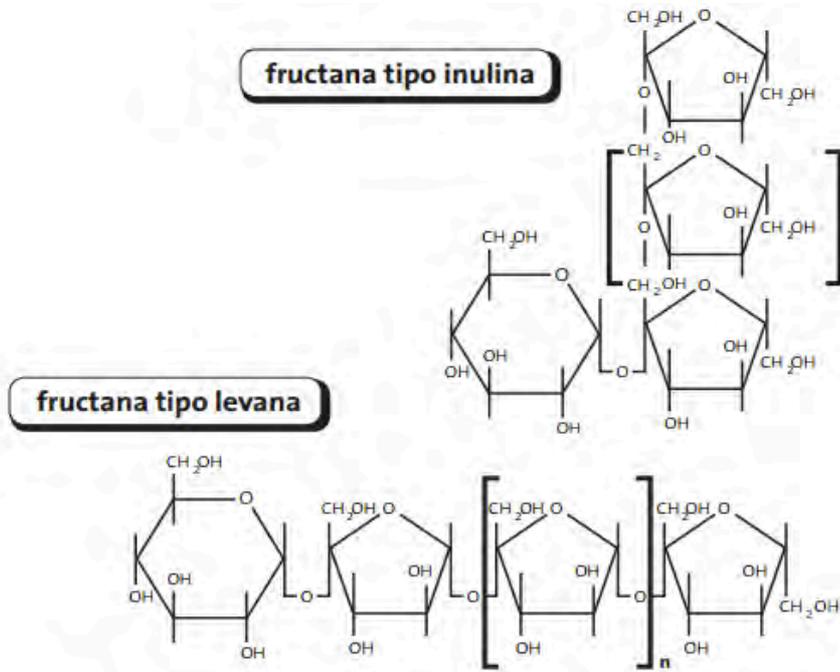


Figura 6: Estructura de inulina y levana (Ritsema *et al.*, 2003).

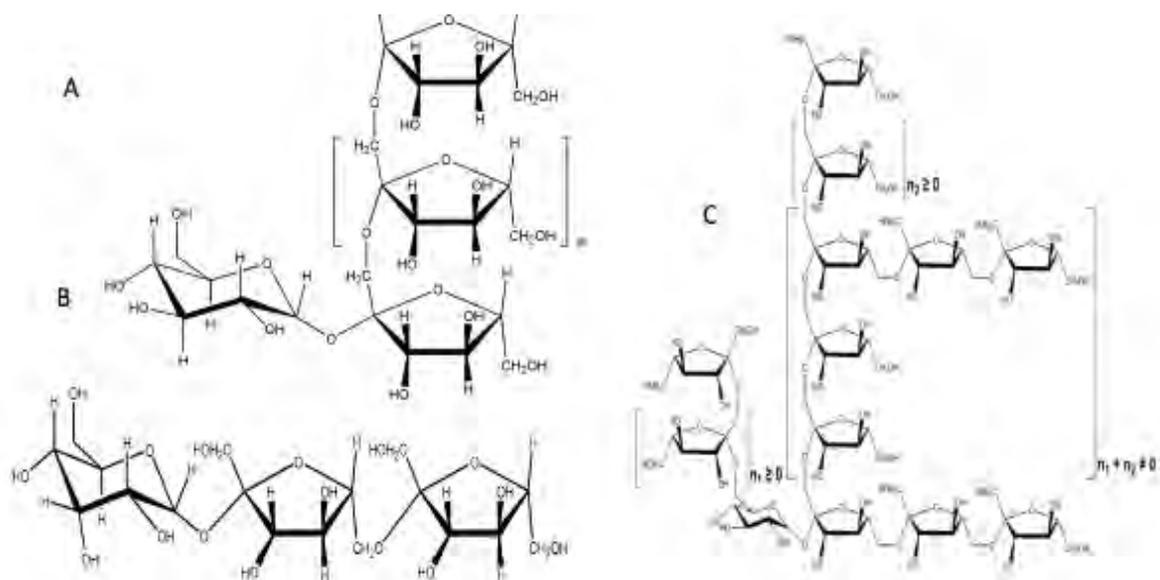


Figura 7. A: inulina. B: Levana. C: inulina presente en *Agave tequilana* Weber var. azul.
Tomado de (Mancilla-Margalli y López 2006).

4.1.1 Aplicaciones y producción de fructanos

El empleo de estos polímeros de fructosa es de gran interés industrial ya que pueden ser utilizados como aditivos (Tabla 4) o para mejorar la salud, se destaca cuando se consumen como prebióticos en forma de oligosacáridos, así como para el aumento de la capacidad de captación de minerales cuando es consumido como levana o inulina. (Olvera *et al.*, 2007).

También se emplean en la industria química-farmacéutica y de procesamiento como excipiente, aditivo, agente tecnológico o coadyuvante; en la industria de la alimentación animal, y se está considerando su uso como constituyente de los empaques por su carácter de material bioactivo (Madrigal y Sangronis, 2007).

Tabla 4. Aplicaciones de los FOS (fructooligosacáridos) en la industria alimentaria (Madrigal y Sangronis, 2007).

Aplicación	Funcionalidad
Productos lácteos	Cuerpo, palatabilidad, capacidad de formar gel, sustituto de grasas y sinergismo con edulcorantes
Productos untables	Estabilidad de emulsión, textura y capacidad de ser untado
Productos horneados	Disminución de a_w y sustituto de azúcares
Productos cárnicos	Textura, estabilidad de emulsión y sustituto de grasas
Confitería	Sustitutos de azúcares y humectante

El efecto prebiótico de la inulina-fructano se debe a que es un componente alimentario no digerible, promueve la estimulación selectiva del crecimiento y actividad de bacterias entéricas o del colon, disminuyendo el crecimiento de bacterias patógenas como *Clostridium perfringens* (Gómez y Acero, 2011), la fermentación de los fructanos produce ácidos grasos de cadena corta que estimulan el crecimiento de la mucosa colono-rectal (Ulloa *et al.*, 2010).

Los fructanos son producidos por microorganismos y plantas (tabla 5), tal es el caso del *A. tequilana* Weber var. azul que contiene alrededor del 13-17% de fructanos (inulina) con un grado de polimerización (GP) entre 3-29 y con estructuras ramificadas (López *et al.*, 2003). Esta inulina puede ser utilizada por hongos y algunos otros microorganismos como única fuente de carbono para la obtención de enzimas como la "inulinasa" la cual es de interés biotecnológico (Pérez, 2016).

Tabla 5. Plantas que contienen inulina y su contenido referido a producto fresco (datos tomados de Moshfegh *et al.*, 1999).

Planta	% inulina
Bardana o lampazo (<i>Arctium lappa</i>)	27-45
Agave (<i>Agave spp.</i>)	16-25
Ñame o yam (<i>Dioscorea spp.</i>)	19-20
Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	10-15
Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>)	12-15
Ajo común (<i>Allium sativum</i>)	9-16
Puerro (<i>Allium porrum</i>)	3-10
Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>)	3-10
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	2-6

5. Enzimas

Las enzimas son proteínas con función catalítica, es decir, que pueden acelerar la velocidad a la que ocurren las reacciones químicas hasta alcanzar un equilibrio, muchas de ellas no trabajan solas ya que se organizan en secuencias (rutas metabólicas) y muchas de ellas regulan su actividad enzimática. (Lehninger *et al.*, 2006).

Características generales

- 1.- Catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.
- 2.- La velocidad de reacción es de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor a los catalizadores inorgánicos, además la velocidad está directamente relacionada con la concentración de la enzima, de sustrato y de la disponibilidad de cofactores (Lehninger *et al.*, 2006).
- 3.- Las condiciones de reacción (temperatura, pH y presión) son suaves y son distintas para cada tipo de enzima, ya que cada tipo de enzima tiene un pH, temperatura de reacción óptimos (Lehninger *et al.*, 2006).

Las enzimas se pueden clasificar por la reacción bioquímica que catalizan (tabla 6), todas las enzimas poseen un “Enzyme commission number” (EC number) que contiene una serie de números de 4 dígitos que indican qué tipo de reacción catalizan.

El primer número refiere la clase principal, el segundo la subclase en función del tipo de sustrato, el tercero la subclase de acuerdo con el requerimiento por una coenzima y el cuarto hace referencia a la reacción que cataliza (García-Garibay, 2004).

Tabla 6: Clasificación internacional de las enzimas. Tomado de Lehninger et al., 2005

Grupo	Reacción que catalizan
EC 1(Oxidoreductasa)	Transferencia de electrones (átomos de H o hidruros)
EC2 (Transferasa)	Transferencia de grupos funcionales (amino, hidroxilo, metilo, fosfatos, etc.)
EC3 (Hidrolasa)	Hidrólisis (Transferencia de grupos funcionales al agua)
EC4 (Liasa)	Adición de grupos funcionales a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por remoción de algún grupo funcional
EC5 (Isomerasa)	Transferencia de grupos funcionales entre una misma molécula
EC6 (Ligasa)	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O o C-N por reacciones de condensación asociadas a la hidrólisis del ATP.

5.1.1 Inulinasas

Las inulinasas son enzimas fructofuranosilhidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces β -(1-2) fructano de la inulina para producir fructosa y glucosa.

Se ha observado que las plantas que contienen inulina tales como la achicoria, agave y alcachofa son capaces de producir enzimas que degradan el polímero hasta fructosa, en particular se ha logrado aislar e identificar una inulinasa procedente de la raíz de achicoria con un peso molecular de 70 KDa (Claessens, Van Laere y De Proft 1990). Estas enzimas también son producidas por levaduras, hongos y bacterias (Tabla 7). Los organismos con mayor interés para la producción de estas enzimas son los hongos filamentosos y levaduras debido a su alta capacidad de producción de esta enzima y las condiciones bajo las cuales trabajan (50°C pH 5), por ejemplo, Neera *et al.*, (2018) logró aislar una inulinasa proveniente de *Fusarium sp.*, con un peso aproximado de 90 kDa y con una temperatura de reacción de 55 °C. Otros hongos tales como *Aspergillus awamori*, *A. niger* o *Penicillium sp.*, son capaces de hidrolizar a la inulina, estos hongos se han cultivado en distintos medios con inulina como principal fuente de carbono y/o cambios en las

fuentes de nitrógeno y sales minerales, todo con el fin de mejorar la producción de este tipo de enzimas (Poorna *et al.*, 1995).

Existen exo y endo inulinasas microbianas, la diferencia entre ellas radica en la clase de producto que generan, la exo-inulinasas actúa en los extremos de la inulina, hidrolizando enlaces β -(2,1) produciendo unidades de fructosa y glucosa. Las endo-inulinasas actúan sobre los enlaces β -(2,1) internos de la inulina, produciendo FOS de diversos tamaños (Kango y Jain, 2011).

Tabla 7. Microorganismos productores de inulinasas. Tomado de Pandey *et al.*, (2006).

Microorganismo	Tipo de enzima
Hongos	
<i>Aspergillus aureus</i>	Extracelular
<i>Aspergillus awamori</i>	Extracelular
<i>Aspergillus ficuum</i>	Extracelular
<i>Aspergillus fischeri</i>	Extracelular
<i>Fusarium spp.</i>	Extracelular
<i>F. oxysporum</i>	Extracelular, intracelular
<i>Penicillium sp.</i>	Extracelular
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Extracelular
<i>Rhizopus sp.</i>	Extracelular
<i>Streptomyces sp.</i>	Extracelular
Levaduras	
<i>Candida sp.</i>	Extracelular
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Extracelular
Bacterias	
<i>Acetobacter sp.</i>	Extracelular
<i>Arthobacter sp.</i>	Extracelular
<i>Bacillus sp.</i>	Extracelular, intracelular
<i>Escherichia coli</i>	Intracelular
<i>Staphylococcus sp.</i>	Intracelular

Las inulinasas provenientes de levaduras trabajan en un rango de temperaturas que van de los 35 °C a los 60 °C, degradan inulinas más complejas como la agavina y además son secretadas al medio de cultivo

(extracelular) por lo que su purificación es más sencilla (Castillo y Chamy, 2010).

Este tipo de inulinasas en su mayoría pertenecen a la familia denominada GH32 y en algunos casos a la GH38. Estudios tridimensionales de microscopía de rayos X se ha encontrado que estas enzimas están constituidas principalmente por dos dominios, un dominio β propela conformado por 5 hojas beta ubicado en el extremo amino terminal, característico de las familias GH32 y GH38, y un dominio β -sándwich formado por 2 hojas beta ubicado en extremo carboxilo terminal, este solo se encuentra en la familia GH32 (Figura 8), el sitio activo de estas enzimas se encuentra en el dominio β propela (Cimini, *et al.*, 2016).

En la Figura 9 se puede observar una estructura obtenida por cristalografía de rayos X de una exo-inulinasa proveniente de *A. awamori*. Su estructura terciaria se pliega en dos dominios, el dominio catalítico N-terminal de doble hélice de 5 palas y un dominio C-terminal plegado en una estructura de tipo β -sándwich (Nagem *et al.*, 2004). Un ejemplo de endoinulinasa del microorganismo *A. ficuum* se visualiza en la figura 10.

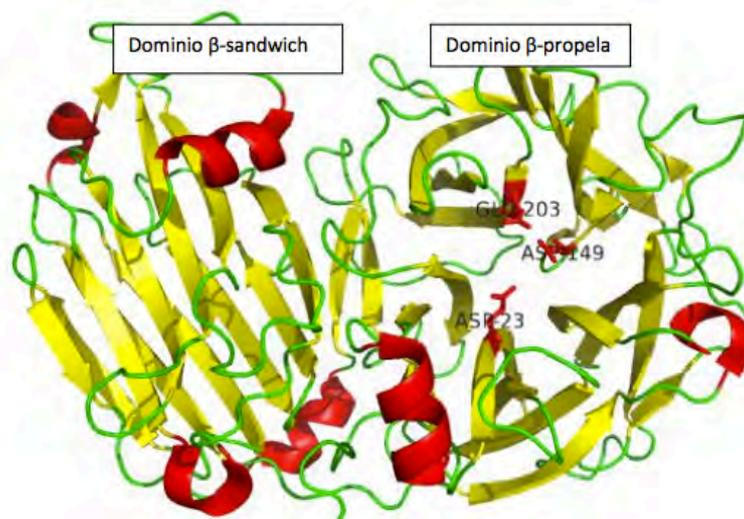


Figura 8. Estructura de una fructosilhidrolasa de la familia GH32, invertasa de Arabidopsis thaliana (PDB 2AC1).

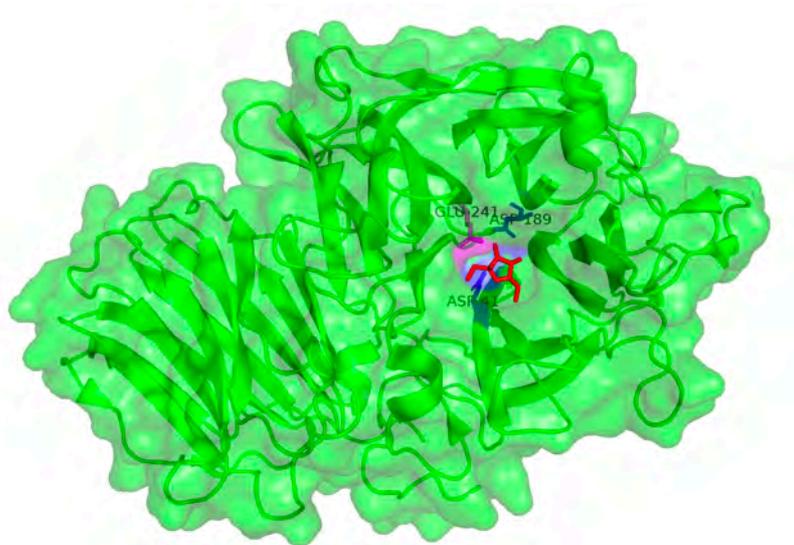


Figura 9. Estructura cristalográfica de una exo-inulinasa de *A. awamori*. Representación de la superficie y del sitio activo con sustrato (fructosa). Tomado de Protein Data Base.

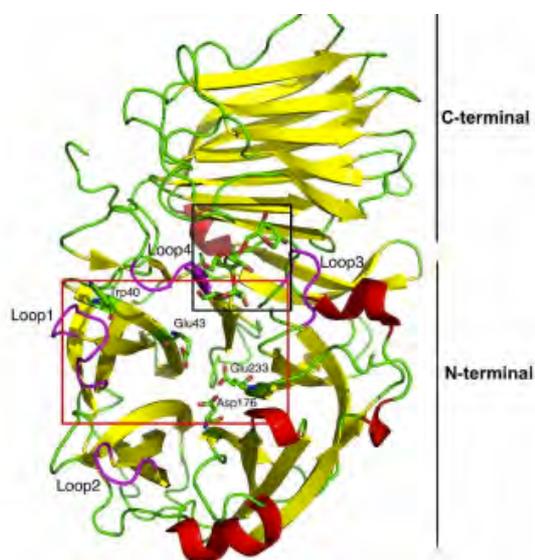


Figura 10. Estructura cristalina de una endo-inulinasa (*A. ficuum*), el sitio activo se encuentra en el cuadro rojo, se observa su extremo carboxilo terminal propio de la familia GH32 así como el extremo amino-terminal, las láminas β y las hélices están coloreadas en amarillo y rojo respectivamente. Imagen tomada de Pouyez J., 2012.

6. Hipótesis

La producción de enzimas con actividad inulinolítica en *Fusarium* spp., se verá favorecida si el hongo es capaz de crecer en inulina de agave como única fuente de carbono.

7. Objetivo General

Estudiar el crecimiento de *F.verticillioides*, su capacidad de producir inulinasas en medios con inulina de agave como única fuente de carbono y determinar las mejores condiciones de actividad enzimática de las enzimas producidas.

7.1 Objetivos particulares.

- Estudiar el crecimiento de *Fusarium* spp., en medios con inulina de agave como única fuente de carbono.
- Determinar la velocidad de crecimiento de *F. verticillioides* y *F. oxysporum* utilizando inulina de agave como fuente de carbono.
- Estudiar el efecto de la concentración de sustrato (inulina de agave) sobre el crecimiento de *F. verticillioides* en medio sólido.
- Establecer los mejores parámetros físico-químicos para la producción enzimática de *F.verticillioides*.
- Estudiar la actividad enzimática en función de la temperatura y pH

8. Materiales y Métodos

8.1 Materiales

- Se utilizaron cepas puras de *F. verticillioides* y *F. oxysporum* aisladas de muestras de maíz y sembradas en agar papa dextrosa (PDA) 50 %, donadas amablemente por el Dr. Javier Plascencia (Facultad de Química, UNAM), así mismo se utilizaron cepas de *Fusarium* sp., donadas por el consejo regulador del tequila (CRT) sembradas en agar papa dextrosa.
- Agavina (metlin)
- inulina de Achicoria
- Fructosa (Sigma-Aldrich)
- KH_2PO_4 (J.T.Baker)
- NaCl (J.T.Baker)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- KNO_3 (J.T.Baker)
- Buffer de acetatos 50 mM, pH 4, 5 y 6: Ácido acético glaciar (Reproquifin) y NaOH (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Bradford: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIORAD)
- Albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de DNS: Ácido 3,5 dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich)
- Soluciones TLC:
 - Eluyente: metanol (Alvi), butanol (Sigma-Aldrich) y agua destilada: (3:2:1) respectivamente.
 - Revelador: Orcinol (Aldrich) 10 mg/mL, H_2SO_4 (Meyer) 5%.

8.2. Métodos

8.2.1 Preparación de medios de cultivo

Las cepas puras de *F. verticillioides* y *F. oxysporum* se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) a al 50 % para verificar su viabilidad.

Posteriormente se prepararon medios de cultivo sólidos con inulina de agave al 1%, se inocularon las cepas por el método de picadura en cajas Petri y se incubaron a 28°C por 10 días. Al término del tiempo de incubación, las cajas Petri se guardaron en refrigeración en el cuarto frío 4° C. Posteriormente se realizó una suspensión de conidios de las cepas agregando agua destilada estéril a los medios sólidos con agitación a 200 rpm por 1.5 h, al término del tiempo se recolectó 1 mL de la suspensión de conidios (separados del micelio) en tubos cónicos de 1.5 mL y se guardaron en congelación con 50% de glicerol para futuras siembras.

Posteriormente se preparó un nuevo medio de cultivo sólido (KNO₃ 0.53 g, NaCl 0.05 g, MgSO₄·7H₂O 0.08 g, KH₂PO₄ 0.15 g, agar 2.26 g, para 100 mL) con inulina de agave a concentraciones de 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3% (modificado de Neera *et al.*, 2018). Los medios se inocularon en cajas Petri a partir de la suspensión de conidios, se tomaron 1X10⁶ conidios/mL y se depositaron en un disco de papel filtro estéril de 0.6 cm de diámetro, esto con el fin de verificar y medir la velocidad radial de crecimiento, las muestras se incubaron a 28°C por 7 días. Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

8.3 Determinación de la actividad de inulinasa

Con el fin de evaluar de manera cualitativa la producción de inulinasas por *Fusarium* spp., las cepas se cultivaron en medios con inulina de agave al 1% a 28°C por 3 días. Después de este periodo las cajas Petri se inundaron con lugol (1.5 % KI y 1% I₂) para observar dicha actividad.

Con el fin de comparar y establecer las mejores condiciones para la hidrólisis de inulina de agave por *F. verticillioides* se evaluó de forma cuantitativa el consumo de inulina con base en los azúcares reductores generados, así como la actividad enzimática usando un medio de cultivo líquido con la siguiente formulación para 100 ml: KNO₃ 0.53g, NaCl 0.05 g, MgSO₄·7H₂O 0.08g, KH₂PO₄ 0.15 g (modificado de Neera *et al.*, 2018) incubado 3 X 10⁵ conidios / mL a 30°C por 7 días a 200 rpm. Se tomaron muestras de 1 mL cada 24 h empezando por las 0 h en tubos cónicos de 1.5 mL. De la misma forma se preparó medio líquido a distintos pH iniciales (4, 5, 6, 7 y 8), se midió actividad enzimática del sobrenadante del medio mediante la técnica de azúcares reductores por ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

8.3.1 Determinación de azúcares reductores por DNS

La determinación de la actividad enzimática se realizó mediante la técnica colorimétrica de DNS (Miller, 1959). En esta técnica se sigue la reacción entre el DNS y el extremo reductor de la glucosa o fructosa.

Para medir los azúcares reductores producidos por la hidrólisis de la inulina, previamente se realizó una curva patrón de fructosa (0-1.5%) a partir de una solución stock de fructosa al 5% (p/v), posteriormente a 100 µL de cada muestra se la añadieron 200 µL de buffer de acetatos 50 mM, pH 5 y 600 µL de reactivo de DNS, frente a un blanco de reactivos. Las muestras tomadas cada 24 h del sobrenadante del medio de cultivo tuvieron el mismo tratamiento que la curva patrón. Posteriormente las muestras se calentaron a 90°C por 5 min, la reacción se detuvo incubando en hielo por 20 min y por último se le añadió a cada tubo 4 mL de H₂O destilada. Todo se midió en un espectrofotómetro (Genesys 10s Uv-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific) a una longitud de onda 540 nm.

Tabla 8. Preparación de muestras para determinación de azúcares reductores.

	Fructosa y/o Muestras de sobrenadante μL	Reactivo de DNS μL	H ₂ O destilada μL	Buffer de acetatos/fosfatos 50mM a pH 5 o 6 en μL
Blanco	0	600	100	200
0.2	100	600	0	200
0.4	100	600	0	200
0.6	100	600	0	200
0.8	100	600	0	200
1	100	600	0	200
1.5	100	600	0	200

8.3.2 Reacción enzimática

Para llevar a cabo la reacción enzimática de hidrólisis de inulina de agave, se tomaron 500 μL del sobrenadante de los medios de cultivo de *F. verticillioides* a los diferentes tiempos (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 168 h), se adicionaron 500 μL más de una disolución de agavina ó inulina de achicoria al 1% (m/v) en buffer de acetatos ó fosfatos 50 mM, pH (4-8 según buffer requerido). La reacción se llevó a cabo a 50°C y 300 rpm por 2 h. La cantidad de azúcares producidos se midió por DNS y cromatografía en capa fina.

8.3.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Para conocer la mejor temperatura a la cual se lleva a cabo la hidrólisis de la inulina, se ensayaron diferentes temperaturas (entre 20 y 60°C, en intervalos de 5°C). Para esto se empleó el sobrenadante del medio de cultivo crecido con 1% de inulina, incubado por 7 días a 35°C y pH 6. Se tomaron 500 μL del sobrenadante y se adicionaron 500 μL de una disolución de inulina al 1% y se incubaron por 2 h. Al término del tiempo de la reacción los azúcares reductores se cuantificaron por medio de la técnica de DNS como se menciona en el apartado 8.1.3.

8.3.5 Determinación de actividad enzimática por cromatografía en capa fina (CCF).

Para determinar los productos de reacción de forma cualitativa se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF), para lo cual se colocaron 3 μL de las muestras de los distintos tiempos de incubación (72-168 h) así como de un control externo de agavina (inulina de agave) al 1% y fructosa al 1%, todo se aplicó en placas para CCF de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck-Millipore). Una vez seca la placa se procedió a eluir las muestras utilizando una fase móvil consistente en una mezcla de butanol:metanol:agua, 3:2:1.

Una vez que la placa eluída estuvo seca, se reveló con una solución de H₂SO₄ al 5% y 10 mg/mL de orcinol en agua, esta mezcla fue asperjada a lo largo y ancho de la placa, posteriormente la placa fue calentada a 90°C en una parrilla eléctrica hasta observar manchas.

8.4 Conteo de conidios por el método de Neubauer

Las cepas de *Fusarium* spp., contenidas en medio agar papa dextrosa (PDA) a los 8 días de incubado se inundaron las colonias con H₂O destilada estéril (CBP), se raspó el micelio de adentro hacia fuera de la caja Petri con el fin de extraer la máxima cantidad de conidios. Se tomaron de cada caja 1 mL de suspensión de conidios y se depositaron en tubos cónicos de 2 mL estériles. La cámara de Neubauer se limpió con etanol al 70% y se procedió a tomar de cada tubo cónico 10 μL , mismos que se depositaron con micropipeta en el hemocitómetro. Se ajustó el objetivo del microscopio a 10X para ver la totalidad de las cuadrículas pequeñas, posteriormente se cambió el objetivo a 40X para iniciar el conteo, el cual se realizó de la cuadrícula superior derecha a izquierda.

El número de conidios se ajustó a 300,000 conidios/mL, esto debido al conteo de las distintas cepas de *Fusarium* spp.

Para el cálculo del número de conidios (NC) / mL se trabajó con la siguiente ecuación:

$$X (\text{media de conteo conidios}) \times \text{FD} (\text{factor dilución}) \times 10^4 = \text{NC} / \text{mL}$$

Tabla 9. Conteo de conidios de cepas puras *Fusarium* spp.

Cepa (CRT)	Media del conteo de conidios / mL	μ L tomados \approx 300,000 conidios/mL
003	2.99×10^7	10
085	2.96×10^7	10
214	2.79×10^7	10
142	5.7×10^7	5
005	6.1×10^7	5
098	7.6×10^7	4
167	6.3×10^7	5
073	5.6×10^7	5
153	6.1×10^7	5
197	9.4×10^7	3.5
<i>F.verticillioides</i>	2.89×10^7	10
<i>F.oxysporum</i>	2.95×10^7	10

*Se visualiza los microlitros tomados de la suspensión de conidios de cada cepa ajustados aproximadamente a 300,000 conidios/ mL.

8.5 Purificación y mantenimiento de las cepas de *Fusarium* spp.

Como parte de una colaboración con el cepario del Consejo Regulador del Tequila (CRT), amablemente nos proporcionaron 10 cepas de *Fusarium* spp., que afectan al Agave azul, para evaluar su capacidad de producción de inulinasas (Tabla 10). Las 10 cepas fueron sembradas por picadura en agar papa dextrosa (PDA) por 8 días a 28 °C, al término del tiempo y con el fin de purificar las cepas, se procedió a inundar las cajas Petri que contenían a la colonia del hongo con H₂O destilada estéril (CBP) y se agitó por 2 h a 25 rpm. Posteriormente se raspó el micelio del hongo de adentro hacia afuera y con micropipeta se tomaron 2 mL de solución de conidios (sin micelio) y se depositaron en tubos cónicos de 2 mL (solución "Madre"). La solución de conidios ("Madre") se diluyó de forma sucesiva en tubos cónicos, se tomaron 100 μ L y se diluyó en 1 mL de H₂O destilada estéril contenida en tubos cónicos de 1.5 mL. Las soluciones de conidios ya diluidas se sembraron depositando 20 μ L en Agar-Agar al 0.9 % por 48 h a 30°C. Al término del tiempo se

seleccionó una micro colonia y se sembró por picadura en PDA al 50 %, incubándose a 30°C por 15 días (Hasta que la colonia alcanzó los 8 cm).

Para el mantenimiento de las cepas puras se hizo una suspensión de conidios en glicerol y se congelaron a -70°C. La suspensión se preparó inundando la Caja Petri que contenía la cepa pura de *Fusarium* spp. con una solución de glicerol: H2O 15:85. La caja se agitó por 1.5 h a 25 rpm, al término del tiempo se raspó el micelio de adentro hacia afuera con el fin de extraer la máxima cantidad de conidios. 1.5 mL de la suspensión de conidios con micelio se depositó en tubos cónicos de 2 ml y finalmente se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C en congelador hasta su uso.

Tabla 10. Cepas *Fusarium* spp. donadas por el consejo regulador del tequila (CRT).

Código	ID	Cultivo	Año de plantación	Predio	Municipio	Estado
CRT-003	62876	Agave	2012	El ocote	Amatitlán	Jalisco
CRT-005	62119	Agave	2012	La joya	Tepatitlán de Morelos	Jalisco
CRT-073	57191	Agave	2011	El pandillo	Arandas	Jalisco
CRT-085	57828	Agave	2011	Las maravillas	Tepatitlán de Morelos	Jalisco
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-167	50259	Agave	2009	San Pedro	La Barca	Jalisco
CRT-197	58331	Agave	2011	San José de Pilas	Jesús María	Jalisco
CRT-214	58112	Agave	2012	Santa María	Tepatitlán de Morelos	Jalisco

8.6 Determinación de proteínas por método Bradford.

Se realizó la determinación de proteínas por el método Bradford el cuál consiste en la cuantificación de la unión de un colorante Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (Albúmina de suero bovino "BSA"). Se realizó una curva patrón de "BSA" (0-0.5 mg/mL), se prepararon soluciones diluidas de la solución Madre (4 mg/mL) de BSA, en tubos cónicos de 1 mL se tomaron alícuotas de 25, 50, 75, 100 y 125 μ L de la solución Madre, se completó el volumen con agua destilada estéril hasta un volumen final de 1 mL (1000 μ L)., posteriormente se tomaron 150 μ L de las muestras diluidas de "BSA" se agregó 1 mL de reactivo de Bradford, se mezclaron en agitador vortex dejándose incubar a temperatura ambiente por aproximadamente 2 min la absorbancia se midió a una longitud de 595 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s Uv-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific).

Para las muestras provenientes de un medio de cultivo inoculado con *F.verticillioides* a 35 °C, pH (4-7) y 168 h se tomaron alícuotas en tubos cónicos de 1.5 mL cada 24 h de los distintos medios de cultivo, se separó la biomasa suspendida con agitación a 12000 rpm por un tiempo de 6 min, posteriormente se tomaron 150 μ L de extracto enzimático y se añadió 1 mL de reactivo de Bradford, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro como se mencionó antes.

9. Resultados

Pre-acondicionamiento

Con el fin de pre-acondicionar las cepas al medio con el que se trabajaría (inulina de agave) se incubaron las cepas puras de *F. verticillioides* y *F. oxysporum* en medios sólidos que contenían inulina de agave al 1% y PDA 50%. Adicionalmente se prepararon soluciones stock de conidios de ambas cepas que como se mencionó en la metodología.

9.1 Tinción por impronta con azul de lactofenol a *F. verticillioides* y *F. oxysporum*.

Con la finalidad de observar las estructuras microscópicas y macroscópicas de ambas cepas crecidas en el medio de cultivo con inulina, se realizó una tinción por impronta. Las características observables fueron:

Macroscópicas: *F. verticillioides* mostró un micelio algodonoso, no seco, medianamente abundante y generación de pigmento de color salmón. *F. oxysporum* generó un micelio abundante no seco, sin generación de pigmento (figura 12 abajo).

Microscópicas: Con respecto a *F. verticillioides* se observó una gran cantidad de microconidios en forma ovoide, las hifas son ramificadas y septadas. Para *F. oxysporum* también se observaron una gran cantidad de microconidios en forma ovoide y la hifa ramificada pero no septada (figura 11).

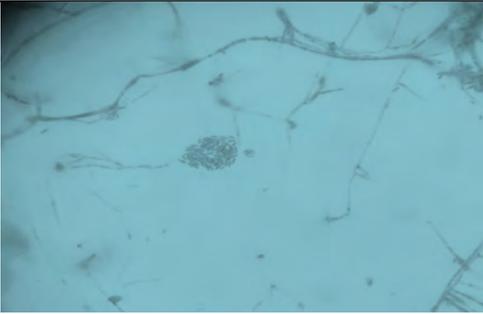
<i>F. verticillioides</i>	<i>F. oxysporum</i>
	
*Imagen vista (objetivo 40x)	*Imagen vista (objetivo 40x)
<i>F. verticillioides</i>	<i>F. oxysporum</i>
	

Figura 11: Características microscópicas y macroscópicas de *F. verticillioides* y *F. oxysporum*, muestras tomadas de medio inulina de agave 1%.

9.1.2 Evaluación del crecimiento de *Fusarium* spp. en medio sólido

El crecimiento del hongo se registró midiendo el diámetro (cm) de las colonias en medio sólido (Medio Inulina de agave 1%), para observar diferencias en el crecimiento (Velocidad radial) de las cepas de *Fusarium* spp., en medio de cultivo con inulina de agave como única fuente de carbono.

Para medir el crecimiento radial (figura 12) de ambas cepas, se determinó el avance micelial radial cada 24 horas. Empleando la pendiente en la fase exponencial de crecimiento la cual representa el avance radial micelial con respecto al tiempo (Crecimiento radial ($V_r = \text{mm/h}$)). Para la velocidad específica de crecimiento se linealizó la fase exponencial del crecimiento del hongo ($\ln \text{radio final} / \ln \text{radio inicial} = V_c \cdot t$) obteniéndose la velocidad específica de crecimiento representada por la pendiente.

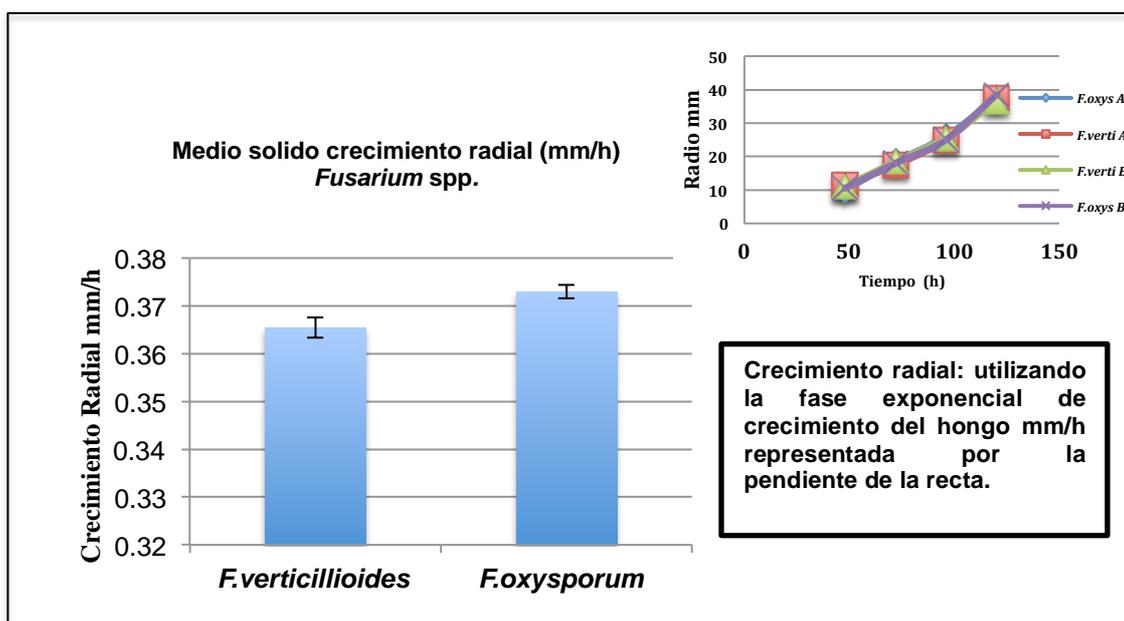


Figura 12. Crecimiento radial de *F.verticillioides* y *F.oxysporum* (mm/h). Medio con inulina al 1% (tiempo [h] contra radio [mm]).

Tabla 11. Crecimiento de *F. verticillioides* y *F.oxysporum* en medio con inulina 1%

Crecimiento Radial	mm/h	Desviación
<i>F.verticillioides</i>	0.37	0.002
<i>F.oxysporum</i>	0.37	0.001
Velocidad de crecimiento	h^{-1}	Desviación
<i>F.verticillioides</i>	0.016	0.0001
<i>F.oxysporum</i>	0.017	0.0001

Como se puede observar en la figura 12 y tabla 11, el crecimiento radial entre las cepas no se observó diferencia significativa, el crecimiento de

F.verticillioides y *F. oxysporum* en medio inulina al 1% fue de 0.37 mm/h para ambas cepas, mientras que la velocidad de crecimiento fue de 0.016 h⁻¹ y 0.017 h⁻¹ respectivamente. Las cepas se adaptaron al medio, se observó la presencia de micelio abundante y algodonoso. Los medios inoculados con *F.verticillioides* desarrollaron un pigmento color naranja-pálido (color salmón), mientras que *F.oxysporum* no desarrolló ningún pigmento. Tanto la velocidad de crecimiento como el crecimiento radial nos indicaron que ambas cepas pueden desarrollarse de manera efectiva en el medio de cultivo con inulina como única fuente de carbono. El medio no es factor para retrasar o aumentar el crecimiento de ambas cepas, a pesar de observar un desarrollo ligeramente rápido de *F.oxysporum*. Se decidió trabajar con medios a diferentes concentraciones de inulina de agave solamente con *F.verticillioides* para encontrar la concentración óptima para su desarrollo.

9.1.3 Efecto de la concentración de inulina sobre el crecimiento de *F. verticillioides*.

La concentración de inulina en el medio de cultivo incide directamente sobre el patrón de crecimiento de *F.verticillioides*, en la tabla 12 se observa que este hongo tiene una velocidad de crecimiento máxima de 0.016 h⁻¹ a partir de una concentración de 1% de inulina (tabla 12, figura 14). Con base en este dato se decidió trabajar con la concentración de 1% de inulina de agave para preparar el medio líquido.

Tabla 12. Crecimiento radial (Vr) y velocidad de crecimiento(μ) de *F. verticillioides* a distintas concentraciones de inulina

Medio inulina %	Vr (mm/h)	μ (h ⁻¹)	Desviación (h ⁻¹)	Desviación (mm/h)
0.1	0.20	0.015	0.0001	0.0057
0.5	0.26	0.015	0.0001	0.0071
1	0.35	0.016	0.0001	0.0014
1.5	0.34	0.016	0.0005	0.0028
2	0.33	0.015	0.0003	0.0156
2.5	0.33	0.015	0.0002	0.0078
3	0.33	0.015	0.0004	0.0071
50% PDA	0.24	0.013	0.0007	0.0078

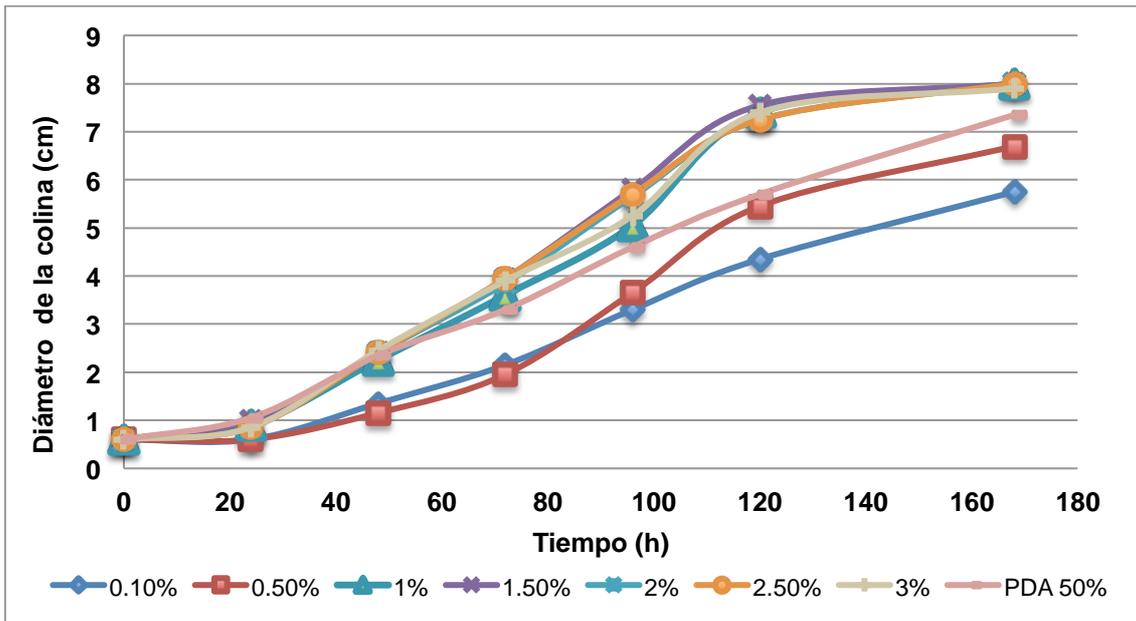


Figura 13. Efecto de la concentración de inulina en el medio sobre el crecimiento de *F. verticillioides*. Medio con inulina de agave a concentraciones de 0.1 a 3 % como única fuente de carbono.

Se puede observar en la figura 14 que hay un máximo del crecimiento a 1% de inulina, posteriormente conforme aumenta la concentración de inulina la velocidad de crecimiento va disminuyendo. La disminución podría deberse a un incremento de la presión osmótica por la concentración del azúcar (inulina) y consiguiente pérdida de agua. Así mismo se determinó la velocidad de crecimiento de *F. verticillioides* en PDA, observándose que a pesar de que el PDA es un medio rico en nutrientes, el micelio se desarrolló mejor en presencia de inulina de agave. La mayor diferencia fue la producción de pigmentos, pues en PDA, la coloración del hongo fue color violeta-purpura, mientras que en medio con inulina la coloración fue color salmón.

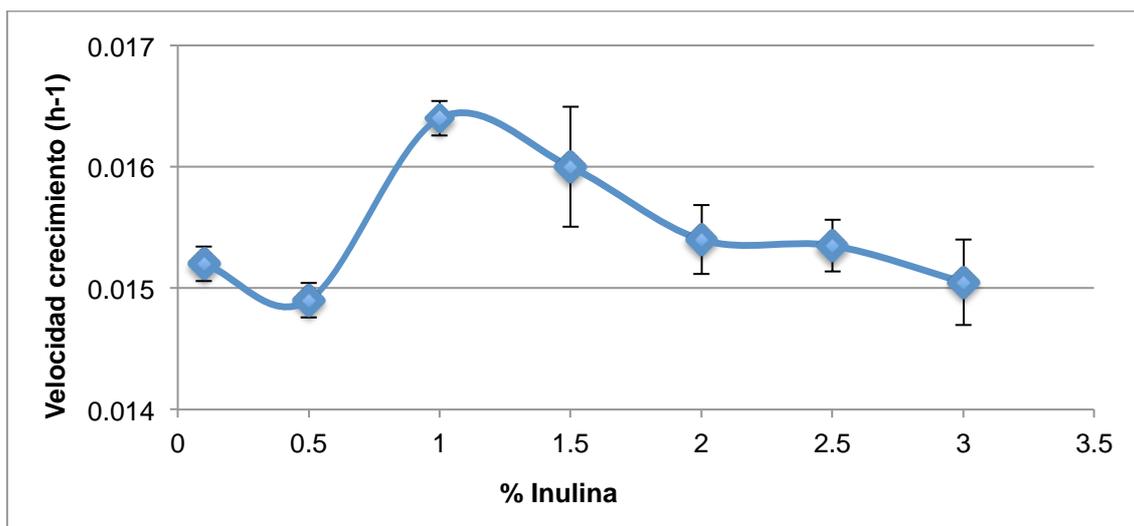


Figura 14. Efecto de la concentración de sustrato en el crecimiento de *F.verticillioides* en medio sólido.

Macías de la Cerda *et al.*, (2016) sostiene que *F. oxysporum* tiene la capacidad de degradar concentraciones de sustrato bajas, al aumentar la concentración de sustrato se inhibe la síntesis de muchas enzimas que requieren de un inductor a esto se le conoce como represión catabólica y es otra explicación a lo ocurrido con nuestra fuente de carbono inulina de agave ya que al aumentarla de 1-2% la velocidad de crecimiento disminuye de su máxima 0.016 h⁻¹ a 0.015 h⁻¹.

9.2 Comparación de crecimiento entre las distintas cepas de *Fusarium* spp. donadas por consejo regulador de tequila (CRT)

Se puede observar en la figura 15 que las cepas aisladas, purificadas e incubadas en medios con inulina al 1% como única fuente de carbono, muestran un comportamiento muy similar entre ellas. La tendencia de las gráficas indica que a la 24 h de incubación inicia la fase exponencial de crecimiento, seguido de la fase estacionaria en un intervalo de las 100-120 h. Las cepas si bien no están identificadas todavía, muestran que se cuenta con diferentes cepas de *Fusarium* sp. Se observa también que se adaptan al medio, desarrollan pigmento naranja-pálido o color salmón en algunas cepas y color blanco a las 36 h aproximadamente. El micelio es algodonoso y abundante (figura 16).

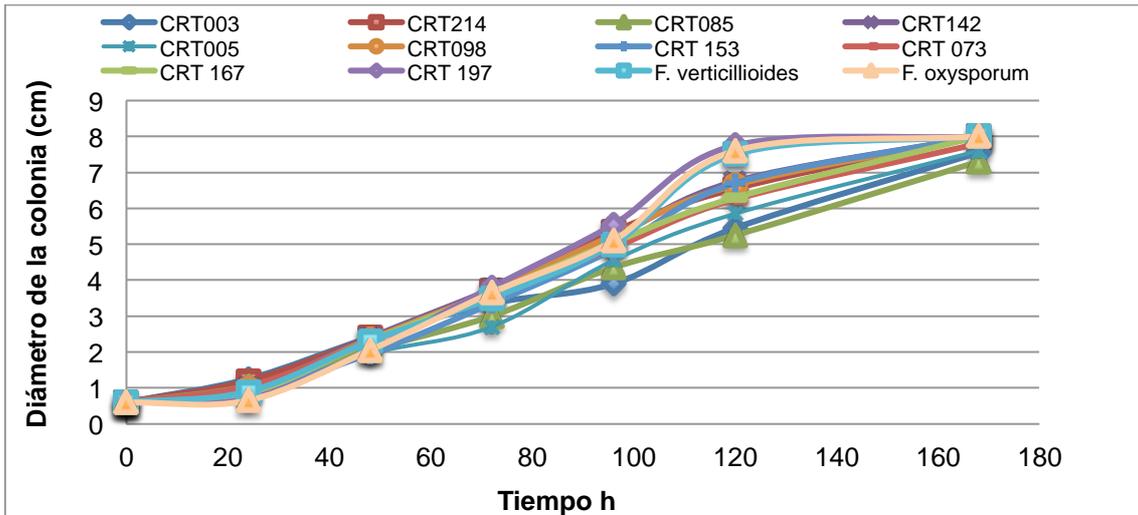


Figura 15. Curvas de crecimiento de las cepas de *Fusarium* spp. medio sólido con Inulina de agave al 1%.

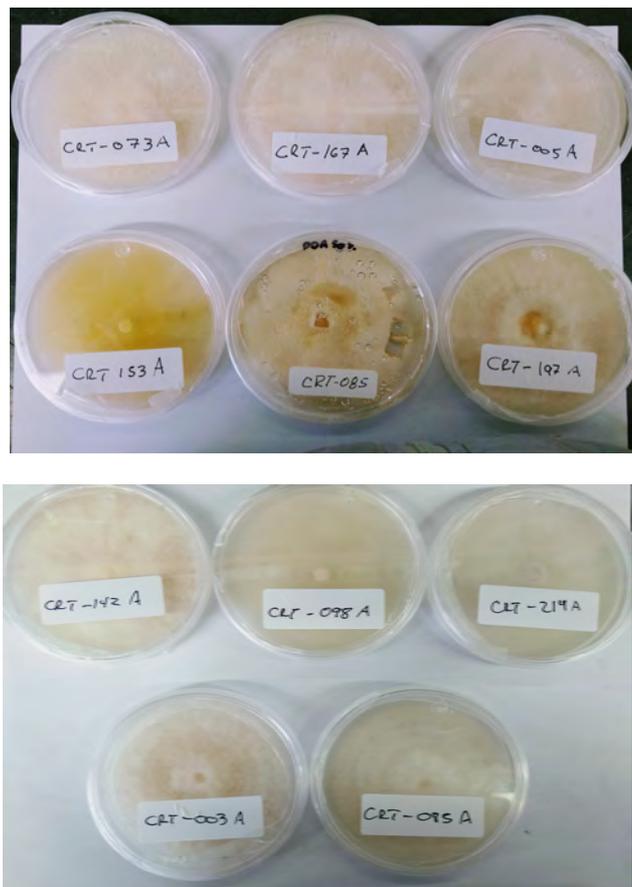


Figura 16. Crecimiento de las cepas de *Fusarium* spp. donadas por el CRT, en medio sólido con inulina de agave 1%.

En la tabla 13, figuras 17 y 18 se puede observar que entre las distintas cepas de *Fusarium* spp., existen diferencias mínimas en cuanto a su velocidad de crecimiento y radial, si bien, marcado con distintos colores en la tabla se encuentran las cepas que presentaron mayor velocidad. Se puede observar que la cepa CRT-197 presentó mayor velocidad de crecimiento con 0.018 h^{-1} seguida de las cepas modelo *F. verticillioides* y *F. oxysporum* con 0.016 h^{-1} y 0.017 h^{-1} respectivamente y las cepas CRT 098 y 153 con 0.015 h^{-1} . En cuanto a la velocidad radial, *F. verticillioides* y *F. oxysporum* la diferencia es mínima entre ellas (0.37 mm/h , ambas cepas) por lo que no podemos concluir de manera categórica cuál cepa crece más rápido entre estas dos. La cepa con la velocidad radial más alta obtenida fue la cepa CRT-197 con 0.39 mm/h , lo visto demuestra que *Fusarium* spp., crece de forma óptima y se mantiene en un medio con inulina de agave como única fuente de carbono.

Tabla 13. Velocidad de crecimiento(μ), velocidad radial (V_r) de *Fusarium* spp.

<i>Fusarium</i> spp.	V_r (mm/h)	μ (h^{-1})	Desviación (h^{-1})	Desviación (mm/h)
CRT003	0.20	0.011	0	0.006
CRT214	0.29	0.014	0.0004	0.002
CRT085	0.23	0.013	0.0003	0.001
CRT142	0.30	0.014	0.0002	0.006
CRT005	0.26	0.014	0.0006	0.002
CRT098	0.30	0.015	0.0006	0.006
CRT153	0.33	0.015	0.0002	0.004
CRT073	0.27	0.014	0.0009	0.004
CRT167	0.28	0.014	0.0004	0.011
CRT197	0.39	0.018	0.0003	0.001
<i>F.verticillioides</i>	0.37	0.016	0.0001	0.005
<i>F.oxysporum</i>	0.37	0.017	0.0002	0.001

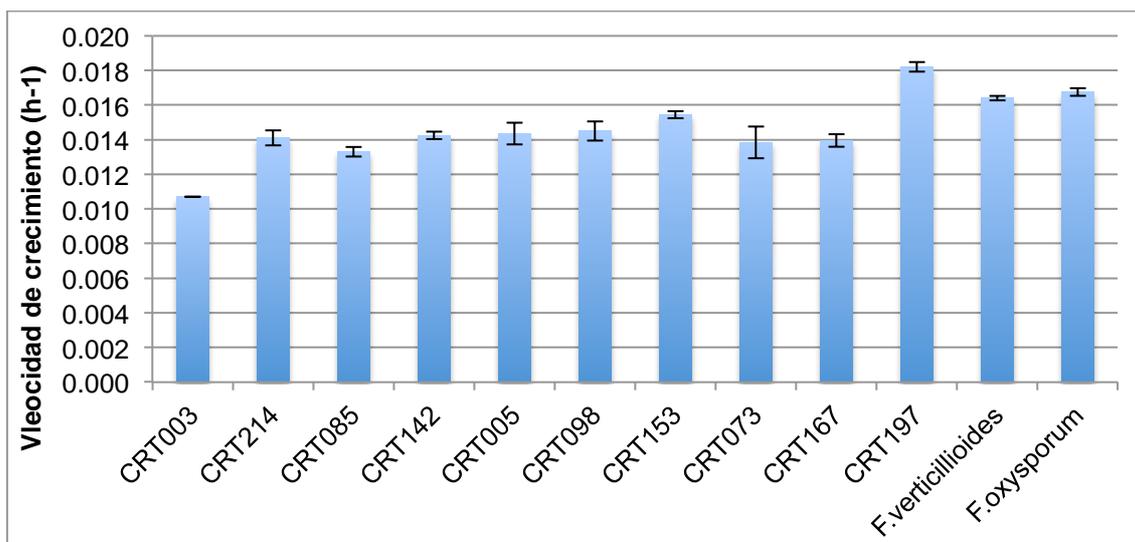


Figura 17. Velocidades de crecimiento de las cepas de *Fusarium* spp. en medio con inulina 1%

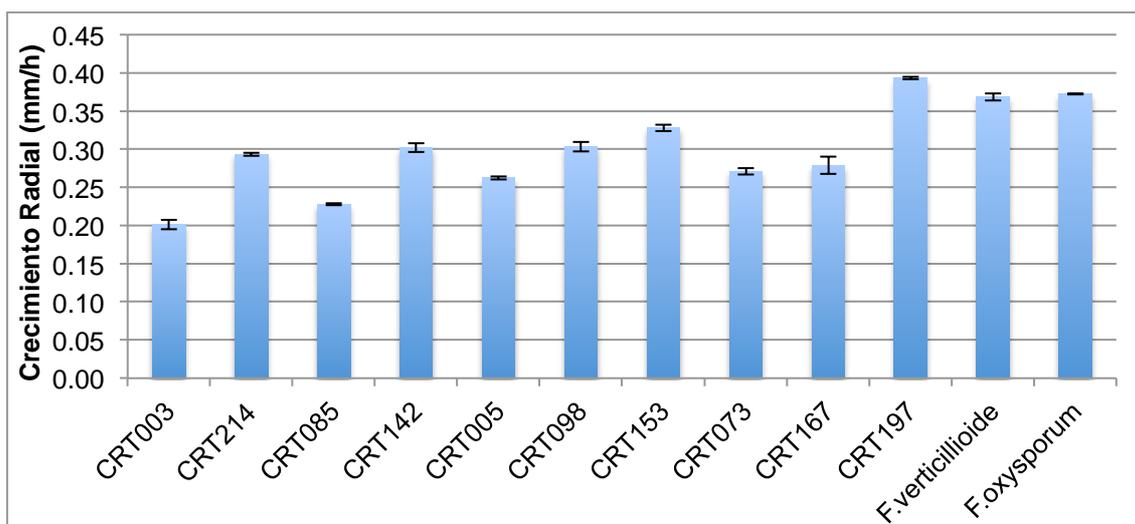


Figura 18. Velocidad radial de las cepas de *Fusarium* spp. en medio con inulina al 1%

En conclusión, las cepas que muestran una mayor velocidad de crecimiento y velocidad radial son CRT-197, *F. verticillioides* y *F. oxysporum* en medio con inulina de agave 1%. Macías de la Cerda *et al.*, (2016) demostró que *F. oxysporum* presentaba una velocidad radial máxima de 0.036 mm/h y 0.035 mm/h empleando glucosa 0.25 g/l y pectina 0.75 g/l respectivamente. Duarte *et al.*, (2016) demostró que *Fusarium solani* (aislado de plantas de garbanzo infectadas) presentaba una velocidad radial máxima de 0.54 mm/h y 0.63 mm/h en medios PDA y Czapek Dox (CzD) respectivamente, lo que representa una

mayor velocidad que la de las cepas estudiadas en esta tesis, tomando en cuenta la diferencia en las fuentes de carbono empleadas. Dueñas *et al.*, (2007) sostienen que las cepas de *Fusarium* sp., aisladas de plantas de garbanzo infectadas muestran rápido crecimiento en un rango de 0.30-0.54 mm/h en medio PDA, en nuestro caso *F.verticillioides* mostró una velocidad radial en medio PDA 50% de 0.24 mm/h, tomando en cuenta la concentración del medio PDA probablemente se pudiera haber equiparado al rango mencionado por Dueñas. Esto nos obliga a pensar que la fuente de carbono y la procedencia del hongo (debido a la síntesis de distintas enzimas requeridas para cada hospedero o medio) inciden directamente sobre la velocidad radial o de invasión.

El grupo de laboratorio inicio una colaboración con el CRT, el cual amablemente nos donó 10 cepas de *Fusarium* sin identificar la especie. Las figuras 19 y 20 muestran los resultados de la purificación. Cabe señalar que las cepas inicialmente presentaban señales de contaminación y dos de ellas se pudieron purificar en un periodo tardío.

Se presentan ocho cepas puras (Figura 19-20), cuyas diferencias radican en el color del micelio. Las cepas 197, 003 y 153 presentaron un micelio abundante, algodonoso y con pigmento blanco-amarillento en comparación con las cepas 073, 008, 005, 167 y 142 las cuales presentaron colores entre violeta-blanco. Esto sugiere que a pesar de que pertenecen al mismo género la especie es distinta en las ocho cepas que se lograron aislar.

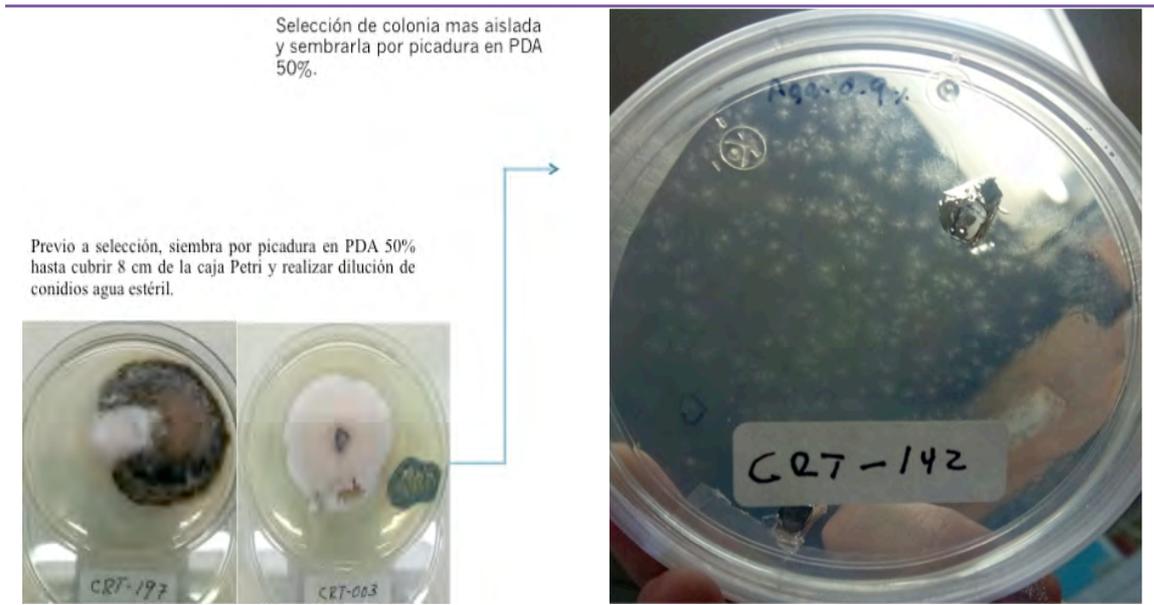
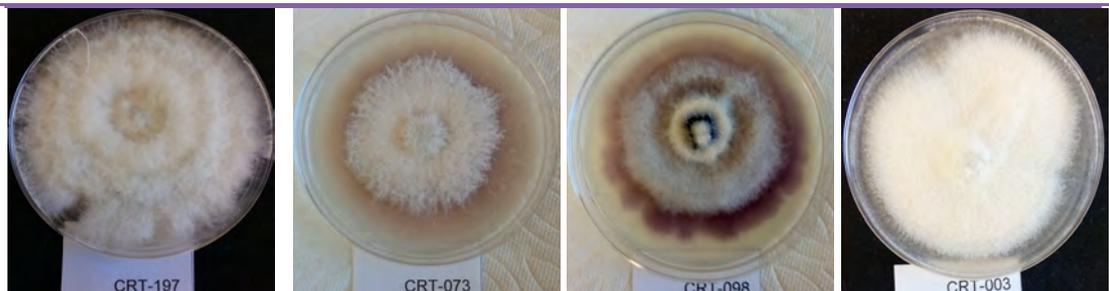
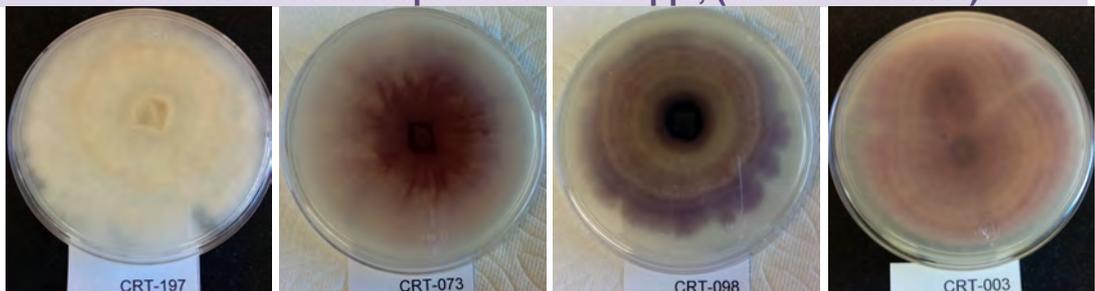


Figura 19. Muestra de cepas no puras/Muestra de selección de micro-colonia



Anverso/Reverso Cepas *Fusarium* spp., (Medio PDA 50%)



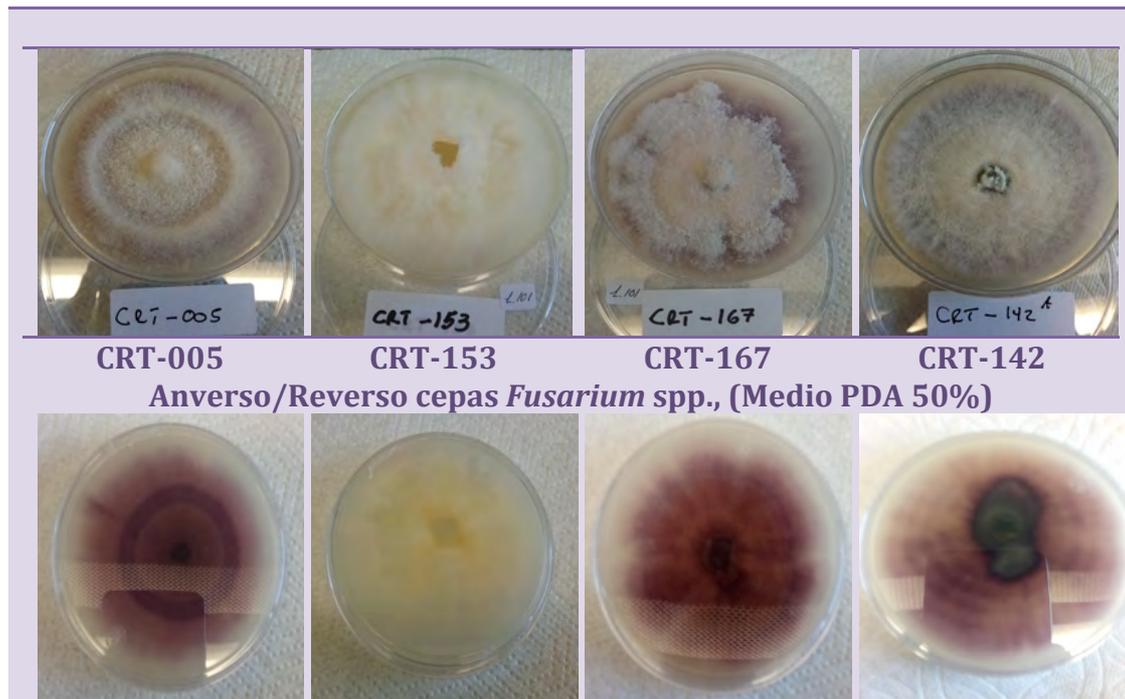


Figura 20. Cepas de *Fusarium spp.* purificadas sembradas en medio PDA 50%.

9.3 Prueba cualitativa de la actividad enzimática de *Fusarium spp.*

Para comprobar la actividad inulinolítica de *Fusarium spp.*, las cepas con mayor velocidad radial y crecidas en cajas Petri con medio con inulina fueron inundadas con Lugol para revelar la actividad enzimática por aparición de halos transparentes alrededor del hongo (Martín-Sánchez, *et al.*, 2013). El Lugol es usado para identificar la presencia de polisacáridos como almidón y glucógeno entre otros ya que forma un complejo de inclusión con los polisacáridos, que se caracteriza por presentar distinta coloración según las ramificaciones de éstos. El Lugol no reacciona con azúcares simples como la fructosa o glucosa, así pues, un halo transparente es indicativo de actividad enzimática de inulinasa.

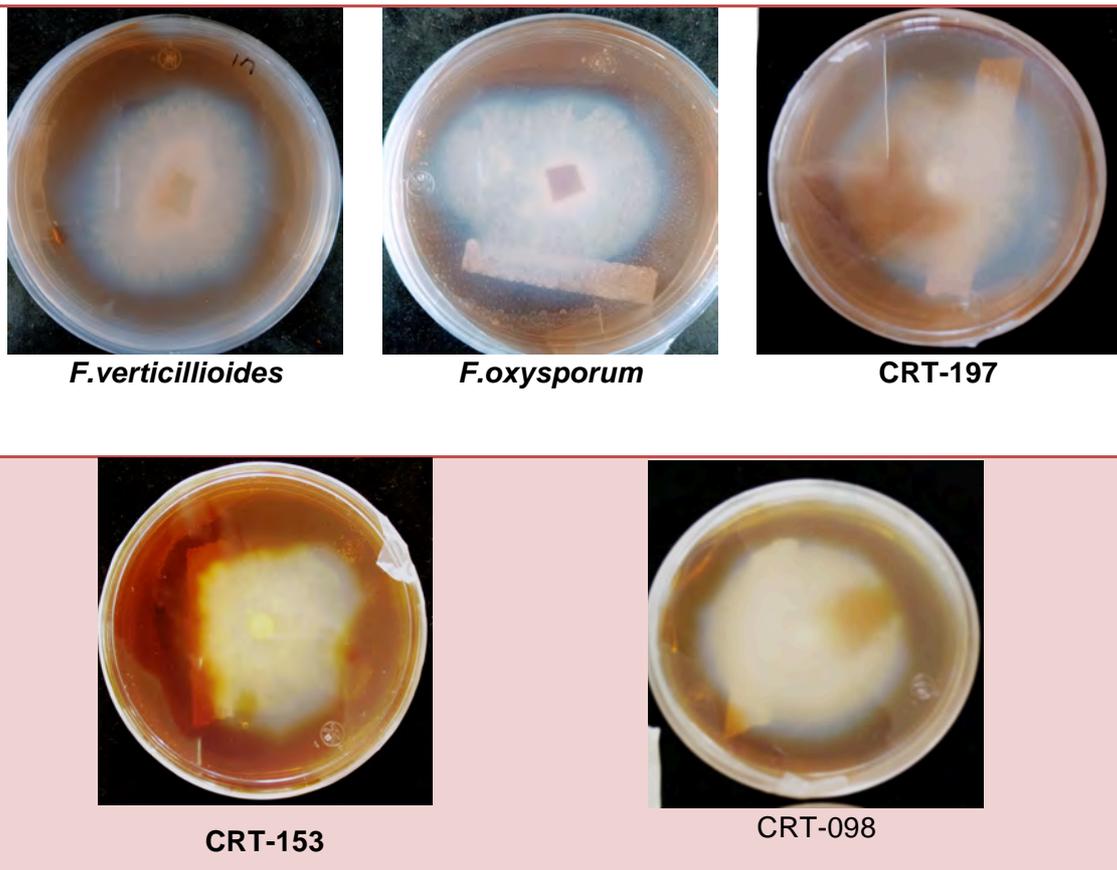


Figura 21. Cepas de *Fusarium* spp. sometidas a la prueba cualitativa de actividad inulinolítica (Reacción con Lugol).

En la figura 21 se muestran los resultados de actividad cualitativa de inulinasa de las cepas de *Fusarium* spp., incluyendo las cepas donadas por el CRT. La actividad se observa por la presencia de halos transparentes alrededor del micelio de las cepas, en donde se observó un halo más claro en las cepas de *F. verticillioides* y *F. oxysporum*. Como referencia de la actividad inulinolítica de *Fusarium* spp., Neera *et al.*, (2018) aisló de la planta *Dahlia rhizosphere*, 15 hongos con presunta actividad inulinolítica siguiendo una metodología parecida a la nuestra, siendo *Fusarium* spp., el género que mayor actividad demostró. Nuestros resultados muestran que todas las cepas de *Fusarium* spp., presentaron actividad inulinolítica en el medio modificado de Neera *et al.*, (2018).

9.4 Evaluación del consumo de inulina de agave por *F. verticillioides* en medio líquido de cultivo

Una vez comprobado que *F. verticillioides* es capaz de crecer en un medio con inulina de agave como única fuente de carbono, se decidió cuantificar el consumo del sustrato en un medio líquido. El medio utilizado es una modificación del reportado por Neera *et al.*, (2018) incubando a 30°C por 7 días con agitación a 200 rpm, como se menciona en la sección de metodología.

Para el análisis del consumo de inulina en el medio por *F. verticillioides*, que es un indicativo que se está produciendo la enzima, los azúcares reductores se cuantificaron por el método de DNS (Patrón externo de fructosa figura 1A Anexo), cabe señalar que cada experimento se hizo por separado (prueba 1 y 2). Los resultados muestran una concentración inicial de 0.14-0.15 % de azúcares reductores, lo que indica que la inulina de agave utilizada no estaba pura.

En la figura 22 se observa que *F. verticillioides* a las 24 h de haberse sembrado comienza a producir a la inulinasa extracelular. Esto se denota ya que, en este tiempo la concentración de fructosa en el medio es máxima, lo que indica que la enzima está hidrolizando a la inulina presente en fructosa para que el microorganismo la consuma. También se observa que la actividad enzimática a las 24 h coincide con el inicio de la fase exponencial del hongo en medio sólido y a partir de las 72 h el sustrato ha sido consumido en su totalidad.

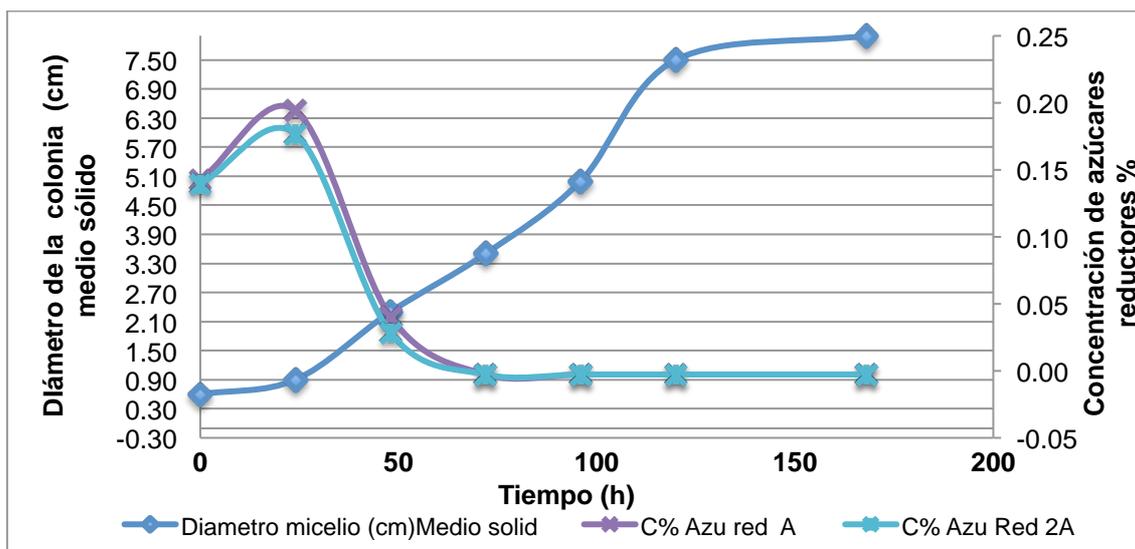


Figura 22. Comparativo del Crecimiento y consumo de inulina por *F. verticillioides*.

**Prueba A1 y A2 (pruebas independientes) = Pruebas 1 y 2 para azúcares reductores método Miller-DNS (% fructosa).

**Diámetro de la colonia (cm) medio sólido= registro de crecimiento del hongo (0-168h).

El consumo de inulina también se siguió mediante cromatografía en capa fina (CCF) (figura 23) en la cual se observó una mayor concentración de fructosa a las 24 h mientras que después de las 48 h la concentración decrece, en concordancia con lo observado en la figura 22.

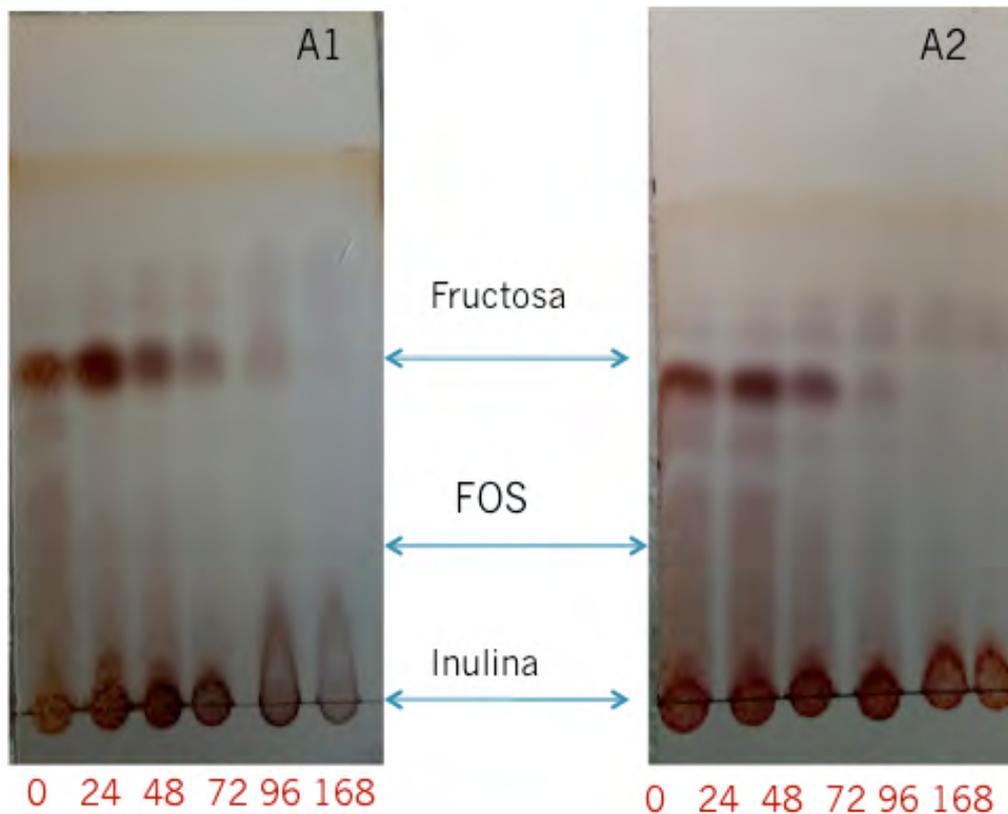


Figura 23. Cromatografía en capa fina pruebas 1 y 2 (muestra A)

*Cada cromatoplaca contiene muestra de sobrenadante del medio de cultivo, de las 0, 24, 48, 72, 96 y 168 h respectivamente.

*Prueba 1 (A1) / prueba 2 (A2)

Los resultados del medio líquido obedecen únicamente a la necesidad de corroborar la producción de la enzima por medio del consumo de inulina y producción de fructosa. Para establecer las condiciones óptimas del medio de cultivo líquido, donde se produce mayoritariamente la enzima, se trabajó a diferentes condiciones de pH (4-8) y temperatura (28, 30, 35 y 40°C).

9.5 Evaluación de la actividad inulinolítica de los extractos de *F.verticillioides* sobre inulina de agave

Previamente se observó que la enzima capaz de hidrolizar a la inulina de agave hasta fructosa era extracelular, por lo que se decidió evaluar la actividad del sobrenadante una vez que el hongo fue separado. Para realizar estos experimentos se usaron los cultivos de *F. verticillioides* después las 72 horas, para asegurar que toda la inulina de medio fue consumida. Las reacciones se

llevaron a cabo en tubos cónicos de 1.5 mL agregando 500 μ L de sobrenadante, 500 μ L de inulina de agave al 1% en buffer de acetatos 50 mM, pH 5 a 50°C por 2 horas a 300 rpm. Después se tomaron muestras para ser analizadas por CCF.

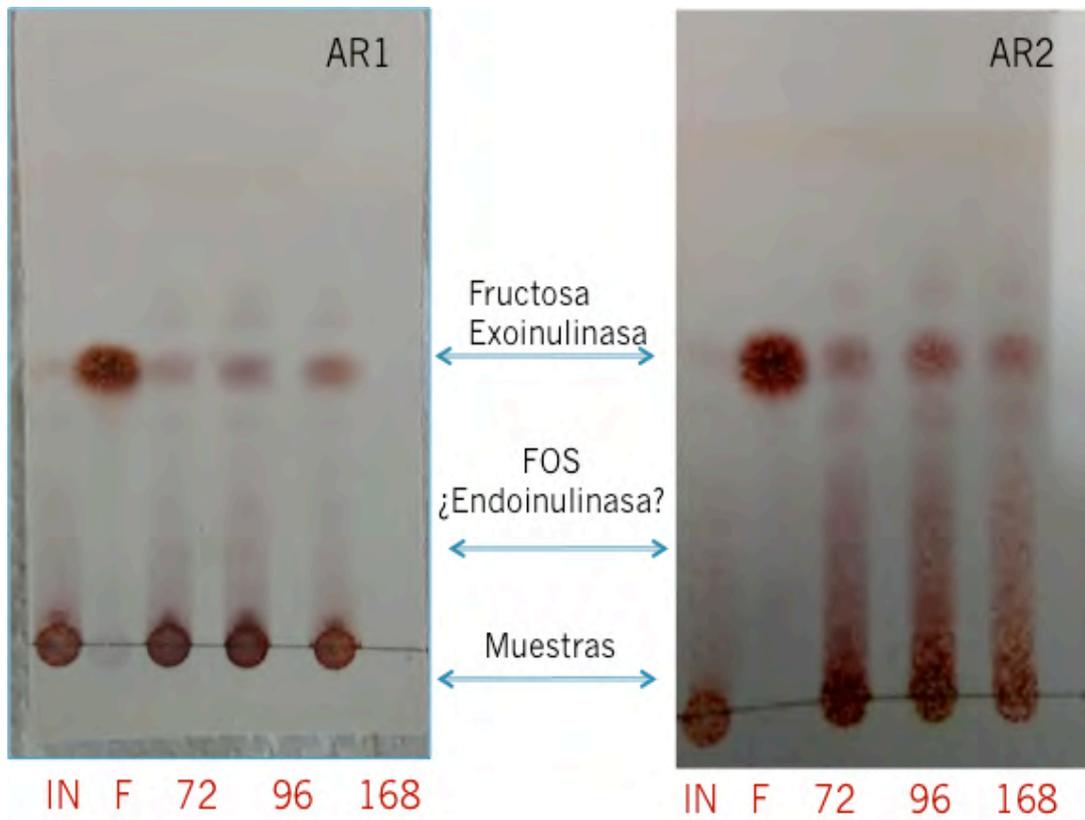


Figura 24. CCF para observar los productos de la actividad enzimática del sobrenadante posterior al consumo total de inulina. IN: estándar de inulina, F: estándar de fructosa, muestra tomadas a las 72, 96 y 168 h de crecimiento.

En las cromatoplasmas (figura 24 AR1 y AR2) se observa que las muestras de cultivo tomadas a las 72, 96 y 168 h, son capaces de hidrolizar a la inulina de agave en fructosa y oligosacáridos. Después de dos horas de reacción, la inulina no está hidrolizada en su totalidad. Podría presumirse la presencia de los dos tipos de inulinasas, exo y endo, ya que se observa la producción tanto de fructosa y fructooligosacáridos. Aunque en el control de inulina se observa un patrón de FOS, cabe señalar que en la reacción enzimática éste se hace más intenso, lo que lleva a suponer que existe la producción de FOS.

9.6 Efecto del pH inicial sobre el consumo de inulina y la actividad enzimática de *F. verticillioides*.

Se evaluó el efecto del pH inicial en el consumo de la inulina con respecto de la producción de azúcares reductores en medio líquido. Para evaluar la mejor condición a la que se produce la enzima. Se trabajó con medios de cultivo con inulina al 1% en un intervalo de pH de 4-8. El análisis de DNS mostró que la cantidad de fructosa producida a las 24 h es máxima a un pH de 4 como se muestra en la figura 25. A las 24 h en pH 4 el hongo produjo en promedio 0.25% de fructosa, la concentración más alta de todos los valores de pH, seguido de 0.13 %, 0.05%, 0.02% y 0.007% a pH 5, 6, 7 y 8 respectivamente. Esto nos indica que probablemente a pH 4 la cantidad de enzima producida es superior comparada con los demás valores de pH.

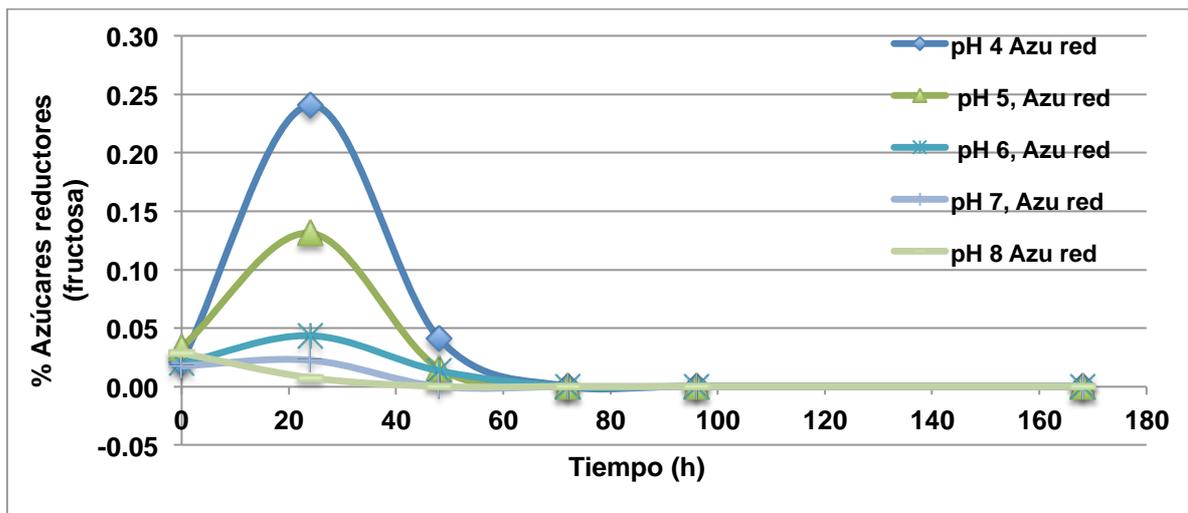


Figura 25. Efecto del pH sobre la producción de azúcares reductores generados por *F. verticillioides*.

Actividad enzimática del sobrenadante

Con el fin de medir la actividad de la enzima contenida en el sobrenadante de los tiempos 72-168 h de crecimiento se realizó la reacción enzimática durante 2 h con inulina de agave 1% (m/v) como sustrato a un pH de 5. Neera *et al.*, (2018) fijaron el valor de pH 5 como óptimo, así como un rango máximo de temperatura de 50-55°C para medir actividad de la inulinasa extraída de *F.*

verticillioides. La actividad enzimática (U/ml) se definió como la cantidad de enzima que produce un μmol de fructosa por minuto y por mL de sobrenadante. Los valores obtenidos en micromoles fueron ajustados a milimoles para una mejor representación gráfica.

Cuando el hongo crece a un pH inicial de 6 durante 168 h la actividad hidrolítica sobre inulina de agave es mayor en un 17 % y 76 % comparado con los demás valores de pH ensayados a las 168 h (figura 26). A pH 6 se obtuvieron 17 mU/ml, este es el mayor valor obtenido a cualquier tiempo y pH. Por otro lado, la actividad a las 72 horas de cultivo es la menor en todos los pH, obteniendo la mínima a pH 4 con 2 mU/ml, por último, a pH 8 no se registró actividad enzimática. Los resultados podrían reflejar una mayor producción de la enzima a pH 6 y por tanto explicaría la actividad observada, lo cual solo se podrá comprobar mediante la actividad enzimática específica, cuantificando la cantidad de proteína presente en el medio.

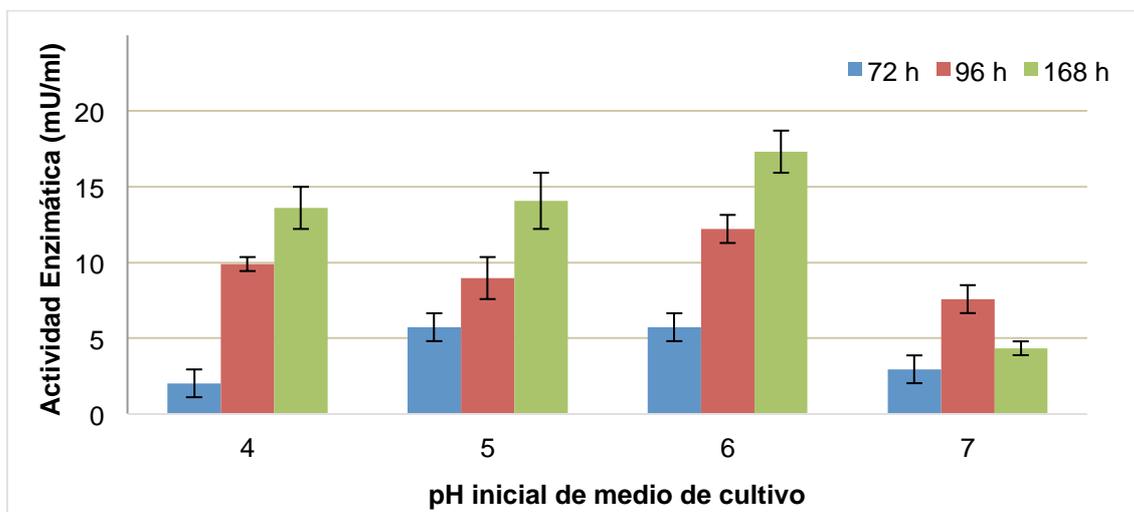


Figura 26. Efecto del pH inicial del medio de cultivo, sobre la actividad enzimática (mU/ml) de *F. verticillioides*, la reacción se llevó a cabo durante 2 horas a un pH de 5, 50°C y 1% de inulina.

Los medios líquidos desarrollaron color naranja-pálido (color salmón) a pH 4, 5, 6 y 7. La intensidad del pigmento es mayor a valores de pH ácidos y va disminuyendo conforme aumenta el pH del medio (figura 27). A pH 8 no se

observó generación de pigmento durante todo el experimento en comparación con los demás medios debido al nulo desarrollo del hongo.



Figura 27. Imágenes de los medios líquidos fijados a pH 4, 6 y 7 a 168 h de incubado

9.6.1 Cromatografía en capa fina prueba complementaria de actividad enzimática

Para visualizar los productos de la actividad enzimática se realizaron análisis en CCF (figura 28). En todos los tiempos de incubación se observó la presencia de la fructosa (línea azul) como producto de la hidrólisis. Cabe mencionar que la inulina de agave no es pura contiene trazas de FOS y fructosa como se observó en la primera muestra "IN" (derecha a izquierda).

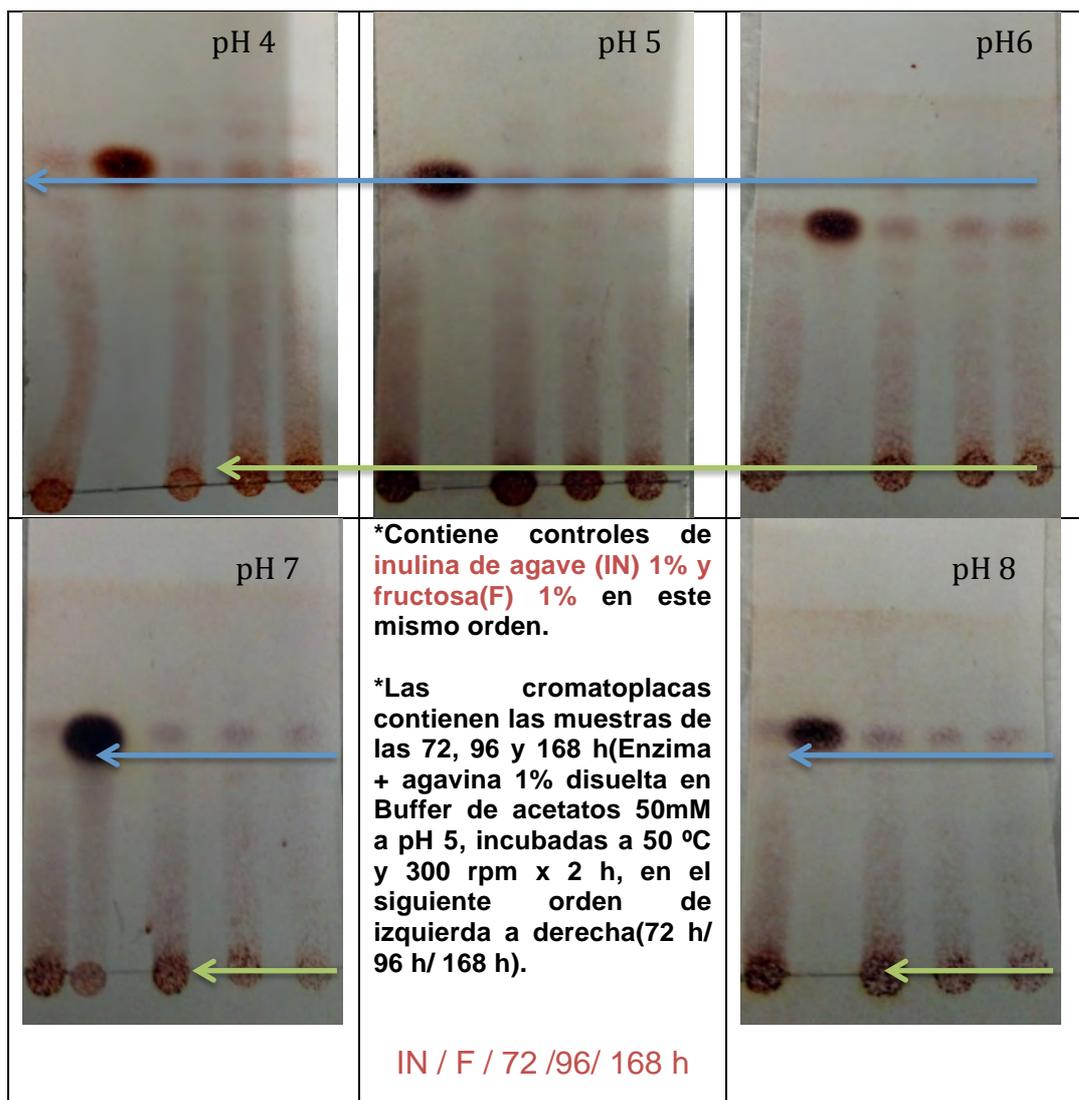


Figura 28. Cromatografía en capa fina, efecto del pH inicial (4-8) del medio sobre la actividad enzimática.

*Fructosa (línea azul) / FOS (línea roja) / (línea verde) -- sobrenadante + agavina 1%, incubado a 50°C por 2 h.

Visualmente parece haber mayor hidrólisis en los sobrenadantes provenientes de los medios a pH 5 y 6, corroborándose lo obtenido en los análisis de DNS para estos valores de pH. A pH 7 la cantidad de fructosa liberada es menor comparada con los pH 5 y 6 y finalmente a pH 8 no se observan productos de hidrólisis, lo que se observó es la fructosa y FOS propios de la inulina utilizada.

9.7 Efecto de la temperatura en el consumo de inulina por *F.verticillioides* en medio líquido

En la figura 29 se observa que *F.verticillioides* consume de manera óptima en un intervalo de temperatura de 28 a 35°C a pH 6. Se puede observar que, en todas las temperaturas de prueba, el hongo a partir de las 24 h empieza a secretar la enzima que hidroliza a la inulina en fructosa. A los 40°C el hongo no creció en el medio de cultivo, no mostraba biomasa suspendida ni pigmentación, como sí lo mostraron los demás medios incubados a 28-35°C.

Se observó que, a las 24 h en las distintas temperaturas, con excepción de 40°C se produce una enzima que hidroliza la inulina de agave, mientras que a las 48 h se muestra el completo consumo de azúcares reductores, lo que indicaría que el microorganismo está metabolizándolos.

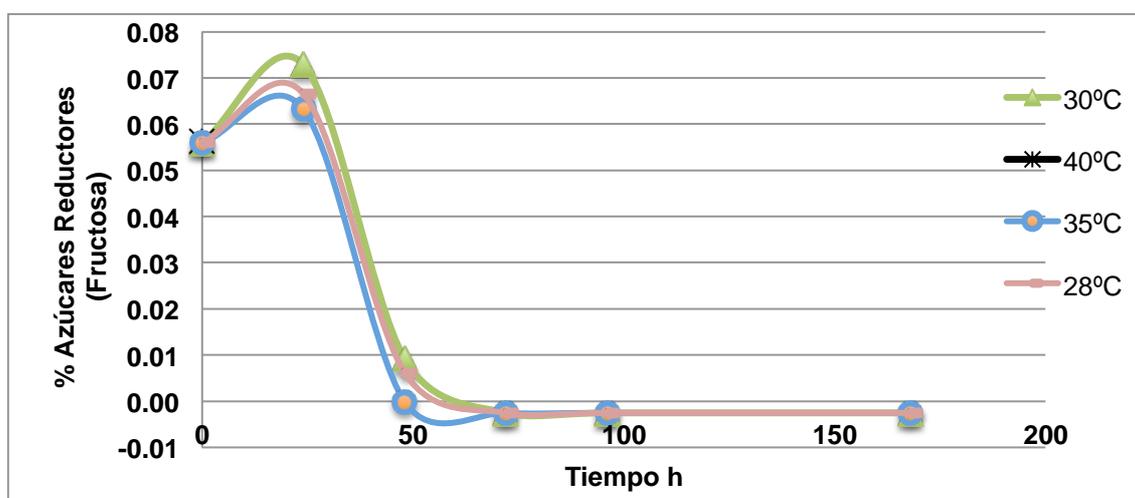


Figura 29. Efecto de la temperatura sobre la producción de fructosa por *F.verticillioides*.

Se midió la actividad enzimática, se hizo reaccionar la enzima contenida en los sobrenadantes de los medios a distintas temperaturas de producción de fructosa con el sustrato problema (inulina de agave 1%). La actividad enzimática aumenta conforme pasa el tiempo de incubación y conforme aumenta la temperatura (figura 30). La enzima proveniente de un medio de cultivo incubado a 35°C a pH 6, y cuya reacción enzimática fue probada a 50°C a pH 5 (buffer de acetatos 50 mM por 2 h) registró su mayor actividad a las 168

h con 23 mU/mL, 40% más que a 30°C esto es de importancia ya que nos hace ver que la actividad de la enzima y el crecimiento del hongo no son directamente proporcionales. Con respecto al medio de cultivo a 40°C no se registró actividad enzimática ni crecimiento del hongo.

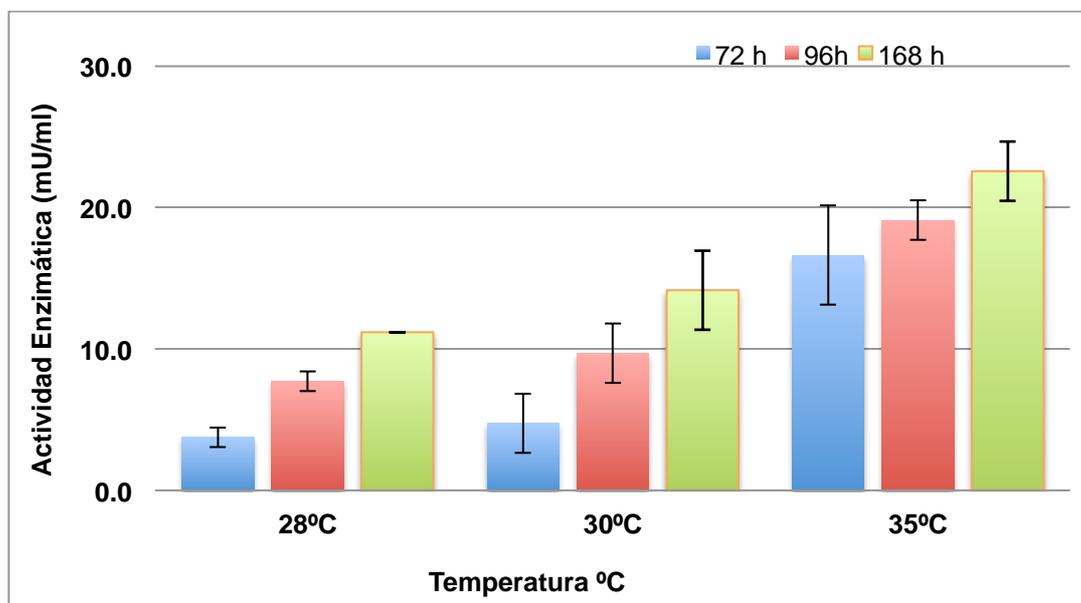


Figura 30. Efecto de la temperatura inicial del medio de cultivo sobre la actividad enzimática.

*La reacción enzimática fue probada a 50 °C, 500 µL de extracto enzimático + 500 µL de inulina de agave 1% disuelta en buffer de acetatos a pH 5.

9.8 Cuantificación de proteína

Una vez que se determinaron la fructosa y los FOS como productos de la reacción enzimática, se determinó la cantidad de proteína extracelular producida por *F. verticillioides* a los diferentes pH a 35 °C, utilizando como patrón albúmina bovina sérica (figura 2A Anexo). En la figura 31 se muestra que desde las 24 h y hasta las 48 h a pH 6 no se observó generación de proteína en gran cantidad para ser registrada, a las 72 h y mismo pH se obtiene la concentración más alta de proteína (0.1 mg/mL) en todos los tiempos y pH. También se observa que la concentración de proteína se mantiene a lo largo del tiempo. Esta tendencia aparece en todos los ensayos, a pH 4 y 5 se registró un comportamiento muy similar entre ellos, en cuanto a la concentración de proteína a las 72 h a pH 4 se obtiene 0.05 mg/mL y conforme pasan los días la proteína alcanza una concentración máxima de 0.06 mg/mL,

a pH 5 a las 72 h se tiene una concentración de proteína de 0.06 mg/mL, conforme avanzaron los días de incubación va disminuyendo, probablemente debido a una proteasa propia del hongo, así pues no se observa una caída drástica en la misma; en cuanto a pH 7 se observó que el hongo no generó una gran cantidad de proteína, su máxima concentración se da a las 72 h con 0.01 mg/mL con una caída mínima en su concentración conforme los días de incubación.

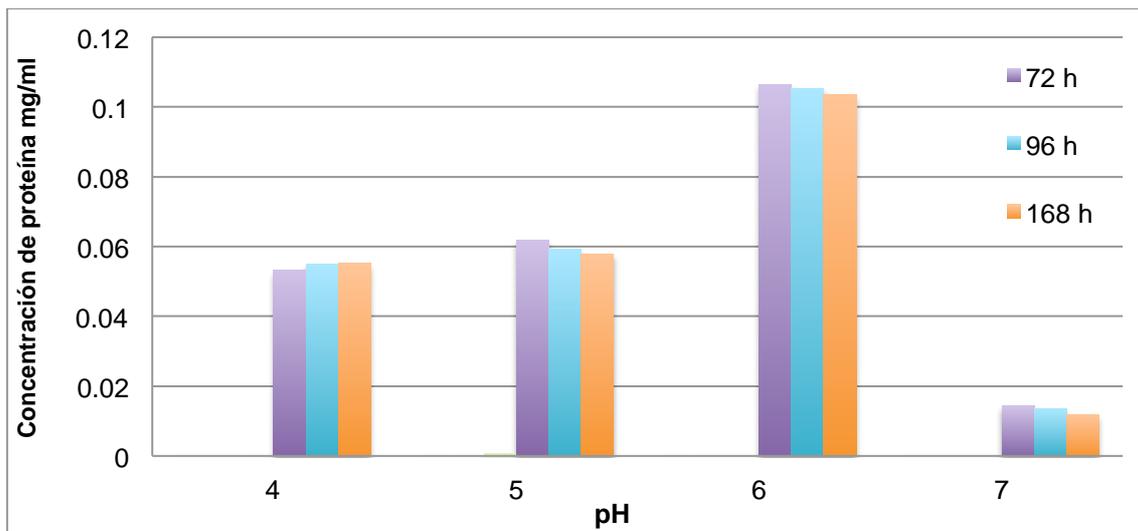


Figura 31. Concentración de proteína generada a distintos pH de medio de cultivo con inulina de agave 1%

Estos resultados concuerdan con la actividad enzimática mostrada en las figuras 26 y 30, donde se observa una máxima actividad a pH 6. Esto podría ser producto de una mayor concentración de enzima a este pH y temperatura. Sin embargo, aunque existe un incremento en la concentración de proteína relacionado a la actividad, esto únicamente se podría comprobar si se purifica la enzima.

9.9 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la inulinasa de *F. verticillioides*.

Una vez encontradas las mejores condiciones de crecimiento donde el hongo produce mayor cantidad de la enzima (incubación a 35°C, pH 6 y 168 h), se decidió evaluar la actividad enzimática del sobrenadante a diferentes temperaturas. En la figura 32 se muestra la actividad de la inulinasa de *F. verticillioides* en un intervalo de temperatura de 20 a 60°C. Se alcanza el máximo a los 50°C con una actividad de 27 mU/mL, tomando esa temperatura y actividad como el 100% podemos observar que a los 55°C (2.2 mU/mL) la actividad enzimática se pierde en un 90% por lo que la enzima probablemente se desnaturalizó. La inulinasa de *Fusarium* sp., tiene su máxima actividad en un medio con 30% de inulina a los 55°C con tiempo de reacción de 30 minutos a pH 6 (Neera *et al.*, 2018). La diferencia entre esta y la de *F. verticillioides* pudiera deberse a la especie de *Fusarium* sp., utilizada, así como de la naturaleza de la inulina empleada, que en nuestro caso la inulina fue de agave que está altamente ramificada.

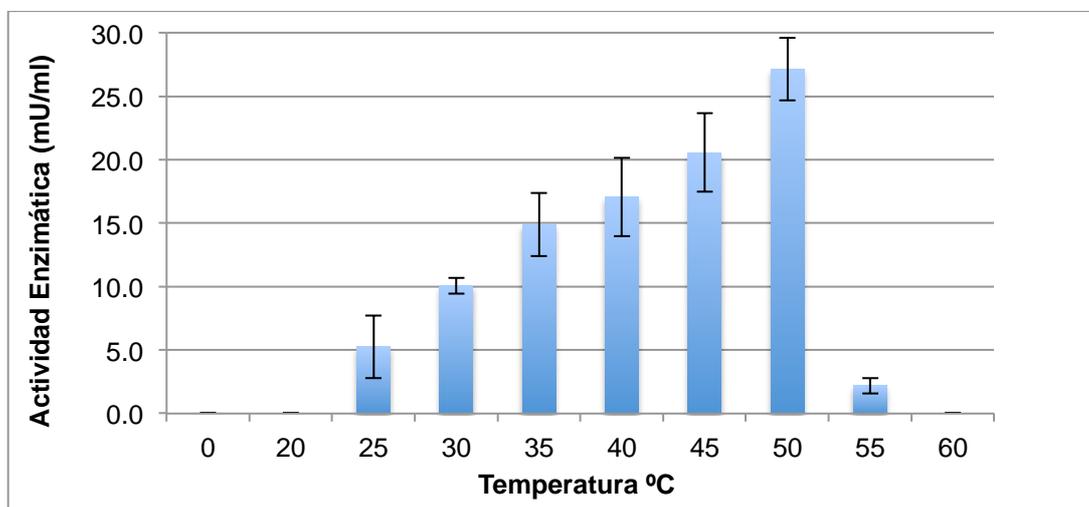


Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

*La reacción enzimática fue probada a distintas temperaturas en tubos cónicos de 1.5 mL agregando 500 µL de extracto enzimático a 168 h incubado + 500 µL de inulina de agave 1% disuelta en buffer de acetatos a pH 6, por 2h.

10. Efecto de pH sobre la actividad enzimática

El siguiente paso dentro de la caracterización de la enzima, fue evaluar el efecto del pH sobre su actividad. La temperatura que se empleó para llevar a cabo la reacción fue la 50°C, que fue la mejor temperatura de reacción.

La reacción enzimática probada a distintos valores de pH tuvo una actividad máxima a pH 6 con 20 mU/mL, seguido a pH 5 con 15 mU/mL (figura 33). A pH 7 la actividad decrece en más del 50% lo que nos hace suponer que la enzima se desnaturalizó.

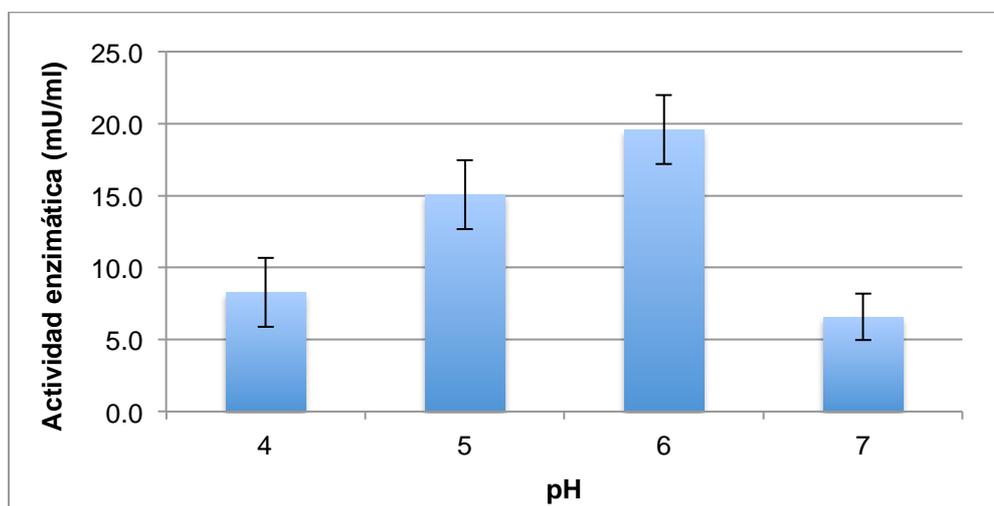


Figura 33. Efecto del pH sobre la actividad enzimática, utilizando extracto tomado del sobrenadante de medio de cultivo (*F.verticillioides*) a pH 6 a 30 °C.

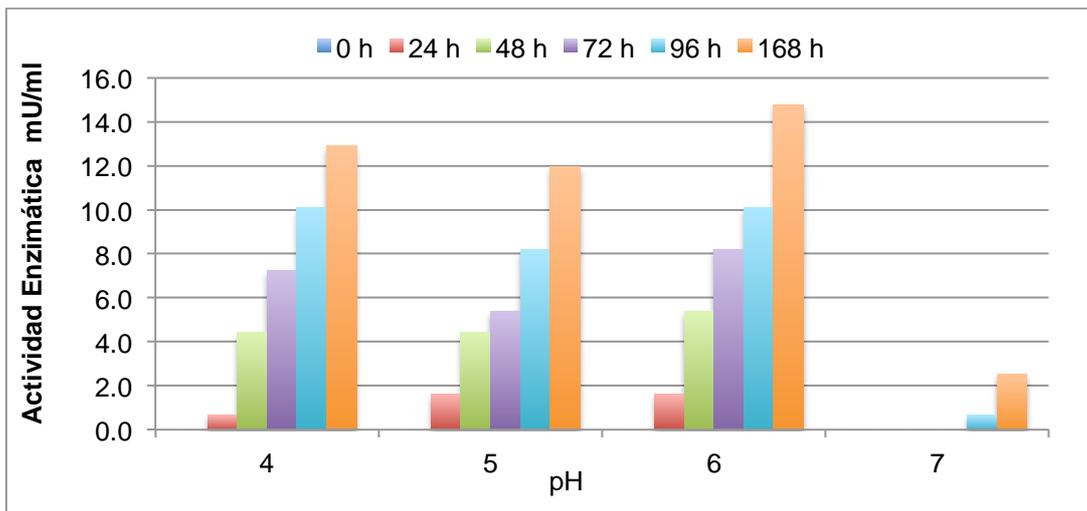
*En tubos cónicos de 1.5 mL se agregaron: 500 μ L de extracto enzimático a 168 h de incubado, con 500 μ L de inulina de agave 1% disuelta en buffer de acetatos 50 mM (pH 4,5 y 6) o buffer de fosfatos 50mM a pH 7 y 8.

*La reacción fue probada a la temperatura óptima de la enzima (50°C) vista en la figura 34, incubada por 2 h a 300 rpm.

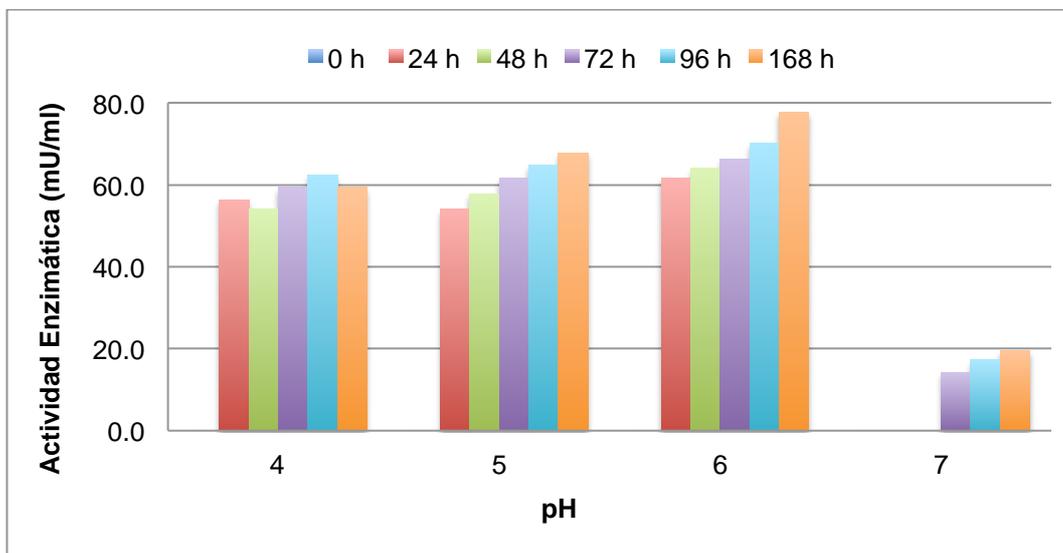
11. Efecto del sustrato sobre la actividad enzimática (*F. verticillioides*).

Como última etapa se decidió estudiar el efecto de otro sustrato además de la inulina de agave. Este sustrato fue la inulina de achicoria, que es una inulina lineal con únicamente con enlaces glucosídicos β -(2-1). Los resultados (figura

34) muestran que la enzima tiene mayor actividad sobre inulina de achicoria y a 168 h de incubación. Con la inulina de achicoria se alcanzó una actividad de 78 mU/mL, mientras que con la inulina de agave la máxima fue de 15 mU/mL, 5 veces menos. Esto se debe a que la inulina de achicoria es menos compleja estructuralmente que la de agave.



Inulina de agave 1 %



Inulina de achicoria 1 %

Figura 34. Actividad enzimática con distintas fuente de inulina (agave vs achicoria).

*Sobrenadante de medio de cultivo incubado a pH 6, 35°C e inoculado con *F.verticillioides*.

* La reacción se llevó a cabo con 500 µL sobrenadante + 500 µL de agavina o inulina de achicoria 1% disuelta en Buffer de acetatos o Buffer de fosfatos a pH 6, por 2 h a 50°C y 300 rpm.

12. Conclusiones

Las cepas de *Fusarium* spp., que se estudiaron en el proyecto fueron capaces de crecer en un medio de cultivo con inulina de agave como única fuente de carbono.

Se registró que las cepas, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* y CRT-197 muestran velocidades de crecimiento mayores que el resto de las cepas trabajadas en medio de cultivo con inulina de agave 1% como única fuente de carbono

Se encontraron las mejores condiciones de sustrato, temperatura y pH a las cuales el hongo *F. verticillioides* produce una inulinasa que hidroliza a la inulina de agave: 1% de inulina de agave, 35°C y pH 6.

Se determinó con base en los análisis cualitativos que las cepas antes mencionadas muestran actividad inulinolítica por la observación de halos transparentes de hidrólisis alrededor del micelio de los hongos.

La máxima actividad de la enzima se observó a 50°C y pH 6 (27 mU/ml)

Las cromatografías en capa fina realizadas durante todo el proyecto mostraron que existe una enzima exoinulinasa que degradó la inulina de agave en fructosa-

La enzima mostró preferencia de sustrato por la inulina de achicoria sobre inulina de agave, esto debido a la estructura de la inulina de achicoria la cual es en su mayoría lineal sin muchas ramificaciones o enlaces β -(2,6).

13. Perspectivas

- ❖ Optimizar el medio de cultivo para obtener mejores cantidades de proteína, así como de actividad enzimática.
- ❖ Purificar y caracterizar bioquímica y cinéticamente la enzima proveniente de *F.verticillioides*.
- ❖ Determinar un método para inmovilizar la enzima ya que nuestra enzima no resiste temperaturas por encima de los 50°C, esto es importante ya que se plantea utilizar industrialmente y obtener un producto de valor agregado.
- ❖ Identificar las cepas provenientes del agave infectado y caracterizar la cepa CRT-197 la cual mostró la velocidad radial, de crecimiento más alta de todas las cepas, así como actividad inulinolítica (halo de hidrólisis) en medio que contenía inulina de agave como única fuente de carbono.

14. Anexo

Curva patrón de fructosa 0%-1.5% (externo) para realizar los análisis cuantitativos de azúcares reductores producidos por la enzima extracelular de *F. verticillioides*.

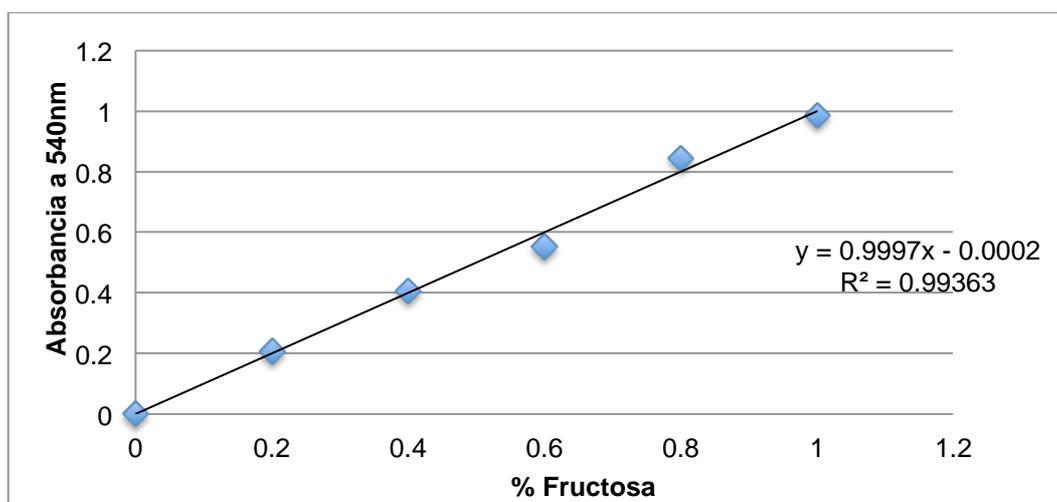


Figura 1A. Curva patrón de fructosa para análisis cuantitativos.

Curva patrón albúmina bovina sérica (BSA) utilizada para cuantificar la proteína contenida en los medios de cultivo líquidos inoculados con *F. verticillioides*, concentración 0-1mg/ml.

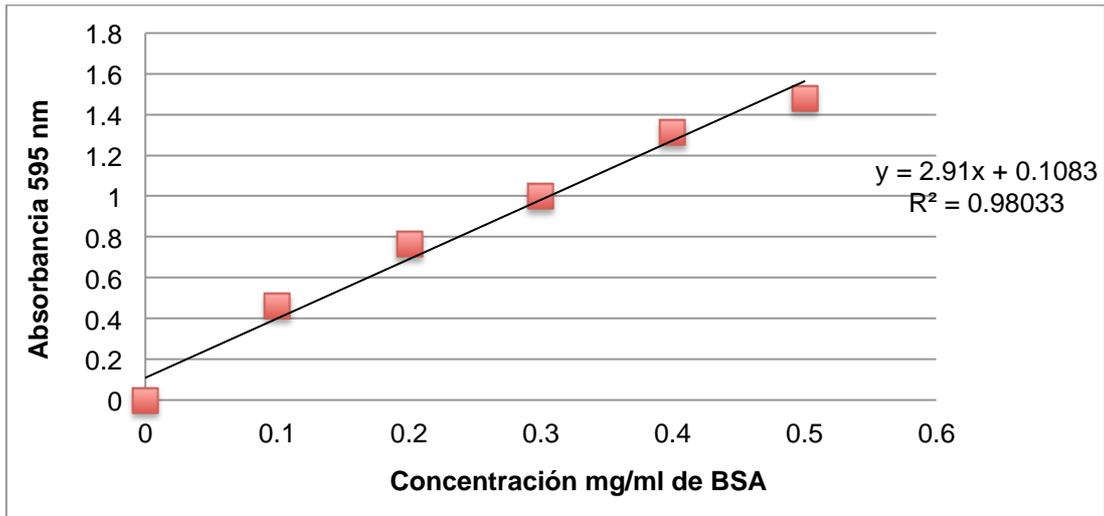


Figura 2A. Curva patrón (BSA) para cuantificación de proteína método Bradford.

15. Bibliografía

Aceves, R.J.J. (2003). Prevención y Manejo Integral de la Marchitez de *Agave tequilana* Weber. var. azul en Jalisco. Folleto Técnico No. 1. Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, INIFAP. 62 p.

Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. 5th ed. Amsterdam, Países Bajos. Elsevier Academic Press.

Ávila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Hernández Motzezak, R., Chirinos, M., Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. Multiciencias [en línea] 2012, 12 (Abril-Junio) : [Fecha de consulta: 2 de mayo de 2019] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90424216002> ISSN 1317-2255

Bacon, C. W., y Nelson, P. E. (1994). Fumonisin Production in Corn by Toxigenic Strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. J. Food. Prot. 57(6), 514-521.

Blacutt, A. A., Gold, S. E., Voss, A. K., Gao, M. y Glenn, E. A. (2018). *Fusarium verticillioides*: Advancements in Understanding the Toxicity, Virulence, and Niche Adaptation of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize. *Phytopathology*, 108(3), 312-326.

Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Barragán, B., Téllez, Y., y Laguna, A. (2008). Utilización de residuos agroindustriales. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 44-50.

Bautista Justo, M., & García Oropeza, L., & Salcedo Hernández, R., & Parra Negrete, L. A. (2001). Azúcares en agaves (agave tequilana Weber) cultivados en el estado de guanajuato. *Acta Universitaria*, 11(1), 33-38. [fecha de Consulta

7 de Mayo de 2020]. ISSN: 0188-6266. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=416/41611105>

Casadevall, A. (2007). Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol. Rev.* 21(4), 130-132.

Castillo, A. y Chamy, R. (2010). Producción de inulinasa por levaduras *Kluyveromyces marxianus*. *Sci. Agropecu.* 1: 235-245.

Cimini, S., Di Paola, L., Giulliani, A., Ridolfi, A. y De Gara., L. (2016). GH32 family activity: a topological approach through protein contact networks. *Plant Mol. Biol.* 92(4-5), 401-410.

Claessens, G., Van Laere, A. y De Proft, M. (1990). Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus L.*). *J. Plant. Physiol.* 136(1), 35-39

Cuevas, E. (2016). Estudio de las actividades enzimáticas y del mecanismo de degradación de la inulina y agavina por *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC15697 (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

Díaz De Castro, F., Restrepo, M., y Rojas, W. (2007). Microbiología de las infecciones humanas. Primera Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín. Colombia.

Dulce María Díaz-Montaño (30 de abril de 2013). Fermentación continua de jugo de agave para producir bioetanol, biomasa ahora: crecimiento y uso sostenibles, Miodrag Darko Matovic, IntechOpen, DOI: 10.5772 / 55923. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/biomass-now-sustainable-growth-and-use/continuous-agave-juice-fermentation-for-producing-bioethanol>

Duarte, Y., Echevarría, A y Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 31, pp. 173-183.

Dueñas, G., Shangarodsky, T., Fresneda J., Hernández, F. y González, J. (2007). Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias Ciudad Habana y la Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 11(32), 63-66.

Estrada, G., y Ramírez, M. (2019). Micología general. Recuperado de http://www.ucm.edu.co/wp-content/uploads/libros/Micologia_general.pdf

García, A. (2007). Los agaves de México. *Revista Ciencias*, 87: 14-23.

García Garibay M., Quintero., R. y López-Munguía, A. (2004). *Biotechnología Alimentaria*, México D.F., Editorial Limusa pp. 105-109.

Granjo, C., Dos Reis, T., Gambale, W., y Correa, B. (2007). Morphogenesis and growth kinetics of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia*, 164: 119-126

Groenewald, S. (2006). Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. (Tesis doctoral). University of Pretoria, Gauteng, Sudáfrica.

Gómez, M., y Acero, F. (2011). Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal. *Rev. Repert. Med. Cir.* 20(2), 74-82.

Huitron C., R. Perez, A.E. Sanchez, P. Lappe, L. Rocha. (2008). Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes. *J. Environ. Biol.* 29(1), 37-41

Kango, N., y Jain, S. (2011). Production and properties of microbial inulinases: recent advances. *Food. Biotechnol.* 25(3), 165-212.

Kwon, H., Jeon, S., y You, D. (2003). Cloning and characterisation of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol. Lett.* 25, 155-159.

Lehninger, A.L., Nelson, D., y Cox, M.M. (2005). *Principles of Biochemistry* (4th Ed). New York, EUA: Editorial W.H. Freeman & Company.

Lehninger, A., Nelson, D., y Cox, M., *Principios de Bioquímica* 4^a Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, p. 190.

Leslie, J., Summerell, B. y Bullock, S. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Iowa, USA: Editorial Blackwell Publishing.

López, M., Mancilla, N., y Mendoza, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *J. Agric. Food Chem.* 51(27), 7835-7840.

Macías de la Cerda, G., Veana, F., Contreras Esquivel, J., Aguilar, C., 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*, 24(67), 33-37.

Madrigal, L., y Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION* Organó Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 57(4), 387–392.

Mancilla, N., y López, M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *J. Agric. Food Chem.* 54(20),7832-7839.

Martín, M., Martín, M.T., y Pinto, G. (2013). Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas. *Educ. quím. (online)*, 24(1),31-36.

Miller G., (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.

Moshfegh, A., Friday, J., Goldman, J., y Ahuja, J. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *J. Nutr.* 129 (7), 1407S-1411S.

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 de *Agave tequilana Weber AZUL*. *Bioagro.* 23(3), 199-206.

Nandra, S., y Bhatia, I. (1979). Studies on fructosyl transferase from *Agave americana*. *Phytochemistry*, 18(6), 923-927

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, *J. Ferment. Bioeng.* 80, 164-168.

Neera, K., Ramana, V., Gopalan, N., y Sharma, R. (2018). Production of Inulinase by *Fusarium sp.* and its Application for Fructooligosaccharide Production for use as Prebiotics, *Def. Life Sci. J.* 3(1), 45-50.

Olvera C., Castillo, E., y López, A. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotechnol.* 14, 327-345.

Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M., Caracuel, Z., Roncero, M., Mayayo, E. y Di prieto, A. (2004). *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect. Immun.* 72(3), 1760-1766.

Pedreschi, R., Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., y Cisneros, L. (2003). Andean Yacón Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. *J. Agric. Food Chem.* 51(18), 5278-5284

Pandey, A. (2006), Enzyme Technology, New Delhi, India: Editorial Springer.

Pérez, R. (2016). Extracción y caracterización de una exo-inulinasa procedente de *Bacillus amyloquefaciens* con actividad sobre fructanos de *Agave tequilana* Weber var azul (agavinas). (Tesis de licenciatura), Universidad Autónoma de México, Departamento de alimentos y biotecnología, Ciudad de México.

Poorna, V., y Kulkarni, P. (1995). A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design, *Bioresour. Technol.* 54(3), 315-320.

Pouyez J., Mayard A., Vandamme A., Roussel, G., Perpète, E., Wouter, J., Housen, i., y Michaux, C. (2012). First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: Discovery of an extrapocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity, *Biochimie.* 94(11), 2423-2430.

Quintero, R. (1981). Ingeniería Bioquímica: teoría y aplicaciones. Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM, México D.F, México: Editorial ALHAMBRA, S.A.

Nagem, R., Rojas, A., Golubev, A., Komeeva, O., Eneyskaya, O., Klulminskaya, A., Neustroev, K., y Polikarpov, I. (2004). Crystal Structure of Exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The Enzyme Fold and Structural Determinants of Substrate Recognition, *J. Mol. Biol.* 344(2), 471-480.

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.* 137(3), 830S-837S.

Robles, L., Leyva, S., Cruz, G., Camacho, A., Nieto, M., y Tovar, J. (2016). *Fusarium oxysporum* Schltld. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus spp.* en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(36), 25-36.

Ricca, E., Calabró, V., Curcio, S., y Iorio, G. (2007). The State of the Art in the Production of Fructose from inulin Enzymatic Hydrolysis. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27(3), 129-145.

Ritsema, T., y Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6(3), 223-230.

Sanabria, N., Guadarrama, A. y Romero, H. (2002). Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia.* 28: 161-173.

Seminario, J., Valderrama, M., y Manrique, I. (2003). El Yacón fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), Lima, Perú, 60p.

Sheng, J., Chi, Z., Li, J., Gao, L. y Gong, F. (2007). Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Process Biochem.* 42(5). 805-811.

Treichel, H., *et al.* A review on the production and partial characterization of microbial inulinases. *Global J. Biochem.* 2012, 3: 7.

Tuohy, K., Rouzand, G., Bruck, W., y Gibson, G. (2005). Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment. *Curr. Pharm. Des.* 11(1), 75-90

Ulloa, J., Andrews, H., Rodríguez, G., Ulloa, P., Rangel, B., Ramírez, J. (2010). Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. *Revista Fuente Año,* 2(5), 57-62.

Valencia, M. (2009). Caracterización enzimática de cepas de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.