



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Producción y caracterización de una fructosilhidrolasa de *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP recombinante”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Alam Uriel Abad González

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Carmina Montiel Pacheco
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig
Instituto de Química, UNAM

Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Noviembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Dedico este trabajo a mis padres, Daniel Abad Carreño y Leticia González Álvarez. Infinitas gracias por el amor, apoyo y cariño que me han brindado a lo largo de toda mi vida. A ustedes que me han sido mi refugio y apoyo incondicional aún en las circunstancias más adversas.

A mis amigos Jorge Benites, Carlos Espinal, Carlos Mondragón, Alejandro Zamora, Jesús Sánchez y Luis Gómez, por más de 12 años de amistad y por estar siempre para mi.

A mi tutora, Carmina Montiel Pacheco por aceptarme en su equipo de investigación y creer siempre en mi y a todo el laboratorio 314 por los buenos momentos vividos.

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

Agradecimiento a CONACyT por la beca otorgada para los estudios de maestría.

Índice

1. RESUMEN.....	5
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. EL AGAVE	6
2.1.1. Usos y aplicaciones del Agave	7
2.1.2. El Agave tequilana Weber var. Azul y su composición.	8
2.2. LOS FRUCTANOS.....	10
2.3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DEL <i>A. TEQUILANA</i> WEBER VAR. AZUL.	12
2.4. GLICOSIL-HIDROLASAS. CLAN GH-J: FAMILIAS GH32 Y GH68	15
2.4.1. Inulinasas	18
2.4.2. Levanasas.....	20
2.4.3. Levansacararas	22
2.5. <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> 12GEP	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	27
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	27
6. METODOLOGÍA	29
MATERIALES	30
6.1. VIABILIDAD Y PUREZA DE LA CEPA <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> 12GEP	30
6.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> 12GEP	31
6.2.1. Obtención de la fracción enzimática.....	31
6.2.2. Cuantificación de azúcares reductores por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS)	31
6.2.3. Determinación de los productos de la hidrólisis de fructanos y sacarosa por cromatografía en capa fina (TLC)	32
6.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL POR EL MÉTODO DE BRADFORD.....	32
6.4. OBTENCIÓN DEL PATRÓN DE PROTEÍNAS DEL EXTRACTO CRUDO MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	33
6.5. BÚSQUEDA DE GENES CODIFICANTES PARA FRUCTOSILHIDROLASAS EN EL GENOMA DE <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> 12GEP.....	34
6.5.1. Análisis bioinformático del genoma de <i>B. amyloliquefaciens</i>	34
6.5.2. Extracción de DNA.....	35
6.5.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %.....	36
6.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
6.6. CLONACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN pGEM-T EASY VECTOR	37
6.6.1. Purificación de DNA.....	37
6.6.2. Ligado de los genes de interés en pGEM-t easy vector.....	38
6.6.3. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	38
6.7. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS	39
6.7.1. Selección de colonias transformantes y extracción de pDNA.....	39
6.7.2. Análisis del pDNA extraído	40
6.7.3. Secuenciación y análisis in-silico.....	41
6.8. SUBCLONACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN PET28B(+).....	41
6.9. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN <i>E. COLI</i> BL21(DE3).....	42
6.9.1. Selección de las colonias óptimas para la expresión	42
6.9.2. Inducción de la expresión	42
6.9.3. Comprobación de la inducción y disrupción celular	42
6.10. COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO CRUDO RECOMBINANTE.....	43
6.11. PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES.....	44

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
7.1. VIABILIDAD Y PUREZA DE LA CEPA DE <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> 12GEP	45
7.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	46
7.2.1. <i>Cuantificación de proteína por el método de Bradford y SDS-PAGE.</i>	46
7.2.2. <i>Determinación de la actividad inulinolítica de B. amyloliquefaciens 12GeP por el método de DNS</i>	46
7.2.3. <i>Determinación de los productos de la hidrólisis de fructanos y sacarosa por cromatografía en capa fina (TLC)</i>	48
7.3. BÚSQUEDA DE GENES CODIFICANTES PARA FRUCTOSILHIDROLASAS EN EL GENOMA DE <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> 12GEP	49
7.3.1. <i>Análisis bioinformático del genoma de B. amyloliquefaciens</i>	49
7.3.2. <i>Extracción de gDNA y amplificación de los genes de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	52
7.4. CLONACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN PGEMT-EASY VECTOR	53
7.6. SUBCLONACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN PET28B(+)	60
7.7. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN Y COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	61
8. CONCLUSIONES.....	68
9. PERSPECTIVAS.....	69
REFERENCIAS.....	70
ANEXOS	80

1. Resumen

Cada año aproximadamente 600 mil toneladas de hojas de *Agave tequilana* Weber var. Azul, ricas en agavina, son generadas como desechos en la producción de tequila. La agavina es un polímero complejo compuesto por unidades de fructosa y una unidad de glucosa por molécula, unidas por enlaces β -(2-1) y β -(2-6) que se puede utilizar para producir otros compuestos de valor agregado como lo son los fructooligosacáridos (FOS), jarabes de fructosa y bioetanol, entre otros.

Por otro lado, se han aislado diversos microorganismos con capacidad de utilizar a la agavina como única fuente de carbono. En este proyecto se comprobó que *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP, aislado a partir de la descomposición del bagazo de agave, es capaz de producir al menos tres fructosilhidrolasas que en conjunto son capaces de hidrolizar a la agavina. Dichas enzimas corresponden a una inulinasa, una levanasa y una levansacarasa, las cuales fueron producidas de manera recombinante, permitiendo su purificación (a excepción de la levansacarasa) y caracterización parcial frente a cuatro sustratos diferentes: sacarosa, levana, inulina de achicoria y agavina. En esta investigación se concluye que la hidrólisis de agavina es realizada por la inulinasa, probablemente en sinergia con la levanasa y levansacarasa.

2. Marco teórico

2.1. El agave

El género *Agave* agrupa a un gran número de plantas suculentas, xerófitas, perennes, en su mayoría monocárpicas, que alcanzan la madurez entre los 4 y los 25 años, que se reproducen tanto de manera sexual como asexual y que realizan metabolismo fotosintético tipo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) (Domínguez, *et al.*, 2008). Sus características morfológicas y fisiológicas varían con la especie. En general, tienen entre 5 y 200 hojas por planta que se disponen en espiral formando rosetas alrededor del tallo (comúnmente conocido como piña), su inflorescencia suele ser desproporcionada en relación con el tamaño de la planta y su fruto es una cápsula trilocular seca que contiene semillas negras aplanadas (Fig. 1).



Fig 1. Agave tequilana Weber var. Azul

La resistencia de estas plantas a las condiciones áridas desfavorables se debe a las modificaciones en la estructura básica de la planta que le permiten limitar la pérdida de agua por transpiración (Ritsema y Smeekens, 2003). El género *Agave* es endémico de América, se encuentra ampliamente distribuido, abarcando desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del Caribe. En México, se encuentra ampliamente distribuido abarcando el 75% de

territorio. De las 207 taxa o 166 especies de agave, 161 taxa y 125 especies (el 75%) son endémicas de México (Fig. 2) (García y Galván, 1995).



Fig 2. Distribución de la familia Agavaceae. Tomado de García y Galván, 1995.

2.1.1. Usos y aplicaciones del Agave

Desde épocas precolombinas, el agave ha sido fuente de muchos productos derivados, principalmente de la savia, llamada comúnmente “aguamiel”, que contiene una alta concentración de azúcares fermentables (Santos, *et al.*, 2012). También, es un recurso importante desde el punto de vista agroecológico y socioeconómico debido a la gran variedad de usos que se le da, dependiendo de la región donde se ubique, que van desde su empleo como leña, hasta ornamental y gastronómico (García, *et al.*, 2010). Algunos de los usos más importantes que se le da son: gastronómico (azúcares, extracción de gusanos de maguey, preparación de mixiote, etc.), bebidas alcohólicas (mezcal, pulque y tequila), agrícola (evita erosión del suelo, equilibra pH, abono orgánico), medicinal (FOS, y saponinas, antiinflamatorios), cosmético (producción de shampoos, jabones y cremas), entre otros.

Además de fructosa y otros azúcares fermentables, el agave contiene otros compuestos con propiedades benéficas para la salud, como lo son los

fructooligosacáridos (FOS) que funcionan como prebióticos o como materia prima para la producción de jarabes de alta fructosa, que tienen la característica de ser más dulces que la sacarosa (hasta 1.5 veces más dulce) o como fuente de azúcares fermentables para la producción de bioetanol y bebidas alcohólicas como el pulque, el mezcal y el tequila (Santos, *et al.*,2012).

2.1.2. El *Agave tequilana* Weber var. Azul y su composición.

Es de especial interés el género *A. tequilana* Weber ya que se utiliza para la producción de uno de los aguardientes más famosos a nivel mundial, el tequila. Tan solo en el 2019 se produjeron 351,700,000 L de tequila (tequila y tequila 100%) y las exportaciones superaron los 246,700,000 L de tequila (tequila y tequila 100%) (Consejo Regulador del Tequila, 2020).

Debido a que la única variedad que está permitida para la producción de tequila es el género *A. tequilana* Weber var. Azul, su cultivo es de gran importancia económica, cultivándose principalmente en las regiones altas de Jalisco. La región en donde se produce el tequila se encuentra bajo el estado de protección geográfica, comprendido en la Declaración General de Protección a la Denominación de Origen “Tequila” (DOT), una categoría que identifica a un producto como originario de un territorio, región o localidad particular en donde las características de calidad son atribuibles al origen geográfico. Solamente en esta región se puede utilizar al *A. tequilana* Weber var. Azul para producir tequila (Castro y Guerrero, 2013).

Esta variedad de agave cuenta con hojas color azul-verdoso, delgadas y casi planas; miden aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho y tienen una espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm (Fig. 3) (Bautista *et al.*, 2001).



Fig. 3. *A. tequilana* Weber var. Azul.

El peso húmedo promedio de las cabezas es de 49 kg correspondiendo a un 54% del peso total de la planta y el resto por las hojas (46% del peso). Los análisis fisicoquímicos del *A. Tequilana* Weber var. Azul muestran que su composición general es: humedad 60 %, carbohidratos 25 %, fibra y médula 10 %, sales minerales 2.5 % y 2.5 % de otros componentes, por ejemplo, proteínas. La inulina ocupa el 85 – 90 % de los carbohidratos (Huerta *et al.*, 2014). Las tablas 2 y 3 resumen la composición de la planta de agave tequilero.

Tabla 1. Integración de los azúcares reductores totales contenidos en las diferentes fracciones de la planta de *A. tequilana* Weber var. azul.

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

ARD: Azúcares reductores directos, FOS: Fructooligosacáridos, ART: Azúcares reductores totales.
Fuente: Montañez, *et al.*, 2011.

Tabla 2. Contenido de fructosa y glucosa, grado de polimerización (GPP) y peso molecular promedio (PMP) de los fructanos contenidos en las diferentes fracciones del *A. tequilana* Weber var. azul.

Carbohidrato	Fracción	Fructosa (%)	Glucosa (%)	GPP	PMP (g/mol)
ARD	Punta de la hoja	14.83	2.98	1	180
	Base de la hoja	15.09	3.09		
	Cabeza	9.94	2.06		
FOS	Punta de la hoja	5.26	0.99	6.33	1026
	Base de la hoja	11.58	2.08	6.60	1070
	Cabeza	21.03	3.93	6.35	1029
Inulina	Punta de la hoja	2.12	0.13	17.26	2796
	Base de la hoja	23.18	1.34	18.34	2971
	Cabeza	41.56	1.68	25.75	4171

Fuente: Montañez, *et al.*, 2011.

2.2. Los Fructanos

Los fructanos son polímeros solubles compuestos por largas cadenas de glúcidos, cuyas unidades monoméricas son la fructosa y que pueden contener o no una molécula de glucosa por molécula de fructano. Cada monómero está unido mediante enlaces glucosídicos β -(2,1) y/o β -(2,6) (Olvera *et al.*, 2007).

La inulina y la levana son los dos fructanos más abundantes en la naturaleza. El número y naturaleza de los enlaces presentes en cada fructano establece importantes diferencias en sus propiedades. Cuando se tiene entre 3 y 10 moléculas de fructosa en la cadena hablamos de fructooligosacáridos (FOS), mientras que un fructano es un polisacárido con más de 10 moléculas de fructosa. De acuerdo con el tipo de enlace, la disposición de las unidades de fructosa y la localización del residuo de glucosa dentro de la cadena (Fig. 4), se puede clasificar a los fructanos en seis tipos diferentes:

- a) Inulina: El residuo de glucosa se encuentra en posición terminal y las unidades de fructosa se unen mediante enlaces β -(2,1).
- b) Levana: El residuo de glucosa se encuentra en posición terminal y las unidades de fructosa se unen mediante enlaces β -(2,6).
- c) Neoinulina: El residuo de glucosa se encuentra en posición central y las unidades de fructosa se unen mediante enlaces β -(2,1).
- d) Neolevana: El residuo de glucosa se encuentra en posición central y las unidades de fructosa se unen mediante enlaces β -(2,6).
- e) Graminanos: El residuo de glucosa se encuentra en posición terminal y contienen ambos tipos de enlace β -(2,1) y β -(2,6), generando moléculas ramificadas.
- f) Agavina: El residuo de glucosa se encuentra en posición central y contiene ambos tipos de enlace β -(2,1) y β -(2,6) generando moléculas ramificadas (Mancilla y López, 2006).

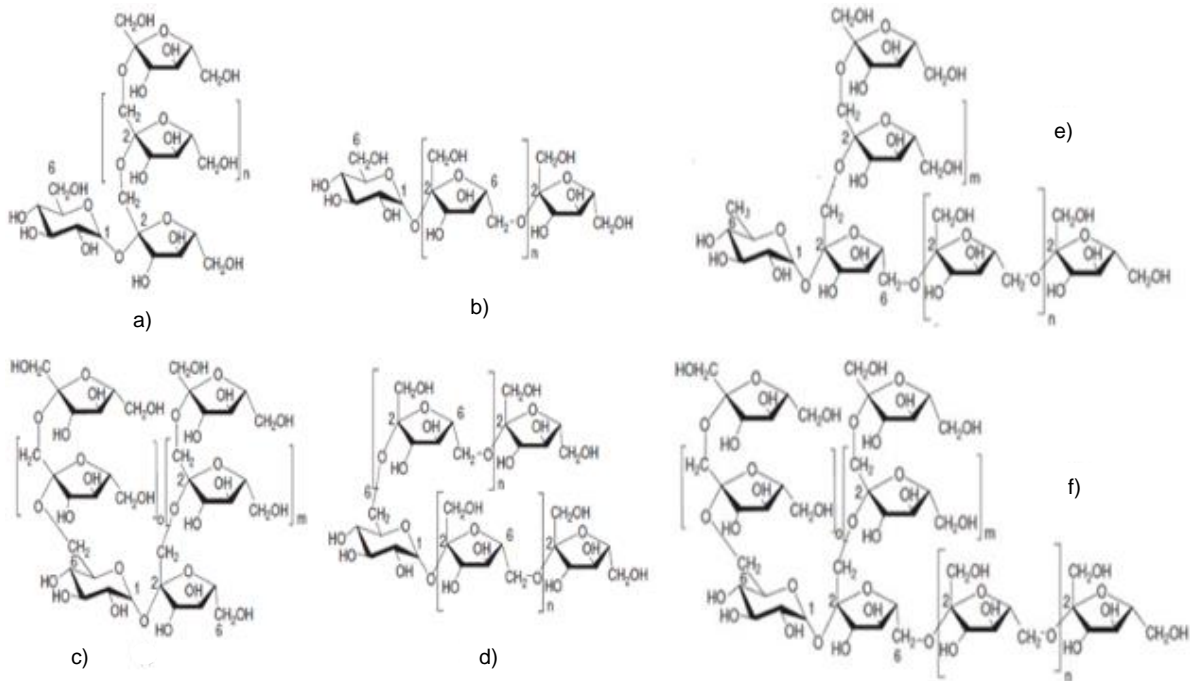


Fig 4. Estructura química de los fructanos. a) inulina, b) levana, c) neoinulina, d) neolevana, e) graminano, f) agavina.

Los fructanos son sintetizados por aproximadamente el 15% de las plantas con capacidad para florecer, así como por bacterias y hongos. Se almacenan generalmente en órganos especializados y en el agave, son sintetizados y almacenados principalmente en la piña. De acuerdo al análisis realizado a la piña del agave por MALDI-TOF-MS (espectrometría de masas de tiempo de vuelo acoplado a ionización por láser asistida por matriz), la composición de carbohidratos presentes en el agave es una mezcla de fructanos con un peso molecular de entre 527 – 4739 Da, que corresponden a inulina, levana, neoinulina y agavinas (fructano encontrado exclusivamente en el agave). La composición de fructanos varía de acuerdo a la edad y a la especie de agave (Huazano y López, 2018).

2.3. Potencial biotecnológico del *A. tequilana* Weber var. Azul.

En el 2019, la industria tequilera utilizó 1,342,600 ton de *A. tequilana* Weber var. Azul para la producción de tequila y tequila 100% (elaborado exclusivamente con fructanos provenientes de la piña del agave), actividad que también genera una gran cantidad de hojas de esta planta como desechos (Consejo Regulador del Tequila, 2020). Una vez utilizada la piña para la producción de tequila, el bagazo resultante es desechado junto con las hojas generadas en la jima del agave, lo cual corresponde a un 46 % de la planta que no es utilizada. Los subproductos generalmente son quemados o vertidos en basureros, generando contaminación (Figura 5).



Fig 5. Desechos agroindustriales producidos por la industria tequilera.

Del 46 % de la planta que no es utilizada, el 9.4 % corresponde a azúcares reductores totales extraíbles en base húmeda (Iñiguez, *et al.*, 2001). Considerando que en el 2019 se utilizaron 1,342,600 ton de *A. tequilana* Weber var. azul, en ese mismo año se generaron aproximadamente 617, 596 ton de hojas de agave. Estas últimas contienen alrededor de 25 % de inulina, lo cual significa que en el 2019 se podrían haber generado aproximadamente 160, 000 ton de inulina que no fue aprovechada para la producción de subproductos de valor agregado (Montañez, *et al.*, 2011).

Como se puede observar en la tabla 4, el contenido de inulina en la cabeza de la planta es similar al que contiene la achicoria, principal fuente de fructanos para la obtención de subproductos derivados de estos.

Tabla 3. Alimentos fuente de inulina

Fuente de inulina	Parte de la planta	Contenido de inulina (g/ 100g)
Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	Raíz	35
Ajo (<i>Allium sativium</i>)	Bulbo	14 - 23
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Grano	18 - 20
Achicoria (<i>Chicorium intybus</i>)	Raíz	11 - 20
Petaca (<i>Helianthus tuberosus</i>)	Tubérculo	12 - 19
Espárrago (<i>Asparagus sp.</i>)	Raíz	15
Agave (<i>Agave sp.</i>)	Tallo	12 - 15
Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>)	Raíz	12 - 15
Dalia (<i>Dahlia piñata cav.</i>)	Tubérculo	10 - 12
Ginseng brasileiro (<i>Pftalia glomerate</i>)	Raíz	11
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	Bulbo	5 - 9

Fuente: Quitral, *et al.* 2018.

Debido a la composición del *A. tequilana* Weber var. azul se podría utilizar para la producción de algunos productos, logrando un aprovechamiento integral de la planta. Algunos de ellos son: fructanos puros, jarabes de alta fructosa, fructosa cristalina, FOS (utilizados como prebióticos), fibra dietética soluble, edulcorantes de bajo aporte calórico, fermentación para la obtención de ácido cítrico, sorbitol, ácido glucónico, ácido láctico y bioetanol (Montañez *et al.*, 2011).

Los diferentes tipos de fructanos comparten propiedades que los hacen útiles para diversas aplicaciones en la industria de los cosméticos, alimentos y farmacéutica. Tienen una utilidad muy variada que incluyen su uso como expansor de volumen sanguíneo, endulzantes, emulsificantes, estabilizador de formulaciones, espesantes, agentes de encapsulación e incluso como parte de la formulación de medicamentos con distintas acciones terapéuticas. Además, han demostrado ejercer un efecto favorable sobre la proliferación celular, hidratante y alivio de la piel irritada en productos cosméticos y farmacéuticos (Abdel *et al.*, 2012 y Esawy *et al.*, 2011).

De hecho, la presencia de ciertas cantidades de fructanos o FOS en la formulación de un producto alimenticio es una condición suficiente para que dicho producto sea considerado como “alimento funcional”, mismos que son adicionados principalmente en bebidas y productos lácteos como prebióticos (Huerta *et al.*, 2014).

Por otro lado, a partir de muestras de bagazo de agave azul se han aislado una gran cantidad de microorganismos productores de enzimas de interés industrial, algunas de ellas son: pectinasas, inulinasas, xilanasas y celulasas utilizadas para la bioconversión de carbohidratos complejos a azúcares fermentables (Huitron *et al.*, 2008).

Se han identificado una gran variedad de microorganismos capaces de utilizar a la agavina como única fuente de carbono a través de la producción de enzimas hidrolíticas como lo son las exo- y endo inulinasas, exo- y endolevanasas,

inulosacararas y levansacararas. Algunos de los microorganismos identificados son: *Kluyveromyces* spp, *Saccharomyces* spp, *Issatchenkia* spp, *Bacillus* spp, *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp. (García, 2013).

2.4. Glicosil-hidrolasas. Clan GH-J: Familias GH32 y GH68

Las glicosilhidrolasas (GH) (glicosidasas, O-glicosil hidrolasas, EC 3.2.1.x) son las enzimas responsables de la hidrólisis de carbohidratos mediante la ruptura de los enlaces glicosídicos entre dos monosacáridos o entre un carbohidrato y un residuo de aglicona. A la fecha, las GH se dividen en 112 familias y en función de su estructura terciaria se dividen en 14 clanes. La familia GH32 comprende invertasas ácidas (de tipo vacuolar y de pared celular en plantas), exo-inulinasas bacterianas y micóticas, levanasas, fructan-exo-hidrolasas de plantas, enzimas fructan biosintéticas de plantas y algunas otras β -fructofuranosidasas bacterianas. Por otro lado, la GH68 incluye levansacararas bacterianas, inulosacararas y algunas β -fructofuranosidasas, todas ellas agrupadas dentro del clan GH-J debido a la similitud de sus estructuras terciarias.

Las enzimas de la familia 32 son hidrolasas capaces de romper los enlaces β -(2,1) o β -(2,6) de los fructanos liberando fructosa y, dependiendo del sitio de corte en el fructano, también glucosa. Algunos ejemplos de estas son las exoinulinasas (EC 3.2.1.80), las exolevanasas (EC 3.2.1.154) y las β -(2,6)-fructan 6-levanbiohidrolasas (EC 3.2.1.64). Las exo-hidrolasas liberan una fructosa terminal a la vez, de una cadena de fructano donadora utilizando al agua como un aceptor de fructosa. Las fructosil hidrolasas también incluyen a las endoinulinasas (EC 3.2.1.7), las cuales hidrolizan específicamente los enlaces internos β -(2,1) de la inulina y las endolevanasas (EC 3.2.1.65) que hidrolizan específicamente los enlaces internos β -(2,6) de la levana.

Por otro lado, las enzimas de la familia 68 son fructosiltransferasas capaces de sintetizar fructanos utilizando sacarosa, FOS u otros fructanos como donadores de fructosa. Las fructosiltransferasas más comunes son la levansacarasa (EC 2.4.1.10)

y la inulosacarasa (EC 2.4.1.9) capaces de sintetizar levana e inulina, respectivamente.

Las enzimas del clan GH-J poseen un dominio catalítico β -propela común. La propela cuenta con cinco láminas β repetidas, cada una consiste de cuatro hebras β antiparalelas con una topología clásica en “W” alrededor del eje central, encerrando la cavidad cargada negativamente del sitio activo. En contraste con los miembros de la familia GH68, la familia GH-32 contiene además un dominio extra en el extremo C-terminal. Este dominio C-terminal consiste en dos laminas β compuestas por 6 hebras β antiparalelas, con plegamiento tipo sándwich (Lammens *et al.*, 2009). Aunque la función exacta de este módulo aún no es clara, estudios previos han demostrado que es esencial para la estabilidad de la proteína en general. Entre los dos dominios mencionados, se observa una hendidura. Se ha propuesto que dicha hendidura juega un rol en el reconocimiento de sustratos con un grado de polimerización elevado.

Los alineamientos múltiples de las secuencias de miembros del clan GH-J revelaron tres residuos conservados en el dominio β -propela N-terminal. Específicamente los motivos WMNDPNGL, RDP y EC, que contienen un residuo ácido en una posición equivalente en todas las enzimas (aminoácidos resaltados). Se ha demostrado que estos residuos, dos aspartatos y un glutamato, también referidos como la “triada catalítica”, son indispensables para la unión y la catálisis. El Asp (del motivo WMNDPNG) es el nucleófilo y el Glu (del motivo EC) es el catalizador ácido/base. El otro aspartato (del motivo RDP) parece no estar involucrado directamente en el mecanismo de catálisis y probablemente actúa como estabilizador del estado de transición. Este residuo establece puentes de hidrógeno con los hidroxilos en los carbonos C3 y C4 de la fructosa, jugando un papel clave en la unión y estabilización del sustrato. La figura 6 muestra la estructura terciaria de las GH32 y GH68.

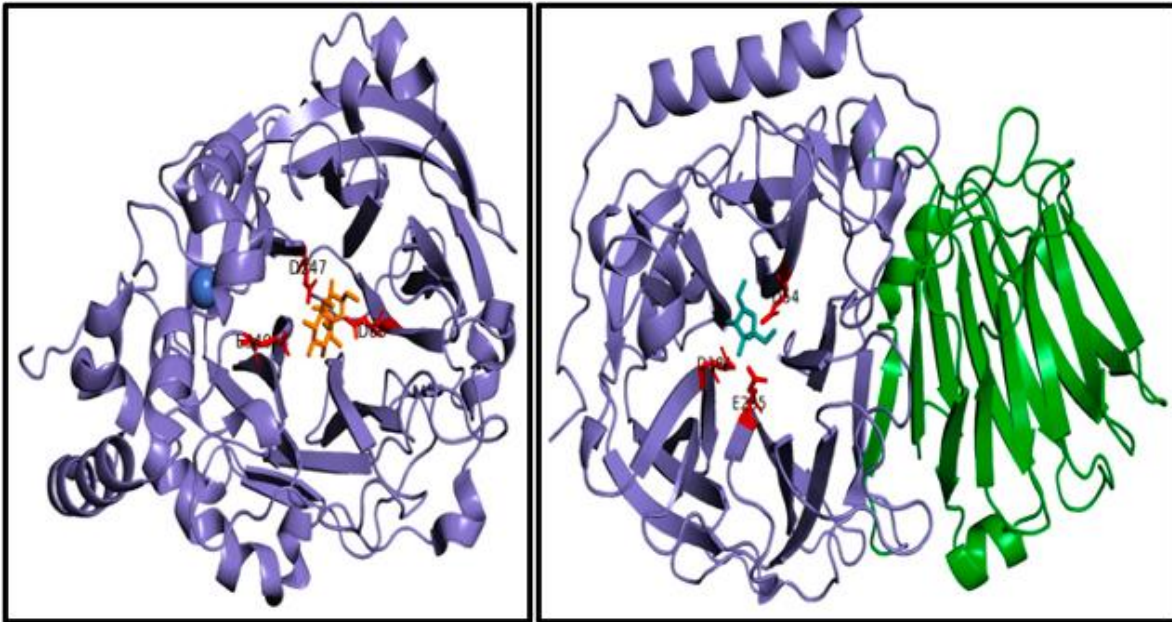


Fig 6. Levansacarasa (GH68) de *Bacillus subtilis* (PDB: 1PT2) y fructosilhidrolasa de la familia GH32 de *Bifidobacterium adolescentis* (PDB: 6NUN), respectivamente. En rojo se encuentran señalados los aminoácidos de la triada catalítica (DVWDSWP, RDP, IERAN ó WMNDPNG, RDP, EC, respectivamente), en morado se encuentra destacado el dominio β -propela y en verde se encuentra destacado el dominio β -sándwich.

Los miembros de las familias GH32 y GH68 operan por mecanismo de doble desplazamiento, utilizando un intermediario enzima-sustrato, realizando la hidrólisis entre los subsitios +1 y -1 del carbohidrato. En el primer paso, un ataque nucleofílico es realizado en el carbono anomérico del azúcar por el carboxilato del nucleófilo, formando un intermediario covalente fructosa-enzima. El catalizador ácido/base actúa como un ácido donando un protón al grupo glicosilo saliente. En el segundo paso, el catalizador ácido/ base actúa como base, removiendo un protón del fructosilo aceptor entrante (agua o un carbohidrato aceptor apropiado en el caso de las invertasas/ exo-hidrolasas o levansacarasa/ inulosacarasa, respectivamente), que hidroliza al intermediario fructosa-enzima. La figura 7 muestra el mecanismo de reacción realizado por estas enzimas (Lammens *et al.*, 2009).

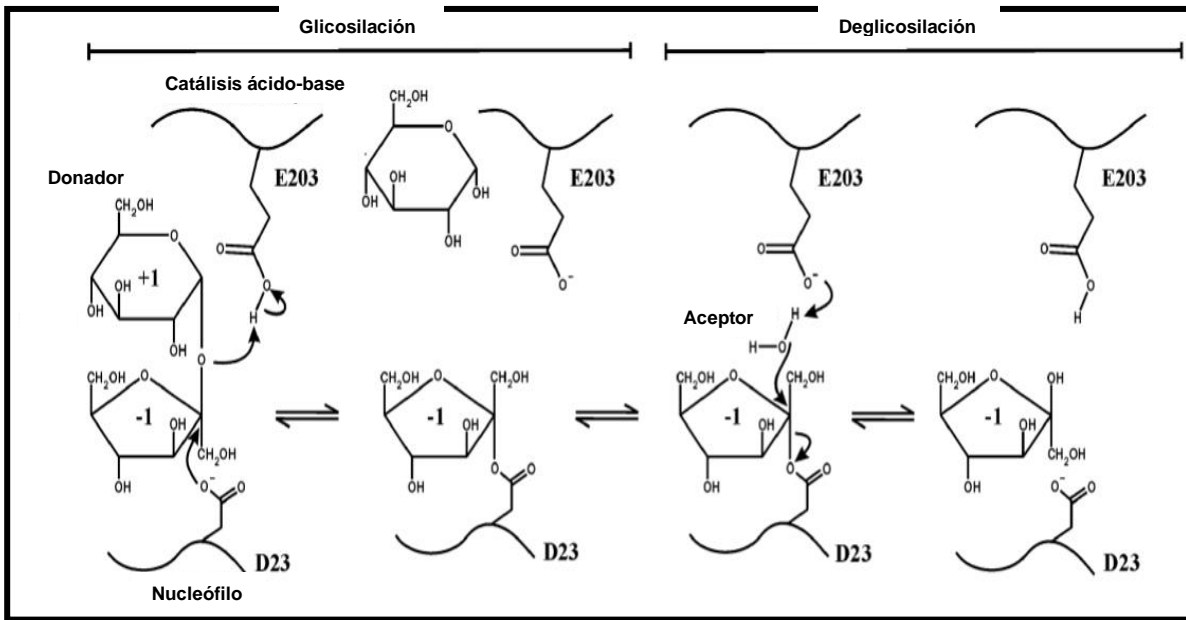


Fig 7. Mecanismo de reacción de las glicosilhidrolasas de la familia GH32 y GH68. Cuando el aceptor es agua, la reacción llevada a cabo corresponde a la hidrólisis. Por otro lado, cuando el aceptor es sacarosa o un FOS, la reacción llevada a cabo es la correspondiente a la transfructosilación. Tomado de Singh *et al.*, 2017. Fig. 2 in Lammens *et al.*, 2008

2.4.1. Inulinasas

Las inulinasas (EC. 3.2.1.7) son enzimas que hidrolizan los enlaces β -(2,1) de la inulina para producir FOS, sacarosa o fructosa. Son producidas por diversos microorganismos, los más estudiados son las levaduras del género *Kluyveromyces*, y el hongo filamentoso *Aspergillus spp.* ya que se pueden encontrar en ambientes diversos, son termoestables, tienen una alta tasa de crecimiento, producen enzima con alto rendimiento (con más de 3000 U/mL), pueden crecer hasta 52 °C (en el caso de *Kluyveromyces*), no son peligrosas para el humano y sus inulinasas son inducibles y extracelulares (Huerta *et al.*, 2014). Sin embargo, también hay algunas bacterias productoras de inulinasas, como lo son los géneros *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Streptomyces sp.* los cuales también presentan altos rendimientos de producción (Tabla 4) (Vargas, 2015). El 63 % de las inulinasas provienen de hongos y el 37% provienen de bacterias (Singh *et al.*, 2017).

Tabla 4. Bacterias productoras de inulinasas y sus características.

Bacteria	Fuente	Enzima	Sustrato	Producto	Peso molecular (kDa)	Estructura cuaternaria	pI	pH óptimo	T° óptima (°C)	Actividad enzimática	Unidades de Actividad enzimática	Referencias
<i>Achromobacter sp.</i>	Caña de azúcar	Exo-inulinasa	Inulina, sacarosa	Sacarosa, glucosa, fructosa	45.0	NE	ND	5.0	35.0	0.3	UI/ mL	Angel, et al., 2012.
<i>Arthrobacter sp.</i>	Raíces de achicoria	Exo-inulinasa/ Endo-inulinasa [^]	Tubérculos de dalia, Inulina, rafinosa, sacarosa	FOS, fructosa, glucosa	75.0	NE	ND	6.0	50.0	NE	ND	Elyachoui et al., 1992. Kang et al., 1998.
<i>A. globiformis</i>	NE	Exo-inulinasa	Inulina	Fructosa, glucosa	100.0	NE	4.8	6.5	40.0	755.0	UI/ mg	Haraguchi et al. 1987.
<i>Bacillus sp.</i>	Fuente termal	NE/ Exo-inulinasa	Extracto de tubérculos de achicoria, Inulina, sacarosa	NE	NE	NE	ND	7*	60*	8.9*	UI/ mL	Uzunova et al., 2002. Gavrilov et al. 2016.
<i>B. subtilis</i>	Caña de azúcar/ Vernonia herbacea, diente de león, dalia	Exo-inulinasa/ NR	Extracto de tubérculos de Dalia, inulina, sacarosa	Sacarosa, glucosa, fructosa	45.0	NE	ND	5.0	35.0	0.025, 42.36/ 47, 47 000	UI/ mL / U/L, UI/ mg,	Angel, et al., 2012. Vullo et al., 1991. Zherebtsov et al., 2002.
<i>B. licheniformis</i>	NE	ND [^]	ND	ND	ND	NE	ND	ND	ND	ND	NE	Azhar et al., 2015.
<i>B. polymyxa</i>	Raíces de achicoria	Exo-inulinasa/ NR	Almidón/ inulina, levana rafinosa, sacarosa	Fructosa, Glucosa	58.0	NE	NE	7.0	35.0	37.50/ 134 000	UI/ mL - UI/ mg	Zherebtsov et al., 2002. Kwon et al., 2003.
<i>B. safensis</i>	Raíces de espárrago	Endo-inulinasa	Extracto de tubérculos de Dalia, Inulina, sacarosa	FOS, sacarosa, fructosa, glucosa	NE	NE	NE	7*	37*	12.56, 28.67	UI/ mL	Singh et al., 2013.
<i>B. smithii</i>	Suelo	Endo-inulinasa	Inulina, sacarosa, rafinosa	FOS, sacarosa, fructosa, glucosa	47.5	NE	NE	4.5	70.0	135.2/ 1105.40	UI/ mg	Gao et al. 2009.
<i>B. stearothermophilus</i>	Suelo / remolacha	Exo-inulinasa	Inulina, sacarosa, rafinosa	Sacarosa, fructosa, melobiosa, glucosa	54/ 64-84	NE	5.0	6.1/ 6.5	60/ 65	92 / 1.25, 4000	UI/ mg	Kato et al., 1999. Belamri et al. 1994.
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Heces humanas	NE	Inulina, sacarosa, 1-kestosa	NE	74.0	Monomérica	4.5	6.1	37.0	101.0	UI/ mg	Maramatsu et al., 1993.
<i>B. animalis</i>	NE	NE	FOS, sacarosa	NE	ND	ND	ND	6.2*	37*	<1*	U/ mL	Jedrzejczak-Krzepkowska et al., 2011.
<i>B. breve</i>	Heces de lactante	Exo-inulinasa	Inulina, rafitilina, Raftilosa, fructofuranos ilnistosa, sacarosa, 1-kestosa, nistosa	Glucosa, fructosa	60.0	ND	ND	6.0	37.0	ND	ND	Ryan et al., 2005.
<i>B. infantis</i>	Heces de infante	Exo-inulinasa	FOS, sacarosa	NE	72.0	NE	4.3	6.0	37.0	580.0	UI/ mg	Warchol et al., 2002.
<i>B. lactis</i>	NE	Exo-inulinasa	Levana, FOS, sacarosa	Sacarosa, glucosa, fructosa	60.0	NE	4.7	6*	37*	NE	NE	Janer et al., 2004.
<i>B. longum</i>	NE	Exo-inulinasa	Levana, inulina, FOS, 1-kestosa, nistosa, rafinosa, maltosa, lactosa, sacarosa, fructosa, glucosa	Fructosa, glucosa	67.0	Monomérica (In-silico)	4.6	6.0	50, 37-45	106.1	UI/ mg	Jedrzejczak-Krzepkowska et al., 2011.
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Remolacha/ cáscaras de achicoria	Exo-inulinasa	Extracto de tubérculos de Dalia, inulina, sacarosa, rafinosa	Fructosa, glucosa, FOS en tiempos cortos de rx.	NE	ND	ND	4.6*/ 5.6	30*/ 47	0.2 - 1.8 / 436	UI/ mg / U/L	Efstathiou et al., 1986. Looten et al., 1987.
<i>C. thermoautotrophicum</i>	Tubérculos de Dali	NE	Inulina	NE	ND	ND	ND	7.0	60.0	aprox. 140	U/ ginu*L	Drent et al., 1991.
<i>Flavobacterium multivorum</i>	Variedad de suelos	Exo-inulinasa	Inulina, sacarosa	NE	ND	ND	ND	5.0	30*	979.0	U/ g células	Allais et al., 1986.
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NE	Exo-inulinasa [^]	NE	NE	54.0	NE	ND	6.0	6.0	133.0	UI/ mg	Tsujimoto et al., 2003.
<i>Lactobacillus casei</i>	Caña de azúcar	Exo-inulinasa [^]	Inulina	Sacarosa, glucosa, fructosa	45/ 139	ND	4.7	5.0	35.0	0.22-0.33	UI/ mL	Angel, et al., 2012. Kuzuwa et al., 2012.

<i>L. paracasei</i>	Extracto de fleco (planta)	Exo-inulinasa	Levana, inulina, sacarosa	Fructosa, Glucosa	42.0	ND	4.6	4.1 - 4.8	ND	177.1	UI/ mg	Müller et al., 1995.
<i>L. pentosus</i>	Pescado fermentado	NE	Inulina, levana, 1-kestosa, sacarosa, melecitosa, rafinosa, estaquiosa,	ND	126.0	Monomérica	ND	5.5	25.0	260.9	UI/ mL, UI/ mg	Paludan-Müller et al., 2002.
<i>Marinimicrobium sp.</i>	Sedimento marino	Exo-inulinasa	Inulina	Fructosa, glucosa	ND	ND	ND	9.0	55.0	14.6	UI/ mL	Li et al., 2012.
<i>Nocardiopsis sp.</i>	Sedimento marino	Exo-inulinasa	Inulina	Fructosa, glucosa	Nd	ND	ND	8.0	60.0	25.1	UI/ mL	Lu et al., 2014.
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Raíces de achicoria	Exo-inulinasa^	Inulina, sacarosa	Fructosa, glucosa	56.0	Monomérica	ND	6.0	25.0	18.5	UI/ mg	Gao et al., 2014.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caña de azúcar	Exo-inulinasa	Inulina	Sacarosa, glucosa, fructosa	45.0	NE	NE	5.0	35.0	0.22-0.33	UI/mL	Angel, et al. 2012.
<i>P. mucidolens</i>	Suelo	Exo-inulinasa^	Inulina, sacarosa, levana, rafinosa	Fructosa, glucosa	55.0	Monomérica	ND	6.0	55.0	9 400	UI/ mg	Kwon et al., 2000.
<i>Sphingobacterium sp.</i>	Heces de grulla	Exo-inulinasa^	Inulina, levana, rafinosa, estaquiosa, sacarosa, almidón	Fructosa, glucosa	56.0	ND	ND	7.0	40.0	290.9	UI/ mg	Zhou et al., 2014.
<i>Sphingomonas sp.</i>	Rocas de fosfato	Exo-inulinasa	Inulina, levana, FOS, sacarosa, rafinosa, estaquiosa, almidón	Fructosa, glucosa	55.0	ND	ND	5.5	55.0	73.7	UI/ mg	Zhou et al., 2014.
<i>Staphylococcus sp.</i>	NE	NE	Inulina, salvado de trigo	NE	ND	ND	ND	6.5	37.0	618.0	U/ L	Selvakumar, et al., 1999.
<i>Streptomyces sp.</i>	Raíces de achicoria	Exo-inulinasa/ Endo-inulinasa/ NE	Pressmud, Extracto de tubérculos de achicoria, Ajo, inulina, sacarosa	FOS/ Fructosa, glucosa	70.8	ND	ND	6.0	55.0	89, 0.524*/ 290.20 / 321	UI/ mg / UI/ L	Laowklom et al., 2012. Reddy et al., 2016. Sharma et al., 2006. Dilipkumar et al. 2011.
<i>S. grisenus</i>	Suelo	Exo-inulinasa	Inulina	NE	140.0	NE	ND	7.0	40.0	6.9	UI/ mg	Tohamy et al., 2006.
<i>S. rochei</i>	Suelo	Endo-inulinasa	Inulina	FOS	ND	ND	ND	6.2*	40*	1.0	UI/ mL	Yokota et al., 1995.
<i>Thermotoga maritima</i>	Barro marino	Exo-inulinasa^	Inulina, levana, sacarosa	Fructosa, glucosa, rafinosa, sacarosa.	50.0	Monomérica	5.1	5.5	90-95	NE	NE	Liebl et al., 1998.
<i>Xanthomonas campestris pv phaseoli</i>	NE	Endo-inulinasa/ NE	Cáscara de cebolla, cáscara de ajo, inulina, sacarosa	FOS	ND	ND	ND	7*	37*	4.3	UI/ mL	Naidoo et al., Ayyachamy et al., 2009.
<i>X. oryzae</i>	NE	Endo-inulinasa	Inulina	FOS	139.0	ND	ND	7.5	50.0	1 372	UI/ mg	Cho et al., 2002.

*Actividad enzimática determinada solo a esas condiciones de pH y temperatura; ^ enzimas producidas por sistemas de expresión heteróloga. NE: No Especificado. ND No determinado. Fuente: Singh, *et al.*, 2017.

2.4.2. Levanasas

Las levanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β -(2,6) de la levana para producir FOS, sacarosa o fructosa. Existen cuatro tipos de levanasa: endolevanasas (EC 3.2.1.65), exolevanasas (EC 3.2.1.154), β -(2,6)-fructan 6-levanbiohidrolasas (LF2asa, EC 3.2.1.64) y levan fructotransferasa (LFTasa, EC 4.2.2.16), cada una producida por diferentes microorganismos, generando diferentes compuestos (Tabla 5). Las endolevanasas hidrolizan levana en FOS con diferentes grados de polimerización variando de 2 a 10 unidades de fructosa, mientras que las

exolevanasas hidrolizan levana en sus extremos, generando fructosa. La LF2asa produce levanobiosa como principal producto de hidrólisis y la LFTasa predominantemente convierte la levana en anhídrido de difructosa IV (DFA IV) (Zhang et al, 2019). Murakami y colaboradores clasificaron la levanasas secretadas por los microorganismos en:

1. Levanasas tipo I: Aquellas que producen solamente fructosa.
2. Levanasas tipo II: Aquellas que producen principalmente levanbiosa.
3. Levanasas tipo III: Aquellas que producen principalmente levanbiosa y levantriosa.
4. Levanasas tipo IV: Aquellas que producen DFA IV.
5. Levanasas tipo V: Aquellas que producen FOS con un grado de polimerización de entre 5-9 monómeros de fructosa.
6. Levanasas tipo VI: Aquellas que producen diversos tipos de FOS (Zhang et al, 2019).

Tabla 5. Microorganismos productores de levanasas

Bacteria	Fuente	Enzima	Sustrato	Producto	Peso molecular (kDa)	Estructura cuaternaria	pl	pH óptimo	T° óptima (°C)	Actividad enzimática	Unidades de Actividad enzimática	Referencias
<i>Streptococcus salivarius</i> KTA-19	Placa dental humana	Exolevanasa	Levana, inulina, rafinosa, sacarosa, melecitosa.	Fructosa	100	ND	5	6.5	40-50	810	UI/ mg	Tanaka et al., 1983.
<i>Bacillus</i> sp. 71	Suelo	Endolevanasa	Levana, fleina	Levanheptosa	135	ND	4.7	6	40	21.7	UI/ mg	Murakami et al., 1992.
<i>Bacillus</i> sp. L7	Suelo	Endolevanasa ^	Levana, fleina	Fructosa, FOS	86	ND	ND	5.5	50	128	UI/ mg	Miasnikov et al., 1997.
<i>Pseudomonas</i> K-52	Suelo	NR	Levana	Levanoctaosa	38	ND	4.8	7	35	39.2	UI/ mg	Kang et al., 1998.
<i>Bacillus subtilis</i> 168	NE	Endolevanasa ^	Levana	FOS	62	ND	ND	6-6.5	40	3	UI/ mg	Jensen et al., 2016.
<i>Streptomyces</i> sp. 366L	Suelo	Exolevanasa	Levana	Levanheptosa	78	Monomérica	4.1	7	40	4309	UI/ mg	Lim et al., 1998.
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 19246	Paciente humano con actinomicosis	NR	Levana	FOS	89	ND	ND	6	45	851	UI/ mg	Igarashi et al., 1987.
<i>Treponema zioleckii</i>	Rumen de oveja	Endolevanasa	Extracto de pasto, levana, inulina, sacarosa	FOS,Fructosa	60	ND	ND	6	40	15.75	UI/ mg	Kasperowicz et al., 2010.
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	NE	Exolevanasa^	Levana, inulina, 1-kestosa, rafinosa, sacarosa	Fructosa	57	ND	ND	6	30	58	UI/ mg	Menéndez et al., 2004.

<i>Bacillus licheniformis</i>	NE	Endolevanasa ^	Levana, inulina, sacarosa, 1-kestosa, 6-kestosa	FOS	56	ND	ND	6	35	1.8	UI/ mg	Porras-Dominguez et al., 2014.
<i>Streptomyces sp. 7-3</i>	Suelo	Exolevanasa	Levana, levanbiosa, inulina, sacarosa	Levanbiosa, levantriosa, fructosa	54	ND	4.7	6.5	40	626	UI/ mg	Murakami et al., 1990.
<i>Pseudomonas sp. 43</i>	Suelo	Exolevanasa	Levana	Levanbiosa	36	ND	5.7	7	40	30.5	UI/ mg	Kang et al., 1999.

^ enzimas producidas por sistemas de expresión heteróloga. NE: No Especificado. ND No determinado. Fuente: Zhang *et al.*, 2019.

2.4.3. Levansacarosas

Finalmente, las levansacarosas e inulosacarosas son fructosiltransferasas pertenecientes a la familia 68 de las glicosilhidrolasas que forman cadenas de fructanos. Además de la sacarosa, la rafinosa y la estaquiosa han sido utilizados exitosamente como donadores de fructosa como análogos de la sacarosa en la reacción de transfructosilación llevada a cabo por la levansacarasa (Tian y Karboune, 2012).

Se han aislado microorganismos de diversas fuentes, capaces de producir fructosiltransferasas. Entre ellos destacan las bacterias Gram positivas, por ejemplo: *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens* o *Lactobacillus reuteri*, las bacterias Gram negativas, como *Zymomonas mobilis*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*, *P. syringae* pv *phaseolicola* y *Acetobacter diazotrophicus* y géneros de mohos, tales como *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Calviceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Scopulariopsis* o *Saccharomyces* (Olvera *et al.*, 2007). La tabla 6 enlista algunas bacterias productoras de fructosiltransferasas y sus características.

Tabla 6. Bacterias productoras de fructosil-transferasas.

Bacteria	Fuente	Enzima	Donador	Receptor	Producto	Peso molecular (kDa)	Estructura cuaternaria	pl	pH óptimo	T° óptima (°C)	Actividad enzimática	Unidades de Actividad enzimática	Referencias
<i>Acetobacter diazotrophicus SRT4</i>	Caña de azúcar	Levansacarasa	Sacarosa	Glucosa, fructosa, fructano	Levana, kestosa	58	ND	5.5	5.0	37*	NE	NE	Hernández et al., 1995.
<i>Actinomyces viscosus</i>	Cavidad oral humana	Levansacarasa	Sacarosa	Sacarosa, rafinosa	Levana	220	Trimérica	4.2	7.5	37	90.0	μmol/min/mg	Pabst et al., 1977.
<i>Bacillus subtilis</i>	NE	Levansacarasa^	Sacarosa	Sacarosa	Levana	53	ND	ND	5.5	30	195.6	UI/ mg	Euzenat et al., 1998.
<i>B. megaterium</i>	NE	Levansacarasa^	Sacarosa	Sacarosa	Levana, 1-kestosa, 6-kestosa, nistosa, blastosa, neokestosa	52	ND	ND	6.6	45	NE	NE	Hommann et al., 2007.

<i>Erwinia amylovora</i>	NE	Levansacarasa [^]	Sacarosa	NE	Levana	46	ND	4.0	ND	ND	34.0	U/ mL	Geier et al., 1993.
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Caña de azúcar	Levansacarasa	Sacarosa	Sacarosa	FOS, 1-kestosa, nistosa	60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Hernández et al., 2000.
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	NE	Levansacarasa [^]	Sacarosa	Sacarosa	Levana, 1-kestosa, sacarosa, fructosa, glucosa	73	ND	ND	5.4	40	ND	ND	Tieking et al., 2005.
<i>L. reuteri</i>	NE	Levansacarasa [^]	Sacarosa, rafinosa	Sacarosa	Levana	84	ND	ND	4.5	50	177.0	UI/ mg	Van Hijum et al., 2004.
<i>L. reuteri</i>	NE	Inulosacarasa [^]	Sacarosa	Sacarosa	Inulina, 1-kestosa, 1-nistosa	85	ND	4.5	5.0	50	103.7	UI/ mg	Van Hijum et al., 2002.
<i>Leuconostoc citreum</i>	Pozol	Inulosacarasa [^]	Sacarosa, maltosa, lactosa	Sacarosa	Inulina	165	ND	5.0	6.5	45	NE	NE	Olivares-Illana et al., 2003.
<i>L. mesenteroides</i>	NE	Levansacarasa [^]	Sacarosa	Sacarosa	Levana, 1-kestosa, nistosa, kestopentosa	103	Dimérica	ND	6.2	30	100.0	UI/ mg	Kang et al., 2005.
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	NE	Levansacarasa [^]	Sacarosa	Sacarosa	Levana, 1-kestosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Bezzate et al.,
<i>Pseudomonas s. phaseolicola</i>	NE	Levansacarasa	Sacarosa	Sacarosa	Levana	45	ND	3.5	6.2	20	298.0	UI/ mg	Hettwer et al., 2000.
<i>Rahnella aquetilis</i>	NE	Levansacarasa	Sacarosa	Xilosa, arabinosa, lactosa, maltosa, maltotriosa, celobiosa, melibiosa	Levana	120	Dimérica	ND	6.0	60	731.0	UI/ mg	Ohtsuka et al., 1992.
<i>Streptococcus mutans</i>	NE	Inulosacarasa [^]	Sacarosa	Sacarosa	Inulina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Schroeder et al., 1989.
<i>Streptococcus salivarius</i>	NE	Levansacarasa [^]	Sacarosa	Sacarosa, rafinosa	Levana	125	ND	ND	6.0	37	58.0	UI/ mg	Song et al., 1999.
<i>Zymomonas mobilis</i>	NE	Levansacarasa	Sacarosa	Sacarosa	Levana, 1-kestosa	56	ND	2.6	5.0	50	NE	NE	Yanase et al., 1992.

[^] enzimas producidas por sistemas de expresión heteróloga. NE: No Especificado. ND No determinado. Fuente: Velázquez *et al*, 2009.

Las fructosiltransferasas bacterianas son capaces de catalizar por lo menos tres reacciones: hidrólisis de sacarosa, polimerización de fructosa derivada de la sacarosa e hidrólisis de fructanos (Abdel *et al.*, 2012). Múltiples microorganismos han demostrado su capacidad para producir una o varias fructosilhidrolasas, en la tabla 7 se enlistan algunas bacterias capaces de producir estas enzimas:

Tabla 7. Bacterias productoras de GH32 y GH68.

Enzima	Bacterias productoras
Inulosacarasa	Bacterias ácido-lácticas
Levansacarasa	<i>Acetobacter sp.</i> , <i>Actinomyces sp.</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens*</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Erwinia sp.</i> , <i>Gluconobacter sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Paenobacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rahnella sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Zymomonas sp.</i>
Inulinasa	<i>Achromobacter sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens*</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Bifidobacterium sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Geobacillus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Marinimicrobium sp.</i> , <i>Nocardiopsis sp.</i> , <i>Paenibacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Sphingobacterium sp.</i> , <i>Staphylococcus sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Thermatoga sp.</i> , <i>Xanthomonas sp.</i>

Levanasa	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Actinomyces sp.</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens*</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Gluconacetobacter sp.</i> , <i>Microbacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i>
----------	--

*Microorganismo reportado en este trabajo. El análisis bioinformático de la cepa demuestra la presencia de genes codificantes para estas enzimas, también reportado por Chen, *et al.*, 2018

Fuentes: Zhang *et al.*, 2019, Singh *et al.*, 2017, Olvera *et al.*, 2007 y Chen, *et al.*, 2018.

2.5. *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP

En nuestro grupo de trabajo se aisló una cepa de *B. amyloliquefaciens* (denominada por nosotros como *B. amyloliquefaciens* 12GeP) a partir de un muestreo de bagazo de agave realizado en Jalisco, el cual demostró poseer actividad hidrolítica frente a la inulina de agave (Pérez, 2016 y González, 2018).

B. amyloliquefaciens es una de las bacterias más empleadas para la producción potencial de enzimas y posee el reconocimiento GRAS (Generally Recognized As Safe). Se ha comprobado que al ser cultivada en medios que contienen sacarosa es capaz de producir enzimas extracelulares (Tian *et al.*, 2011).

B. amyloliquefaciens es el principal productor industrial de α -amilasa y proteasa en el mundo. Se encuentra estrechamente relacionado con *Bacillus subtilis* y las otras dos especies que componen el grupo *B. subtilis*; *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus*. Se diferencia metabólicamente y su DNA comparte menos del 25, 13 y 5 % de homología con el DNA de *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, respectivamente. Las cuatro especies pueden ser diferenciadas a través de técnicas moleculares, utilizando cromatografía de gas-líquido por pirólisis, espectrofotometría de masas por pirólisis, pruebas bioquímicas y mediante la separación electroforética de sus enzimas (Priest *et al.*, 1987).

B. amyloliquefaciens es un bacilo Gram positivo, de entre 0.7 a 0.9 por 1.8 a 3 μm , regularmente forma cadenas, presentan motilidad con flagelos peritricos y forman esporas centrales o periféricas de entre 0.6 a 0.8 por 1 a 1.4 μm (Fig 8). Su temperatura óptima de crecimiento es de entre 30 a 40 °C y no crecen por debajo de 15 °C o por encima de 50 °C (Priest *et al.*, 1987).

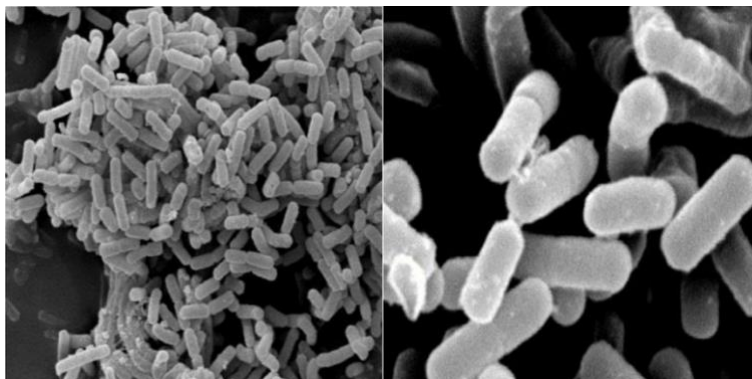


Fig 8. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de *B. amyloliquefaciens* 12GeP observada a 5 000X y 20 000X, respectivamente (tomado de Pérez, 2016)

Recientemente se ha propuesto que *B. amyloliquefaciens* comprende dos subespecies: la subespecie asociada a plantas *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, y la no asociada a plantas *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*, basándose en un análisis filogenético y su caracterización fisiológica, esta última como la habilidad para la colonización de las raíces y la producción de hormonas y antibióticos que influyen en el crecimiento de las plantas. Las diferencias genéticas entre estas dos subespecies consisten en la presencia de algunos genes en la subespecie *plantarum* que la subespecie *amyloliquefaciens* no posee, como lo son algunas glucanasas, xilanasas, isomerasas, xilosidasas, amilasas y algunos transportadores de aminoácidos y otros metabolitos (Zhang et al, 2016).

Además, se realizó un análisis genómico en el que se comparó el genoma de 24 cepas diferentes de *B. amyloliquefaciens* verificando la presencia de genes que codifican para glicosil-hidrolasas (Zhang, et al. 2016). También se demostró que *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* es una cepa con potencial para su uso en la degradación de biomasa lignocelulósica y fructanos como la inulina, levana y agavina a través de la secreción de glicosil-hidrolasas (Tabla 8).

Tabla 8. Enzimas putativas de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* relacionadas con la degradación de biomasa lignocelulósica y fructanos.

Sustrato de relación	Enzima
Celulosa	GH5 (endo-1,4- β -glucanasa EC 3.2.1.4)
	GH30 (glucan endo-1,6- β -glucosidasa EC 3.2.1.-)
	GH4 (6-fosfo- β -glucosidasa EC 3.2.1.86)
	GH4 (6-fosfo- α -glucosidasa EC 3.2.1.-)
	GH1 (6-fosfo- β -galactosidasa EC 3.2.1.85)
	GH16 (β -glucanasa EC 3.2.1.-)
	GH32 (sacarosa-6-fosfato hidrolasa EC 2.4.1.-)
	GH32 (sacarosa-6-fosfato hidrolasa EC 2.4.1.-)
	GH32 (levanasa EC3.2.1.65)
	GH13 (α -glucosidasa EC 3.2.1.20)
	PL1 (pectato liasa EC 4.2.2.-)
	PL1 (pectato lasa EC 4.2.2.-)
	PL9 (pectato liasa EC 4.2.2.2)
	Hemicelulosa
GH26 (β -manosidasa EC 3.2.1.78)	
GH43 (arabin endo-1,5- α -L-arabinosidasa EC 3.2.1.-)	
GH43 (arabin endo-1,5- α -L-arabinosidasa EC 3.2.1.-)	
GH43 (arabinxilan arabinofuranohidrolasa EC 3.2.1.-)	
GH43 (1,4- β -xilanosidasa EC 3.2.1.37) (excepto la cepa 9912D)	
GH51 (α -N-arabinofuranosidasa EC 3.2.1.55)	
GH51 (α -N-arabinofuranosidasa EC 3.2.1.55)	
GH30 (glucoronoxilanasa EC 3.2.1.-)	
CE7 (acetilxilan esterasa EC 3.1.1.72)	
CE3 (acetilxilan esterasa EC 3.1.1.72)	
GH53 (arabinogalactan endo-1,4- β -galactosidasa EC 3.2.1.89)	

Fuente: Chen et al, 2018.

3. Justificación

El estudio del genoma de *B. amyloliquefaciens* realizado por nuestro grupo de investigación concuerda con lo descrito por Zhang y colaboradores, revelando la presencia de al menos tres glicosilhidrolasas que podrían estar implicadas en la degradación de agavina, estas son: la inulinasa, la levanasa y la levansacarasa (Zhang, *et al.* 2016). Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación no son concluyentes, ya que reportan por lo menos dos proteínas; una de 32 kDa y otra de entre 110 y 220 kDa, y con una actividad enzimática de 7 o 10 U/ mg proteína, por lo que no queda claro si la hidrólisis de agavina es debida a la acción de una de ellas o al conjunto de ellas. Así, la presente investigación permitirá: i) verificar la presencia de los genes que codifican para la inulinasa, la levanasa y la levansacarasa dentro del genoma de *B. amyloliquefaciens* 12GeP, ii) evaluar su actividad frente a sacarosa, levana, inulina y agavina y iii) concluir si la hidrólisis de agavina es realizada por una de estas enzimas o el conjunto de ellas.

4. Hipótesis

Si *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP es capaz de utilizar inulina de agave como única fuente de carbono, entonces esto se debe a la acción de una fructosilhidrolasa o al conjunto de fructosilhidrolasas producidas por esta bacteria.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar la actividad de las fructosilhidrolasas de *B. amyloliquefaciens* 12GeP recombinantes frente a la agavina, inulina, Objetivos particulares

- Estudiar el genoma de *B. amyloliquefaciens* reportado en las bases de datos para identificar las posibles fructosilhidrolasas que produce.

- Conocer la secuencia exacta de los genes codificantes de fructosilhidrolasas mediante su clonación y secuenciación en pGEM-t easy vector.
- Evaluar la especificidad de las fructosilhidrolasas de *B. amyloliquefaciens* 12GeP hacia los sustratos mencionados mediante su producción de manera recombinante.
- Concluir si la actividad hidrolítica frente a la agavina es debida a una sola enzima o a un conjunto de ellas.

6. Metodología

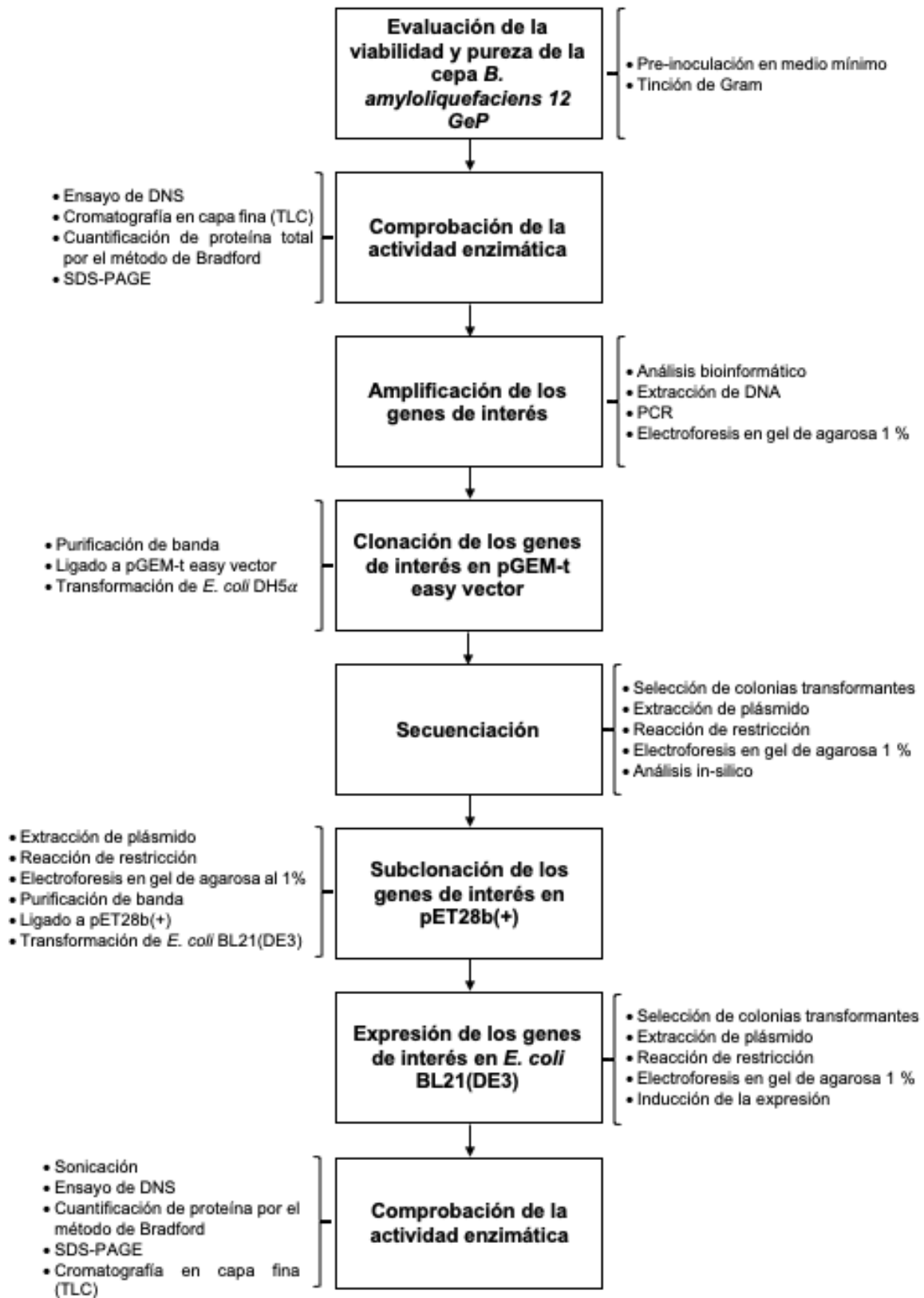


Fig 9. Estrategia experimental desarrollada durante esta investigación.

Materiales

Todos los reactivos, a excepción de la agavina, la cual fue purificada en nuestro laboratorio, fueron adquiridos en Sigma Aldrich y JT Baker.

6.1. Viabilidad y pureza de la cepa *B. amyloliquefaciens* 12GeP

Para verificar que la cepa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP fuera viable, una muestra conservada en glicerol bajo ultracongelación a -72 °C, fue descongelada lentamente en un baño de hielo para evitar la lisis celular. Se tomaron 100 μ L del microorganismo conservado y se añadieron a 10 mL de medio de cultivo mínimo suplementado con agavina al 0.5 % (m/v) estéril para reactivar metabólicamente a la cepa e inducir la expresión de los genes de interés. La composición del medio de cultivo se describe en la tabla 9.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo mínimo.

Reactivo	Concentración % (m/v)
Extracto de levadura	0.5
Fosfato dipotásico	0.1
Sulfato de Magnesio	0.05
Cloruro de potasio	0.05
Sulfato de amonio	0.1
Agavina	0.5

El pre-inóculo fue incubado a 37 °C por 12 h con una agitación de 200 rpm y se tomaron 5 asadas de él para realizar la tinción de Gram, distribuyendo las asadas de manera uniforme sobre un portaobjetos limpio y desengrasado. Se observó la preparación al microscopio para verificar la pureza del cultivo y la morfología colonial.

6.2. Actividad enzimática de *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP

6.2.1. Obtención de la fracción enzimática

En condiciones de esterilidad, se transfirieron los 10 mL del preinóculo a 100 mL de medio de cultivo mínimo suplementado con agavina al 0.5 % (m/v) y se incubaron a 37 °C con una agitación constante de 250 rpm por 24 h. El cultivo se centrifugó a 10 000 rpm, a una temperatura de 4 °C durante 10 min. Debido a que las enzimas de interés son extracelulares, la fracción insoluble (pellet celular) fue desechada y el sobrenadante se sometió a ultracongelación por 24 h. Posteriormente, el sobrenadante se liofilizó para su conservación. El extracto crudo liofilizado fue concentrado 20 veces al ser resuspendido en 5 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8 para ser analizado.

6.2.2. Cuantificación de azúcares reductores por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Se montaron sistemas de reacción por triplicado en un volumen total de 1 mL, los cuales contenían: 100 μ L de sustrato (sacarosa, inulina de achicoria, levana o agavina) al 1 % (concentración final 0.1 %), 100 μ L de proteína (extracto crudo) y completando el volumen final a 1 mL con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8 debido a que fue el pH óptimo reportado por estudios previos de nuestro laboratorio (Pérez, 2016). Para el ensayo de transfructosilación, se montaron sistemas de reacción en un volumen total de 1 mL, los cuales contenían: sacarosa 1 M, 100 μ L de proteína (extracto crudo) y completando el volumen final a 1 mL con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8. Además de los sistemas de reacción, se montaron controles de sustrato y de enzima, los cuales carecían de extracto crudo o de sustrato respectivamente, y se sustituyeron por volúmenes equivalentes de agua MiliQ. Cada sistema fue incubado a 35 °C, 500 rpm por 20 min y finalmente se inactivó colocando cada sistema en un baño de glicerina a 100 °C por 10 min.

El método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Ghose, 1987) se realizó mezclando en tubos de ensayo, 600 μ L de reactivo DNS, 200 μ L de amortiguador de fosfatos 50

mM pH 8 y 100 μ L de reacción enzimática. En seguida, los tubos se sometieron a calentamiento a 90 °C en un baño de glicerina por 5 min para favorecer la reacción de óxido-reducción ya que es una reacción endotérmica y posteriormente se colocaron en un baño de hielo por 20 min para detener la reacción. Finalmente se agregaron 4 mL de agua MiliQ a cada tubo y se realizó la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. La concentración de azúcares reductores se determinó mediante la interpolación de los datos obtenidos en una curva patrón de fructosa con intervalos de concentración de 0 a 2 mg/ mL.

6.2.3. Determinación de los productos de la hidrólisis de fructanos y sacarosa por cromatografía en capa fina (TLC)

Se tomaron 2 μ L de estándar de fructosa, glucosa, sacarosa, inulina, levana o agavina al 1 % o de cada sistema de reacción y se cargaron en una placa de sílica en aluminio de 5 x 10 cm como fase estacionaria. La separación se realizó utilizando una mezcla de butanol, metanol, agua (3:2:1) como fase móvil. Una vez que entró en contacto el eluyente con la placa, se dejó correr por hora y media. Las muestras se revelaron con una solución de H₂SO₄ al 5 % en metanol y orcinol a 10 mg/ mL, utilizando un aspersor para rociar la solución de revelado por toda la placa y finalmente calentarla a 90 °C en una parrilla hasta su revelado.

6.3. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford

El método de Bradford utiliza al colorante azul de Coomassie G250, el cual es capaz de formar un complejo con las proteínas al interactuar con las cargas positivas de la cadena polipeptídica cuando se encuentra en medio ácido. Dicho complejo tiene una coloración azul con una absorbancia máxima a 595 nm. Así, la cantidad de proteína puede ser estimada midiendo la absorbancia del colorante en su forma iónica azul a una longitud de onda de 595 nm.

El reactivo de Bradford se preparó diluyendo una parte del reactivo de Bradford concentrado, con 4 partes de agua MiliQ de acuerdo al manual de Biorad. Se

tomaron 100 μ L de extracto crudo, se mezclaron con 5 mL de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo y se homogenizó utilizando un vortex. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se realizó la medición de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 595 nm, ajustando previamente con un blanco de reactivo. La concentración de proteína total se determinó mediante la interpolación de los datos obtenidos en una curva patrón de BSA con intervalos de concentración de 0 a 1 mg/ mL.

6.4. Obtención del patrón de proteínas del extracto crudo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El SDS-PAGE descrito por Laemmli consiste en un gel discontinuo, con un gel de apilamiento superior y un gel de resolución inferior, que tienen diferentes valores de pH y concentraciones de poliacrilamida. El gel de apilamiento superior tiene un porcentaje menor de poliacrilamida que permite que las proteínas se muevan rápidamente y se "apilen" en una banda apretada antes de entrar en el gel de resolución de poliacrilamida de mayor porcentaje para la separación. Son geles que contienen agentes desnaturizantes, por lo que permiten la separación y diferenciación de proteínas en función de su peso molecular.

La electroforesis se llevó a cabo utilizando geles de poliacrilamida al 10 % de 1.5 mm de espesor, siguiendo la metodología reportada por Laemmli (Laemmli, 1970). La muestra fue preparada mezclando 50 μ L de amortiguador de muestra y 50 μ L de extracto crudo (correspondiente a entre 50 y 100 μ g de proteína) para posteriormente calentar la mezcla a 95 °C por 10 min para desnaturizar las proteínas presentes en el extracto crudo. El gel fue cargado con 30 μ L de la mezcla y la electroforesis fue llevada a cabo a un voltaje constante de 75 volts. El gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 al 0.1 % en 50 % de metanol y 10 % de ácido acético durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se destiñó con una solución de metanol, ácido acético, agua (5:5:1) hasta lograr observar las bandas con claridad. El peso molecular de cada banda fue estimado al compararlas con un marcador de peso molecular.

6.5. Búsqueda de genes codificantes para fructosilhidrolasas en el genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP

6.5.1. Análisis bioinformático del genoma de *B. amyloliquefaciens*

Bajo la sospecha de que la hidrólisis de agavina es debida a la acción de un conjunto de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces β -(2,1) y β -(2,6) de este sustrato, se realizó el análisis bioinformático del genoma de *B. amyloliquefaciens* reportado en las bases de datos (GenBank) con el objetivo de localizar genes codificantes para glicosilhidrolasas, específicamente aquellas capaces de hidrolizar fructanos, como lo son las inulinasas, las levanasas y en menor grado, las levansacarasas.

Para ello, se buscaron los motivos conservados en los que se encuentra la triada catalítica en los genomas de 15 cepas de *B. amyloliquefaciens*, localizando así las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican para la inulinasa, la levanasa y la levansacarasa. Posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias de cada uno de estos genes entre las 15 cepas. Se utilizó la herramienta CLUSTAL OMEGA (EBI) para evaluar la variabilidad de las secuencias de nucleótidos entre ellas, los resultados fueron tomados en cuenta para el diseño de los cebadores que se utilizarían para la amplificación de estos genes por PCR, añadiendo en cada extremo las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas NdeI y XhoI para su uso en los procedimientos de clonación y subclonación.

También, utilizando la herramienta Clustal Omega (EBI), se alinearon las secuencias de aminoácidos para comprobar si todas las enzimas de las cepas analizadas poseían los motivos conservados. Finalmente, utilizando la herramienta Swiss-Model (ExPASy) y utilizando como referencia la inulinasa de *Thermotoga maritima* y la levanasa y levansacarasa de *Bacillus subtilis*, se realizó el modelado por homología de la estructura terciaria de cada enzima, utilizando aquella secuencia de aminoácidos de mayor identidad con respecto a la enzima utilizada como referencia, para evaluar si la posible estructura terciaria concuerda con la estructura terciaria conocida de las GH-J.

6.5.2. Extracción de DNA

Para obtener el DNA, se realizó un cultivo de toda la noche a 37 °C y 200 rpm, inoculando 50 μ L de la cepa conservada en 5 mL de medio LB estéril. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 10 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se resuspendió el botón celular en 500 μ L de buffer de lisis (TRIS-HCl 20 mM pH 7.4, EDTA 0.5 mM pH 8, lisozima 0.2 % (m/v)) y se incubó a 37 °C por 1 h. En seguida, se añadieron 100 μ L de SDS al 10 % mezclando suavemente por inversión y se incubó a 50 °C por 15 min. Después, se añadieron 100 μ L de proteinasa K (10 U/ mL), mezclando suavemente por inversión y se incubó a 37 °C por 1 h. Se añadieron 100 μ L de CTAB/ NaCl 5:2 mezclando suavemente por inversión y se incubó a 50 °C por 1 h.

Se añadieron 800 μ L de cloroformo y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante. Se añadieron 800 μ L de fenol-cloroformo 1:1 pH 8, se mezcló por inversión suave y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, recuperando la fase acuosa en un microtubo de 1.5 mL estéril. Después se añadieron 300 μ L de cloroformo y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa en un microtubo de 1.5 mL estéril. Se añadieron 750 μ L de isopropanol frío y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 100 μ L de buffer TE (TRIS-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM) más 10 μ L/ mL de RNAsa y se incubó a temperatura ambiente por 15 min.

Se añadieron 10 μ L de acetato de sodio 3 M y 250 μ L de isopropanol frío y se incubó en un baño de hielo por 15 min. Se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. En seguida, se lavó el botón celular 3 veces con 200 μ L de etanol frío, centrifugando a 10 000 rpm por 2 min. Por último, se removió cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar por evaporación a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en 50 μ L de agua MiliQ estéril. La solución

de DNA fue cuantificada en un NanoDrop utilizando 1 μL de solución y realizando la determinación por triplicado.

6.5.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

La evaluación de la integridad del DNA se realizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, realizando geles de 4 mm de espesor como se describe enseguida.

Se disolvieron 300 mg de agarosa en amortiguador TB 1X pH 8 con calentamiento suave por 40 segundos con ayuda de un microondas. El volumen desplazado por evaporación fue regenerado añadiendo agua MiliQ. La agarosa fundida fue vertida en el soporte del gel de la cámara de electroforesis, utilizándolo como molde y se añadió 1 μL de bromuro de etidio, distribuyéndolo en toda la matriz del gel con ayuda de una micropipeta.

Una vez formado el gel, se colocó en una cámara de electroforesis y se cubrió completamente con amortiguador TB 1X pH 8 frío hasta alcanzar una altura de 2 mm por encima del gel. Las muestras se prepararon mezclando 1 μL del amortiguador goTaq Flexi 5X y entre 3 a 5 μL de muestra (dependiendo de la concentración de DNA de la muestra). Finalmente, las muestras se colocaron en los pozos del gel y la electroforesis se realizó a 75 V por 1.5 h. El gel fue revelado mediante su exposición a luz UV en un transiluminador.

6.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó mezclando los reactivos correspondientes en microtubos de 200 μL como se describe en la tabla 10, trabajando siempre en un baño de hielo para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

Tabla 5. Contenido de los sistemas de reacción para PCR

Reactivo	Cantidad (μL)
Agua MiliQ estéril	8.5
Buffer goTaq Flexi 5X	2
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTPs 2 mM	2
Oligonucleótido sentido 5 mM	2
Oligonucleótido antisentido 5 mM	2
gDNA	1
Taq Polimerasa 5 U/ μL	0.5

Posteriormente, los tubos fueron introducidos en un termociclador donde se llevó a cabo la PCR bajo las condiciones que se enlistan en la tabla 11.

Tabla 6. Condiciones de reacción de la PCR

Parámetro	Condición
Desnaturalización. Inicial	95 °C/ 3 min
Desnaturalización	95 °C/ 30 seg
Temperatura de alineamiento	T ° en función de los oligonucleótidos/ 30 seg
Temperatura de elongación	72 °C/ 2 min
Temperatura de elongación final	72 °C/ 7 min
Estabilización	4 °C/ ∞
Número de ciclos	30

Una vez terminada la reacción de PCR, se retiraron los tubos del termociclador y se conservaron a -20 °C. La amplificación fue corroborada por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1 % como se describió anteriormente.

6.6. Clonación de los genes de interés en pGEM-t easy vector

6.6.1. Purificación de DNA

Una vez verificada la amplificación de los genes de interés, se realizaron 5 reacciones más de PCR para cada gen, con la finalidad de obtener mayor cantidad

de amplicones. Estos productos de reacción de PCR fueron recuperados y purificados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % como se describió anteriormente. Las bandas correspondientes a los genes de interés se cortaron del gel teniendo cuidado del tiempo de exposición a luz UV para evitar la generación de mutaciones. La purificación se llevó a cabo utilizando el kit de purificación DNA QIAquick extraction de Qiagen de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Los productos de PCR purificados fueron cuantificados utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), realizando mediciones por triplicado.

6.6.2. Ligado de los genes de interés en pGEM-t easy vector

Esta parte del experimento se realizó mediante la reacción de ligación entre el gen de interés previamente amplificado (inserto) y purificado, con el vector pGEM-t easy vector mezclando los reactivos correspondientes en un microtubo de 200 μL , como se especifica en la tabla 12.

Tabla 7. Contenido de los sistemas de reacción para la ligación entre los genes de interés y el vector.

Reactivo	Cantidad (μL)
Rapid Ligation Buffer 2X, DNA Ligase T4	5
pGEM-t easy vector (50 ng)	1
Inserto	X*
DNA Ligasa T4 (3 U/ μL)	1
Agua MiliQ estéril	A completar 10 μL de volumen final

*La cantidad de inserto se colocó de tal forma que la proporción fuera 3:1 inserto:vector con el objetivo de favorecer la reacción

Los tubos de reacción fueron incubados a 4 °C por 12 h máximo.

6.6.3. Transformación de *E. coli* DH5 α

Para propagar y conservar los genes de interés se transformaron células de *E. coli* DH5 α con las construcciones resultantes de las reacciones de ligación previas. Para ello, se mezclaron 10 μL de reacción de ligación con 100 μL de amortiguador KCM (KCl 100 mM, CaCl₂ 30 mM y MgCl₂ 50 mM). Se descongelaron lentamente 200 μL

de células competentes de *E. coli DH5α* contenidas en microtubos de 1.5 mL en un baño de hielo, se tomaron 100 μL de reacción de ligación en amortiguador KCM y se mezclaron cuidadosamente con las células competentes dejando incubar en un baño de hielo por 30 min. Posteriormente se realizó la transformación de las células competentes mediante un choque térmico, colocando los tubos en un termomixer a 42 °C por 90 s sin agitación e inmediatamente después se colocaron en un baño de hielo por 2 min.

En condiciones de esterilidad, se añadieron 400 μL de medio LB estéril y se incubaron a 37 °C por 1 h con una agitación constante de 300 rpm. Se centrifugaron los tubos y en condiciones de esterilidad se descartaron 2/3 partes del sobrenadante. Las células se resuspendieron cuidadosamente en la tercera parte del sobrenadante. Finalmente, se plaqueó con ayuda de una punta de micropipeta ajustada en forma de “V” en una placa de medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 μg/ mL), X-Gal (1 mg/ mL) e IPTG (0.1 mM). La placa fue incubada a 37 °C por 24 h y luego incubada a 4 °C por 24 h para favorecer el desarrollo de color en las colonias transformantes. La eficiencia de transformación se calculó utilizando las siguientes fórmulas:

$$UFC\ transformadas = \frac{(No.\ de\ colonias)(Coeficiente\ de\ dilución)(Vol.\ original\ de\ transformación)}{Volumen\ empleado\ en\ la\ placa}$$

$$Eficiencia\ de\ transformación = \frac{UFC\ transformadas}{DNA\ de\ plásmido\ (\mu g)}$$

6.7. Secuenciación de los genes de interés

6.7.1. Selección de colonias transformantes y extracción de pDNA

Para verificar que el inserto corresponda a los genes de interés, conocer la secuencia exacta de estos genes y para descartar posibles mutaciones, se secuenciaron los plásmidos resultantes. Para ello, se seleccionaron 5 colonias, tomando únicamente aquellas colonias blancas con un diámetro entre 1 y 2 mm aproximadamente. Cada colonia fue re-suspendida en 5 mL de medio LB

suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubada a 37 °C con agitación constante de 200 rpm durante no más de 16 h. Se separaron 1.5 mL de cada cultivo para su conservación, añadiendo 0.5 mL de cultivo y 0.5 mL de glicerol grado biología molecular estéril, en 3 microtubos estériles. Los cultivos fueron centrifugados a 10 000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El DNA plasmídico fue obtenido y purificado utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN de acuerdo con las especificaciones del proveedor. La concentración del pDNA fue determinada espectrofotométricamente utilizando un NanoDrop.

6.7.2. Análisis del pDNA extraído

Para verificar que el pDNA obtenido contuviera un inserto de tamaño esperado, se realizaron reacciones de restricción utilizando las endonucleasas NdeI y XhoI, así como los reactivos de New England Byolabs, colocando en un microtubo de 200 μL los reactivos correspondientes como se muestra en la tabla 13.

Tabla 8. Contenido de los sistemas de reacción de restricción de pDNA

Reactivo	Cantidad
pDNA	1 μg^*
Amortiguador de reacción	1 μL
Endonucleada NdeI	0.5 μL
Endonucleasa XhoI	0.5 μL
Agua MiliQ estéril	Para completar 10 μL de volumen final

*La cantidad en μL de pDNA estuvo en función de la concentración que se tuvo de cada construcción, se colocaron los μL necesarios para alcanzar 1 μg de pDNA.

Los tubos fueron incubados a 37 °C por una h y luego a 65 °C por 20 min para inactivar a las endonucleasas utilizadas. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % como se describió anteriormente para corroborar la presencia del inserto.

6.7.3. Secuenciación y análisis *in-silico*

Una vez corroborada la presencia de un inserto del tamaño esperado, las muestras de pDNA extraídas y purificadas, fueron enviadas al laboratorio Laragen Inc. (Estados Unidos) para su secuenciación. Para discernir aquellos nucleótidos reportados como “N”, los electroferogramas fueron visualizados y analizados utilizando el programa 4peaks de Nucleobytes, analizando base por base para discernir la secuencia completa del gen.

Una vez obtenida la secuencia completa de los genes de interés, se realizó su traducción a secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta Translate (ExPASy), verificando que no hubiera codones de paro prematuros y descartando aquellas colonias que no poseyeran un inserto apto para la expresión. Después, las secuencias ahora conocidas de los genes de levansasa, inulinasa y levansacarasa, fueron alineados utilizando BLASTp con el objetivo de comparar su similitud con otras proteínas reportadas. También se identificó si la proteína cuenta con una secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido señal implicado en el transporte de la proteína hacia la membrana plasmática o su excreción como proteína extracelular, utilizando la herramienta SignalP-5.0 (CBS).

6.8. Subclonación de los genes de interés en pET28b(+)

Una vez que se confirmó cuál de las colonias transformantes contenía el gen de interés apto para su expresión, el inserto fue subclonado en el vector pET28b(+) para la expresión de la proteína. El procedimiento fue realizado conforme a lo descrito anteriormente en el apartado 7.4, realizando la correspondiente reacción de restricción del plásmido pET28b(+) y de la construcción en pGEM-t, purificando las bandas correspondientes al inserto y al plásmido pET28b(+) linealizado, realizando las correspondientes reacciones de ligación utilizando la DNA ligasa T4 de Novagen y transformando células de *E. coli* BL21(DE3) sustituyendo el antibiótico por kanamicina a una concentración final de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.9. Expresión de los genes de interés en *E. coli* BL21(DE3)

6.9.1. Selección de las colonias óptimas para la expresión

Tras la incubación, se seleccionó una colonia transformante de aproximadamente 1 – 2 mm de diámetro, se resuspendió en 5 mL de medio LB suplementado con kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó por 12 h máximo a una temperatura de 37 °C con agitación constante a 200 rpm. Del cultivo se separó 1.5 mL y se conservó añadiendo 0.5 mL de cultivo y 0.5 mL de glicerol grado biología molecular estéril en microtubos de 1.5 mL estéril. El cultivo restante se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El pDNA se extrajo, purificó, cuantificó y digirió con las endonucleasas NdeI y XhoI como se describió anteriormente. Mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % se verificó la presencia del plásmido e inserto en cada colonia, descartando aquellas que no contuvieran el inserto adecuado.

6.9.2. Inducción de la expresión

Se seleccionó una colonia transformante adecuada para la expresión conforme a lo descrito anteriormente en los apartados 7.5.1 y 7.5.2 y se realizó un pre-inóculo de toda la noche a 37 °C y 200 rpm en 10 mL de medio LB suplementado con kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Una vez cumplido el tiempo de incubación, el pre-inóculo fue transferido a 200 mL de medio de cultivo LB suplementado con kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una O.D.₆₀₀ de 0.6. Una vez alcanzada la densidad óptica, el cultivo fue transferido a un baño de hielo por 20 min. La inducción fue realizada bajo condiciones suaves de inducción añadiendo IPTG a una concentración final de 0.1 mM e incubando a 20 °C por 4 h. Finalmente, el cultivo de inducción fue centrifugado a 9 500 rpm por 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el botón celular fue conservado en refrigeración a – 20 °C.

6.9.3. Comprobación de la inducción y disrupción celular

Previo a la centrifugación del cultivo de inducción, se tomó una muestra de 1.5 mL del cultivo y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue descartado

y el botón celular fue resuspendido en 500 μ L de buffer de carga y calentado en un baño de agua en ebullición por 10 min para ser corrido en una SDS-PAGE siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Una vez comprobada la expresión de la proteína de interés, el botón celular del cultivo de inducción fue resuspendido en 10 mL de amortiguador de lisis (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8, inhibidor de proteasas 1 μ L/ mL (Thermo Scientific), lisozima 0.2 % (m/v)) y sometido a un proceso de sonicación dentro de un baño de hielo, que consistió en 30 pulsos de 10 s a 45 % de Amplitud y 10 s de descanso, agitando suavemente entre cada pulso para evitar el calentamiento excesivo de la muestra. El extracto celular fue conservado en un baño de hielo y posteriormente fue centrifugado a 9 500 rpm por 15 min a 4 °C para evitar la degradación de la enzima inducida y separarlo de los restos celulares. El botón celular fue descartado y el sobrenadante fue conservado en un baño de hielo para los estudios de actividad enzimática.

6.10. Comprobación de la actividad enzimática del extracto crudo recombinante.

El extracto crudo recombinante se utilizó para realizar una SDS-PAGE y verificar la presencia de la proteína en él y se cuantificó la cantidad de proteína total mediante el método de Bradford como se describió anteriormente en los apartados 7.2.4 y 7.2.5. La comprobación de la actividad enzimática de las enzimas recombinantes fue realizada mediante la reacción entre el extracto crudo (sobrenadante) y sacarosa, inulina de achicoria, levana y agavina como sustratos con la misma metodología descrita anteriormente en el apartado 7.2., con la única diferencia de que se realizaron las reacciones a pH 5 y pH 8 para cada enzima debido a que otros autores reportan, en su mayoría, esos pH's óptimos (ver tablas 5, 6 y 7). Posterior a la reacción enzimática, se cuantificó la concentración de azúcares reductores mediante el método de DNS y se determinaron los productos de la hidrólisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) conforme a lo descrito en el apartado 7.2.2 y 7.2.3.

6.11. Purificación de las enzimas recombinantes

Una vez comprobada la actividad enzimática del extracto crudo recombinante, este fue filtrado con una membrana de polipropileno Millipore de 0.45 μm de diámetro estéril. Las enzimas recombinantes fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad a iones de níquel inmovilizados (IMAC), utilizando la columna HisTrap HP de GeneralElectric de acuerdo a las especificaciones del proveedor, utilizando una concentración de imidazol 50 mM para la unión de la proteína a la columna y un solo gradiente de elusión de imidazol 1 M. Se determinó la pureza de la enzima recombinante mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se especificó en el apartado 6.4. y posteriormente fue cuantificada utilizando el método de Bradford.

7. Resultados y análisis de resultados

7.1. Viabilidad y pureza de la cepa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP

Tras la incubación por 12 horas del medio de cultivo mínimo, suplementado con agavina pura al 0.5 % (m/v) inoculado con la cepa conservada de *B. amyloliquefaciens* 12GeP se observó turbidez en él, lo cual demuestra la viabilidad de la bacteria (Fig 10).

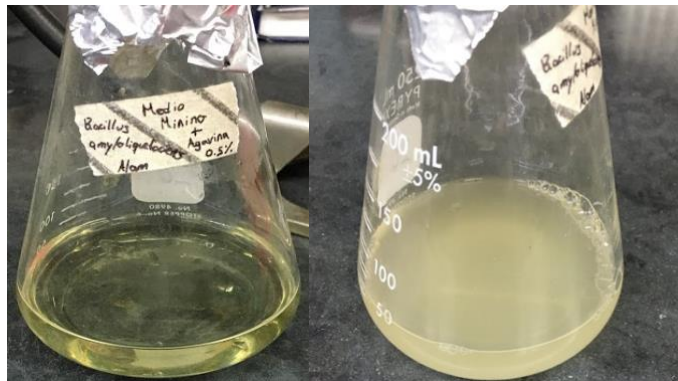


Fig 10. Desarrollo de la turbidez del medio de cultivo mínimo suplementado con agavina pura al 0.5 % tras su incubación a 37 °C por 24 horas.

Por otro lado, la tinción de Gram realizada a este cultivo revela la presencia de un solo tipo de morfología celular, el cual corresponde a bacilos Gram positivos agrupados en cadenas (estreptobacilos) (Fig 11). Dicho crecimiento corresponde a la morfología reportada de *B. amyloliquefaciens*, lo cual nos permite asegurar que la cepa conservada de *B. amyloliquefaciens* 12 GeP con la que se realizó este estudio se encuentra viable y pura.



Fig 11. Tinción de Gram de la cepa *B. amyloliquefaciens* 12GeP.

7.2. Actividad enzimática

7.2.1. Cuantificación de proteína por el método de Bradford y SDS-PAGE.

La concentración resultante de proteína en el extracto crudo fue de 0.71 mg/ mL. Dicho resultado fue obtenido utilizando una curva patrón de albúmina y extrapolando la absorbancia resultante de la muestra (extracto crudo) (ver anexo 1).

De acuerdo a lo reportado en las bases de datos bioinformáticas (como se describirá más adelante), el peso molecular aproximado para las 3 enzimas de interés se encuentra entre 50 y 60 kDa. La SDS-PAGE realizada a partir de una muestra del cultivo anterior, muestra una banda de un tamaño similar al reportado, por lo que podemos pensar que corresponden a las enzimas de interés (Fig 12).

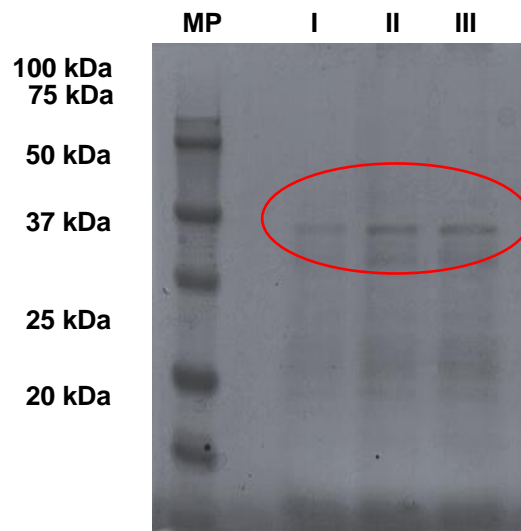


Fig 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% del extracto crudo nativo del cultivo de *B. amyloliquefaciens* 12GeP. Se observa el corrimiento del estándar de peso molecular (MP), 10, 20 y 30 μ L de extracto crudo nativo (I, II y III) a 75 volts por una 1.5 h.

7.2.2. Determinación de la actividad inulinolítica de *B. amyloliquefaciens* 12GeP por el método de DNS

El objetivo de la determinación de azúcares reductores mediante el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) es confirmar la actividad hidrolítica del extracto crudo frente a diferentes fructanos, ya que una vez que la(s) enzima(s) lo hidrolizan, se genera fructosa y/o FOS, dependiendo si se trata de una exo- o una endoenzima. La

reacción frente a sacarosa podría revelar dos tipos de reacción: una reacción de hidrólisis que generaría glucosa y fructosa libre, y una reacción de transfructosilación, que generaría FOS (Huazano y López, 2018 y Lammens *et al.*, 2009). El método de DNS permite así, verificar que se haya llevado a cabo la reacción de hidrólisis, mediante la detección de azúcares reductores libres (glucosa y fructosa) que al reaccionar con el ácido dinitrosalicílico genera una coloración naranja-café y finalmente se puede calcular la actividad enzimática mediante la medición de la absorbancia de cada sistema a una longitud de onda de 545 nm empleando una curva patrón de fructosa (Anexo 2 y Tabla 9). La actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un μmol de fructosa en un minuto.

Tabla 9. Concentración de azúcares reductores liberados enzimáticamente y actividad enzimática.

SUSTRATO	Concentración de azúcares reductores ($\mu\text{mol/ mL}$)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ mL)
Sacarosa	4.39	3.09 ± 0.07
Levana	2.65	1.87 ± 0.08
Inulina	3.77	2.65 ± 0.18
Agavina	2.58	1.82 ± 0.16

Los cálculos se realizaron tomando en cuenta la concentración de proteína (0.71 mg/ mL) como se especifica más adelante.

El objetivo de esta parte del estudio es únicamente comprobar la hidrólisis de sacarosa, levana, inulina y agavina por la o las enzimas presentes en el extracto crudo nativo. Como se puede observar en la tabla 9, la o las enzimas presentes en el extracto crudo nativo son capaces de hidrolizar todos los sustratos probados, lo cual concuerda con los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Pérez, 2016 y González, 2018), siendo la sacarosa el sustrato por el que tiene mayor actividad, seguido de la inulina de achicoria, la levana y finalmente la agavina. Esto establece una relación en la cual a mayor complejidad del sustrato, menor es la actividad de la o las enzimas presentes en el sobrenadante. La reacción de hidrólisis de la agavina probablemente se debe a una inulinasa presente en el sobrenadante capaz de hidrolizar tanto los enlaces β -(2,1) como los enlaces β -(2,6) del fructano

y finalmente, la sacarosa liberada probablemente es hidrolizada por una levansacarasa, generando glucosa y fructosa libres.

Es importante señalar que la actividad obtenida para cada sustrato es muy baja comparada con la que se obtiene con las inulinasas de *K. marxianus* con las que cuenta nuestro laboratorio (máximo 1.4 U/ mg proteína) (ver tabla 4).

7.2.3. Determinación de los productos de la hidrólisis de fructanos y sacarosa por cromatografía en capa fina (TLC)

Para determinar que el patrón de productos que se generaron de la hidrólisis de cada sustrato, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC). Como se mencionó, la hidrólisis de los fructanos puede generar como productos fructosa (si se trata de una exoenzima) o FOS (si se trata de una endoenzima), mismos que se evidencian al realizar una TLC (Fig 13).

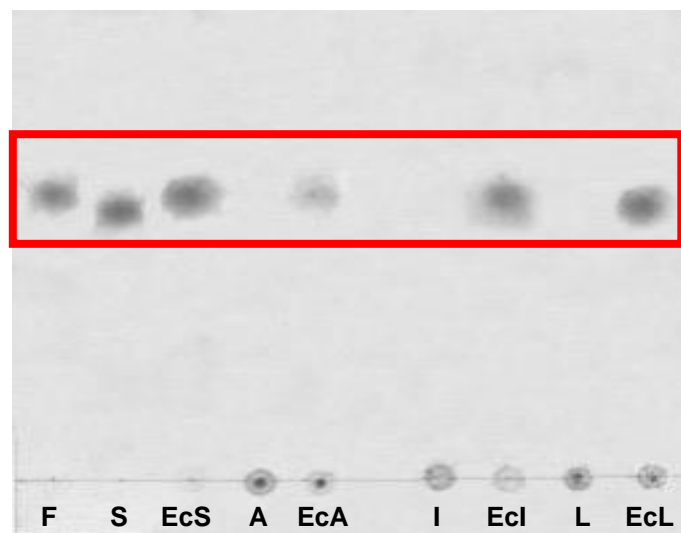


Fig 13. TLC de las reacciones entre el extracto crudo contra los distintos sustratos a 37 °C y 500 rpm por 20 minutos. (F) fructosa al 1 %, (S) sacarosa al 1 %, (EcS) reacción entre el extracto crudo y sacarosa, (A) agavina al 1 %, (EcA) reacción entre el extracto crudo y agavina, (I) inulina al 1 %, (EcI) reacción entre el extracto crudo e inulina, (L) levana al 1 % y (EcL) reacción entre el extracto crudo y levana.

Como se puede observar en la cromatopla, al comparar las señales de las reacciones del extracto crudo con cada sustrato, se observa únicamente una señal comparable a la de la fructosa, es decir, los únicos productos de reacción

corresponden a fructosa y/o glucosa. Además, la reacción con sacarosa no da evidencia de la formación de FOS, por lo cual concluimos que no se está llevando a cabo una reacción de transfructosilación bajo estas condiciones. Estos resultados confirman los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación en los que se comprueba que esta bacteria es capaz de utilizar a la agavina como única fuente de carbono a través de la secreción de una o varias fructosilhidrolasas. También, como podemos observar en las tablas 5 y 6, para el género *Bacillus*, la inulinasa corresponde a una exo-inulinasa (a excepción de las endo-inulinasas de *B. safensis* si *B. smithii*), en las que al utilizar a la inulina como sustrato, los únicos productos de reacción son fructosa y glucosa. Por otro lado, las levanasas del género *Bacillus* están reportadas como endo-levanasas que generan FOS de 7 residuos de fructosa cuando se utiliza levana e inulina como sustrato. Esto nos lleva a pensar que la degradación de agavina es debida a la acción conjunta de estas tres enzimas; la exo-inulinasa hidrolizando los enlaces β -(2,1) en los extremos no reductores de la molécula, la endo-levanasa hidrolizando los enlaces β -(2,6) en el interior de la molécula y finalmente la levansacarasa hidrolizando los puntos de ramificación y la sacarosa generada por la acción de las otras enzimas.

7.3. Búsqueda de genes codificantes para fructosilhidrolasas en el genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP

7.3.1. Análisis bioinformático del genoma de *B. amyloliquefaciens*

El análisis bioinformático del genoma de *B. amyloliquefaciens* reportado en las bases de datos (GenBank y Uniprot), demostró que este microorganismo posee los genes que codifican para una inulinasa (1470 pb), una levanasa (1545 pb) y una levansacarasa (1422 pb). Además, el alineamiento entre las secuencias de nucleótidos de estos genes muestra una alta variabilidad aleatoria entre cepa y cepa y regiones con secuencias bien conservadas (Anexos 1 a 3). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Chen y colaboradores, quienes analizaron los genomas de 24 cepas de *B. velezensis* para identificar a los genes implicados en la producción de enzimas lignocelulósicas. Ellos identificaron un gran número de

glicosil-hidrolasas de diferentes familias y por lo menos tres glicosil-hidrolasas de la familia GH32, aunque no mencionan a la levansacarasa perteneciente a la familia GH68 y cuya caracterización completa ya se encuentra reportada en las bases de datos. Esto coincide con el hecho de que las bacterias pertenecientes al grupo operativo “*B. amyloliquefaciens*” (véase más adelante) son capaces de producir enzimas que podrían ser las responsables de la degradación de agavina; estas son la inulinasa, la levanasa y la levansacarasa.

Los alineamientos de nucleótidos realizados permitieron diseñar los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de estos genes. Debido a la alta variabilidad de las secuencias, se diseñaron oligonucleótidos degenerados para aumentar la probabilidad de amplificación, verificando que cada uno tuviera por lo menos 18 nucleótidos de longitud, una Tm de entre 50 y 65 °C y no forman estructuras secundarias entre ellos (Tabla 10).

Tabla 10. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes de interés y sus características.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño	% GC	Tm (°C)
Levanasa	5' CATATG GYAGCAAATGGCCC	5' CTCGAG CTAAGYATGAATCGAAC	21/23	48/43	55
Inulinasa	5' CATATG GATAGAATTCAGCAG	5' CTCGAG TCAGCTTCTTTTCCAA	21/22	36/43	55
Levansacarasa	5' CATATG AACATCAAAAAAATTGC	5' CTCGAG TTAGTTGTTAACCGTAA	23/23	26/44	55

En negritas se resaltan las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas NdeI (CATATG) y XhoI (CTCGAG).

Las secuencias de aminoácidos de estas enzimas reportadas en las bases de datos, tienen un tamaño de 489 aa para la inulinasa, 514 aa para la levanasa y 473 aa para la levansacarasa. Utilizando la herramienta CLUSTAL OMEGA, se observó que los motivos que contienen a la triada catalítica se encuentran conservados en las 3 enzimas (inulinasa, levanasa y levansacarasa) de las 15 cepas de *B. amyloliquefaciens* analizadas (Anexo 4, 5 y 6). Además, el modelado por homología automático realizado mediante el programa Swiss-Model (ExPASy), muestra que las secuencias de aminoácidos correspondientes a la inulinasa y la levanasa podrían tener una estructura terciaria característica de la familia GH32, observándose un dominio β -propela y un dominio β -sándwich. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos correspondiente a la levansacarasa predice una

estructura terciaria característica de la familia GH68, observándose únicamente un dominio β -propela (Fig 14).

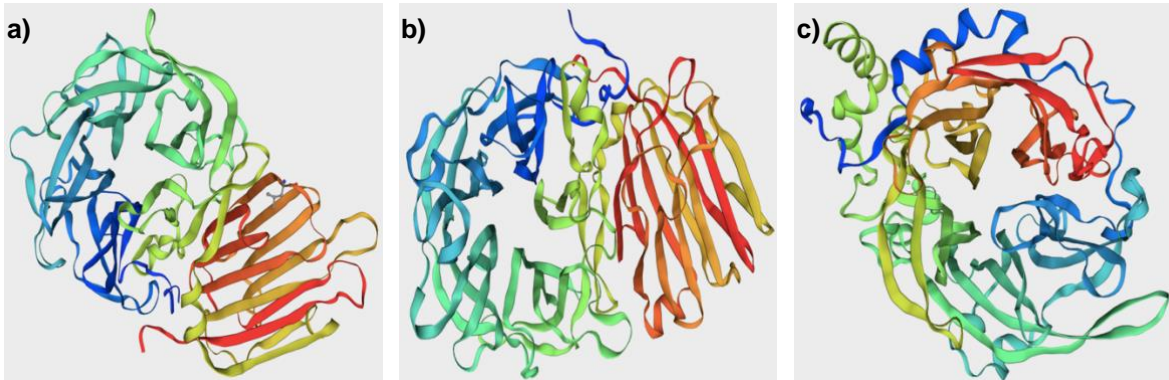


Fig 14. Modelado por homología realizado con la herramienta bioinformática Swiss-Model (ExpASY). Se utilizaron como referencia las estructuras cristalográficas de (a) la inulinasa de *T. maritima* con una identidad del 35.58 %, (b) la levansasa de *B. subtilis* con una identidad del 43.63 % y (c) la levansacarasa de *B. subtilis* con una identidad del 89.62 %

Finalmente, utilizando el programa PyMol, se realizó el solapamiento de estas estructuras para corroborar la similitud estructural entre ellas y con la estructura de las familias GH32 y GH68. Como se observa en la figura 15, todas las estructuras comparten los dominios β -propela y a excepción de la levansacarasa, también comparten el dominio β -sándwich de las familias GH32 y GH68.



Fig 15. Superposición de las estructuras predichas por homología de la inulinasa (verde), levansasa (morado) y levansacarasa (rosa) de *B. amyloliquefaciens* 12GeP.

7.3.2. Extracción de gDNA y amplificación de los genes de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La extracción de DNA genómico se realizó mediante el método de fenol-cloroformo, obteniendo una concentración de 137.96 ng/ μ L con una pureza aceptable de 1.75 (relación 260/ 280). Tanto los productos de reacción de PCR como el gDNA fueron evaluados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Fig 15).

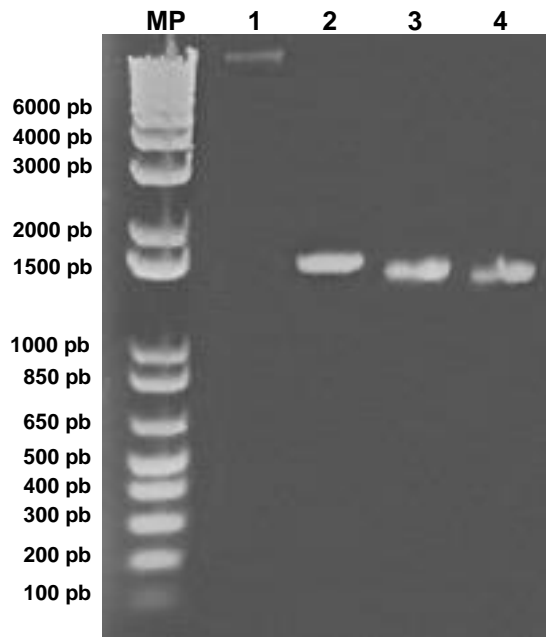


Fig 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se muestra marcador de peso molecular (MP), gDNA(1), amplificación del gen de levanasa (2), amplificación del gen de inulinasa (3) y amplificación del gen de levansacarasa (4).

Como se puede observar en el carril I de la figura 14, el DNA genómico se observa como una sola banda de muy alto peso molecular sin corrimiento o la presencia de otras bandas de menor peso molecular, lo cual nos indica que el gDNA se encuentra íntegro y puro. La amplificación de los genes fue exitosa bajo las condiciones establecidas, observándose en los carriles II, III y IV el corrimiento de la amplificación de los genes de levanasa (1545 pb), inulinasa (1470 pb) y levansacarasa (1422 pb), respectivamente. Se observan como una sola banda bien definida que al compararlas con el marcador de peso molecular (MP), corresponden al tamaño esperado.

7.4. Clonación de los genes de interés en pGEMt-easy vector

La transformación de *E. coli* DH5 α con las construcciones pGEMt::LeV, pGEMt::InU y pGEMt::LvS tuvieron una eficiencia de 4.8×10^7 , 1.15×10^7 y 1.23×10^7 células transformadas por μg de pDNA, respectivamente. La electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión enzimática de los plásmidos extraídos y purificados de las 5 colonias transformantes seleccionadas para la construcción pGEMt::LeV muestra una banda de un tamaño aproximado de 1545 pb correspondiente al gen de la levansasa y una banda de un tamaño aproximado de 3000 pb correspondiente al vector pGEMt.

Del mismo modo, la electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión enzimática de los plásmidos extraídos y purificados de las 5 colonias transformantes seleccionadas para las construcciones pGEMt::InU y pGEMt::LvS, muestran en ambos casos, que únicamente 4 de las 5 colonias contienen un inserto del tamaño esperado al observarse bandas de un tamaño aproximado de 1470 pb y 1422 pb correspondientes a los genes de la inulinasa y levansacarasa, respectivamente además de las bandas de 3000 pb correspondientes al vector pGEMt.

Estos resultados sugieren que las 5 colonias transformantes seleccionadas con la construcción pGEMt::LeV y 4 de las 5 colonias transformantes seleccionadas con las construcciones pGEMt::InU o pGEMt::LvS son candidatas para la extracción de plásmido para su secuenciación (Fig 16).

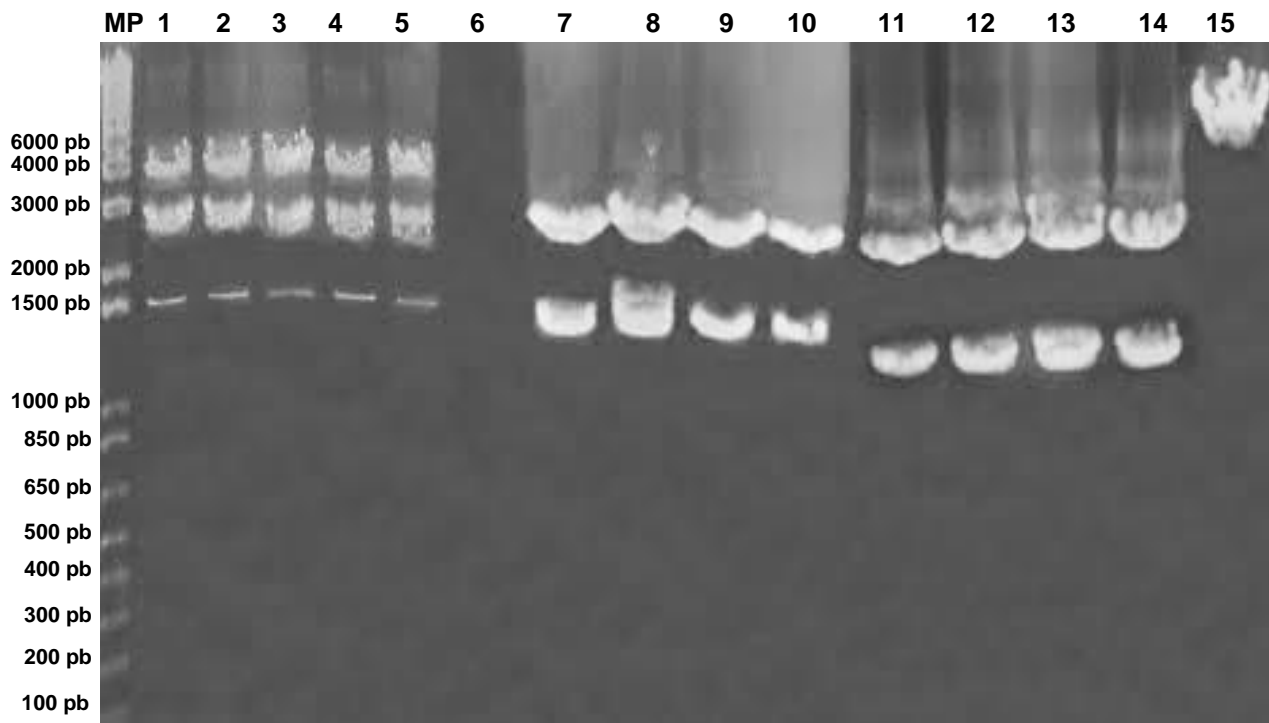


Fig 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión enzimática de las construcciones (1, 2, 3, 4 y 5) pGEMt::LeV, (6, 7, 8, 9 y 10) pGEMt::InU y (11, 12, 13, 14 y 15) pGEMt::LvS. Se observa una migración característica de topoisómeros de los plásmidos debido a la digestión incompleta de estos.

7.5. Secuenciación y análisis bioinformático.

La secuenciación de las construcciones realizadas mostró que solamente una de las colonias seleccionadas de cada construcción contenía el inserto correspondiente al gen de interés. Cada resultado de secuenciación fue minuciosamente evaluado mediante el análisis del electroferograma reportado por el proveedor para discriminar aquellos nucleótidos reportados como “N” (Fig 17).

Para el gen de inulinasa:

ATGGATAGAATTCAGCAGGCGGAAGAAGCTTTGAAGGAAGCCGAGGGTAAAGTGAAACAAAG
ATATCGATTGGGGTACCATATTATGCCCCGGGCGAATTGGATCAATGATCCGAACGGGCTTAT
TCAGTTTTAAAGGAGAATACCACGCTTTTTTTCAGCATCATCCGTATGATGAGCATTGGGGGCCG
ATGCATTGGGGACATGTAAAAAGTAAAGATCTCATTGATGGGAGCACCTGCCGGTTGCCTTA
GCTCCGGGGCGATGCATTGACCAAAGCGGCTGTTTTTCGGGAAGCGCGGTTCGATGATCATGG
AAGATTAGCCCTCATCTATACAGGCCATAATATAATTGATCAAGAGAAAAGACCTATTCTATCAAA
CTCAAAATATCGCTGTCAGCCAAGATGGAACCGTGTGGAAAAGCTTCAGAAAAACCCTGTTAT
TGCGGAACCGCCGGAAGACAGCGCCCGTCAATTCGCGATCCGAAAGTATGGAAGCATCGCG
ATGTTTGGTATATGGTCATCGGCAACTCTTCAAAGAAAACGTCCGACGGGTTCGTTTTATACCG
TTCACCTGATTTGCGTGATTGGGAATACGCGGGGGTTCTCGCCAAAGTGACGGTAATCTCGG
CTATATGTGGGAATGTCCTGATTTCTTTGAATTAGGCGGCAAGCATGTCCTGCTGATTTGCCCC
CAGGGGATCGAGGCGGACGGTGATTCTATCAAATTTACATCAAACCGGCTATTTAATCGGT
GACTATCATGATGAAACAAACAAATTTACACACGGCGCTTTTAAAGAACTGGATCACGGCCATG
ACTTTTACGCCGTGCAACATTATTAGATGATAAAGGACGCAGAATTGCTATCGGGTGGATGGA
TATGTGGGAATCTGAGATGCCGACAAAAGCGGACGGATGGTGCGGTGCCTGACTTTGCCGC
GAGAAGTACTTTGCGTGATGATCATAAACTTTTATGATGAATCCCGTGGAAAGAAACCAAGCAGCT
GCGGAAAATGGAGTATCGGGAATGTGCCGGACGATCGGTTTCAGGGAGTTACTTGACAAAGA
CATCCGAAGACCTGCTTGAAGTCCGAGTCTGTGTTGATATAAACGATTCTGATGCCGAAACGG
CAGGTTTTAAGATTGCGCGCCTTGACGAAGAAGAACTTGTGCTGACATACAATCTAACGGATAA
AAAGCTGACACTTGATTGCACCAAGATGGGGAAAGCGAAAGACGGTGTGAGAAGGGTGCAGA
CGGATACAAACGGCAAGCTGGCGCTGCGTATCTTTATTGACAGATCCTCGATTGAAGTATTCG
CCAATCATGGAGAAACAACGATGACAAGCCGTATCTATCCGAATGAAGGCAGATTGGGGATTG
AGCTGTTTTCTGAGAAAGGCGCCGTAAAGGTTGAGGAATTCACCTATTGGACGTTAAAGGACA
TTTGAAAAGAAGCTGA

Para el gen de levansacarasa:

ATGAACATCAAAAAAATTGCAAACGAGCCACAGTTCTAACTTTTACGACTGCACTTCTGGCAG
GAGGAGCGACTCAAGCCTTCGCGAAAGAAAATACCCAAAACCTTACAAAGAAACGTACGGCG
TCTCTCACATCACACGCCATGATATGCTGCAGATCCCTAAACAGCAGCAAAGTGAAAAATACCA
AGTGCCCTCAATTCGACCAATCAACAATTAATAATATCGAGTCCGCAAAGGACTGGATGTATGG
GACAGCTGGCCGCTCCAAAACGCTGACGGAACAGTAGCTGAATACAACGGCTATCACGTTGT
GTTTGCTCTTGCCGGAAGCCCGAAAGACGCTGATGACACATCCATCTACATGTTTTATCAAAAA
GTCGGCGCAACTCGATCGACAGCTGGAAAACGCGGGCCGTGTCTTTAAAGACAGCGATAA
GTTCAACGCCAACGATGAAATCCTGAAAGAACAGACACAAGAATGGTCCGGTTCTGCAACCTT
TACATCTGACGGAATAATCCGTTTATTCTACACTGACTTTTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAA
GCCTGACAACGGCGCAGGTAATGTGTCAAAATCTGATGACACGTTCAAGATCAACGGAGTGG
AAGATCATAAAACGATTTTTGACGGCGACGGAATAATCAAAACGTTTACAGCAGTTTATCGA
TGAAGGGAACATACATCCGGCGACAACCATACGCTGAGAGACCCTCACTACGTTGAAGACAA
AGGCCATAAATACCTTGTATTGAAAGCCAACACGGGAACAGAAAACGGATACCAAGGCCAAGA
ATCTTTATTTAACAAGCGTACTACGGCGGCAGCACAACTTCTTCCGTAAGAAAGTCAGAAG
CTTCAGCAAAGCGCTAAAAAACGCGATGCTGAATTAGCGAACGGCGCCCTCGGTATGGTAGA
GTTAAACGATGATTACACATTGAAAAAGTCATGAAGCCGCTGATTACTTCAAATACGGTAACA
GATGAAATCGAGCGCGGAATGTTTTCAAATGAACGGCAAATGGTACCTGTTCACTGATTAC
GCGGTTCAAAAATGACGATCGACGGTATTAACCTCAAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTATC
AAACTCTTTAACAGGTCTTACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGTCTTGTACTGCAATGGGTCTT
GATCCTAACGATGTAACGTTCACTTACTCTCACTTCGCAAGTCCGCAAGCCAAAGGCAACAAT
GTCGTGATCACAAGCTACATGACAACAGAGGCTTCTTTGAGGATAAAAAGGCAACATTTGCG
CCAAGCTTCTAATGAACATCAAAGGCAAGAAAACATCCGTTGTTAAAAACAGCATCCTTGAAC
AAGGACAGCTTACGGTTAACAACATAA

Cada secuencia fue alineada utilizando Blastn, dando como resultado que las secuencias de los genes de levanasa, inulinasa y levansacarasa poseen la mayor identidad (del 99 %) con secuencias reportadas únicamente como glicosilhidrolasas de *B. velezensis* AL7, *B. velezensis* S4 y *B. velezensis* LPL061, respectivamente (Anexo 7, 8 y 9).

Por un lado, de acuerdo a lo reportado por Zhang y colaboradores en su estudio sobre la variabilidad genómica entre las mismas especies de géneros bacterianos aislados de diferentes nichos, el género *B. amyloliquefaciens* comprende dos subespecies; *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* asociado a plantas y *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* no asociado a plantas. Estas subespecies se diferencian por sus características fisiológicas como: la habilidad de colonización de las raíces y la producción de hormonas, antibióticos y enzimas que ayudan al crecimiento de la planta y a la relación simbiótica entre ellos (Zhang, *et al.*, 2016). Por otro lado, *B. amyloliquefaciens* es considerado como una unidad taxonómica por encima del nivel de especie, designado como “grupo operativo *B. amyloliquefaciens*” que consiste en *B. amyloliquefaciens* del suelo y *B. siamensis* y *B. velezensis*, ambas asociadas a plantas. Los miembros de este grupo operativo están estrechamente relacionados y poseen cambios muy sutiles a nivel genómico entre uno y otro debido a las diferencias en el sitio donde se desarrollan (Fan, *et al.*, 2017). De acuerdo a estos resultados, es probable que debido a la alta similitud entre los genomas de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* y *B. velezensis*, la identificación de nuestra cepa de trabajo haya sido confundida y en realidad sea una cepa de *B. velezensis* y no de *B. amyloliquefaciens*.

Cada secuencia de nucleótidos fue traducida a secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta Translate (ExPASy), verificando que no existe corrimiento del marco de lectura ni codones de paro prematuros que impidan su uso para la expresión de las proteínas de interés (dato no mostrado). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos reveló que la levanasa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP posee una identidad del 99 % con respecto a una proteína que contiene el dominio C-terminal de las GH32 (no especificada cuál) de una cepa de *B. amyloliquefaciens*.

Finalmente, se identificó la secuencia del péptido señal de la levanasa, el cual corresponde a MAAKWPVVILIFLGAFVGLLPNKNHNS. Cabe mencionar que dentro de la secuencia del péptido señal, se encuentra la secuencia WPVVILIFLGAFVGLLP, descrita por Venturi como un dominio α -hélice transmembrana, por lo que es probable que la proteína quede anclada a la membrana celular y su extracción y purificación requieran de pasos adicionales (Venturi, 2016) (Fig 18).

GH32 C-terminal domain-containing protein [*Bacillus amyloliquefaciens*]

Sequence ID: [WP_174737723.1](#) Length: 518 Number of Matches: 1

[See 5 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 5 to 518 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1060 bits(2740)	0.0	Compositional matrix adjust.	510/514(99%)	511/514(99%)	0/514(0%)
Query 1		MAAKWPVVILIFLGAFVGLLPNKNHNS	SDTNTTEHKKDYRAAYHFTTPD	KWKNDPQKPI	60
Sbjct 5		..R.....	64
Query 61		FFEGKYHYYYLYNRDYPNGNGTEWRHAVSEDLVHWTDEGTAIPKYTNENGGDIWSGSVVID			120
Sbjct 65		124
Query 121		KHNTAGFGKNALVAVTTQPTAKTKAQEQYLWYSTDKGKFTTSYSDQPVMKNPGTKDTRDP			180
Sbjct 125		184
Query 181		KVIWDEQDDKWMAMAEGEKIGFYESPDLKNWYTTGGFITQQIGLVECPDLYMMRADDGT			240
Sbjct 185		244
Query 241		AKWVLGVSANGKPAGKPNYAYWTGNFDGKEFTADQEEPQLWDYGFWDWYGGVTFEDGNSE			300
Sbjct 245	A.....	304
Query 301		DPLTKRYALAWMNNWDYPNETPTLKNGFNGTDSIVREIRLQQDGGTYSVSEPVVEALNQ			360
Sbjct 305		364
Query 361		LTSSSTDSIEHKQVNSSETLPKGDYQLDMDIAWSDIKNAGVRLRESADQSRHIDVGISA			420
Sbjct 365	G.....	424
Query 421		EDGYAYVNRSFTDQPKTGAYAESKAPFDGNKGRVHLKILVDKTSIEVFADDGKTVLTNE			480
Sbjct 425		484
Query 481		VFPKHEDQGITLFSEGGSAFQHIEMKHLGSIHA	514		
Sbjct 485	S	518		

Fig 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la levanasa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP y *B. amyloliquefaciens*. En los recuadros verdes se resaltan los motivos conservados característicos de las GH32, los cuales contienen los aminoácidos de la triada catalítica responsables de la catálisis: **D, D, E**. En el recuadro azul se resalta la secuencia del péptido señal.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la inulinasa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP posee una identidad del 99 % con respecto a una sacarosa-6-fosfato hidrolasa de *B. amyloliquefaciens*, cuya función es la eliminación del residuo β -D-fructofuranósido no reductor de los β -D-fructofuranósidos, incluida

la sacarosa. Las secuencias de aminoácidos alineadas en Blastp para esta proteína han resultado ser muy variables entre ellas (dato no mostrado), por lo que los dos aminoácidos que no coinciden podrían tratarse de variaciones existentes de manera natural entre cepa y cepa. Finalmente, no se identificó péptido señal para esta proteína, por lo que se espera que la proteína quede alojada dentro de la célula (Fig 19).

sucrose-6-phosphate hydrolase [*Bacillus amyloliquefaciens*]

Sequence ID: [WP_174737102.1](#) Length: 489 Number of Matches: 1

[See 5 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 489 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1016 bits(2627)	0.0	Compositional matrix adjust.	487/489(99%)	487/489(99%)	0/489(0%)
Query 1		MDRIQQAEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWINDPNGLIQFKGEYHVFFQHPYDEH			60
Sbjct 1				60
Query 61		WGPMHWGHVSKDLIHWEHLPVALAPGDAFDQSGCFSGSAVDDHGRLALIYTGHNIDQE			120
Sbjct 61	E.....			120
Query 121		KDLFYQTQNIAVSQDGTVFEKLQKNPVAEPPEDSARHFRDPIVVKHRDVWYMVIGNSSK			180
Sbjct 121	T.....			180
Query 181		ENVGRVLYRSPDLRDWEYAGVLAQSDGNLGYMTECPDFEFELGGKHVLLISPQIEADGD			240
Sbjct 181				240
Query 241		SYQNLHQYGLIGDYHDETNIKFTHGAFKELDHGHDFYAVQTLDDKGRRIAIGWMDMWES			300
Sbjct 241				300
Query 301		EMPTKADGWCAGALTLPRELTLRDDHKLLMNPVEETKQLRKMEYRECAGRSVSGSYLTKTS			360
Sbjct 301				360
Query 361		EDLLEVRVVFINDSDAETAGFKIRGLDEEELVLTYNLTDKKLTLDC TKMGAKDGVRRV			420
Sbjct 361				420
Query 421		QTD TNGKLALRIFIDRSSIEVFANHG ETTM TSRIYPNEGR LGIELFSEK GAVKVEEFTYW			480
Sbjct 421				480
Query 481		TLKDIWKRS			489
Sbjct 481				489

Fig 19. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la inulinasa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP y *B. amyloliquefaciens*. En los recuadros verdes se resaltan los motivos conservados característicos de las GH32, los cuales contienen los aminoácidos de la triada catalítica responsables de la catálisis: **D, D, E**.

Por último, el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la levansacarasa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP posee una identidad del 99 % con respecto a una glicosilhidrolasa de la familia GH68 (no especificada cuál) de una bacteria del grupo de *B. amyloliquefaciens*. Finalmente, se identificó la secuencia del péptido señal, la cual corresponde a MNIKKIAKRATVLTFTTALLAGGATQAF A, por lo que es probable que la proteína sea extracelular (Fig 20).

MULTISPECIES: glycoside hydrolase family 68 protein [Bacillus amyloliquefaciens group]

Sequence ID: [WP_025650097.1](#) Length: 473 Number of Matches: 1

[See 5 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 473 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
970 bits(2508)	0.0	Compositional matrix adjust.	470/473(99%)	471/473(99%)	0/473(0%)
Query 1		MNIKKIAKRATVLTFTTALLAGGATQAF	KENTQKPYKETYGVSHITRHDMLQIPKQQS		60
Sbjct 1	F.....		60
Query 61		EKYQVPQFDQSTIKNIESAKGLDVWDSWFL	QNADGTVAEYNGYHVVFALAGSPKADDDTS		120
Sbjct 61			120
Query 121		IYMFYQKVGDNSIDSWKNAGRVPKDSDFNANDEILKEQTQEWSGSATFTSDGKIRLFYT			180
Sbjct 121	D.....			180
Query 181		DFSGKHGKQSLTTAQVNVSKSDDTFKINGVEDHKTIFDGDGKTYQNVOQFIDEGNYS			240
Sbjct 181	L.....			240
Query 241		DNHTLRDPHYVEDKGHKYLVFEANTGTENGYQGEESLFNKAYYGGSTNFFRKESQK			300
Sbjct 241				300
Query 301		AKKRDAELANGALGMVELNDDYTLKKVMKPLITSNTVTIEIERANFKMNGKWLFTDSR			360
Sbjct 301				360
Query 361		GSKMTIDGINSNDIYMLGYVSNLSLTPYKPLNKTGLVLQGLDPNDVTFTYSHFAVPQAK			420
Sbjct 361				420
Query 421		GNNVVITSYMTNRGFFEDKKATFAPSFLMNIKGKKTSSVVKNSILEQQQLTVNN			473
Sbjct 421				473

Fig 20. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la levansacarasa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP y una bacteria del grupo *B. amyloliquefaciens*. En los recuadros verdes se resaltan los motivos conservados característicos de las GH68, los cuales contienen los aminoácidos de la triada catalítica responsables de la catálisis: **D, D, E**. En el recuadro azul se resalta la secuencia del péptido señal.

7.6. Subclonación de los genes de interés en pET28b(+)

La transformación de *E. coli* DH5 α con las construcciones pET28b::LeV, pET28b::InU y pET28b::LvS resultó en un crecimiento incontable de colonias por μ g de pDNA. La electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión enzimática del plásmido extraído y purificado de la colonia transformante seleccionada para la construcción pET28b::LeV muestra una banda de un tamaño aproximado de 1545 pb correspondiente al gen de la levanasa y una banda de un tamaño aproximado de 5368 pb correspondiente al vector pET28b(+). Del mismo modo, la electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión enzimática del plásmido extraído y purificado de la colonia transformante seleccionada para las construcciones pET28b::InU y pET28b::LvS, muestran en ambos casos que las colonias contienen el inserto esperado al observarse bandas de un tamaño aproximado de 1470 pb y 1422 pb correspondientes a los genes de la inulinasa y levansacarasa,

respectivamente y las bandas de 5368 pb correspondientes al vector pET28b(+). Estos resultados sugieren que las colonias transformantes seleccionadas con las construcciones pET28::LeV, pET28::InU y pET28::LvS son viables para la expresión (Fig 21).

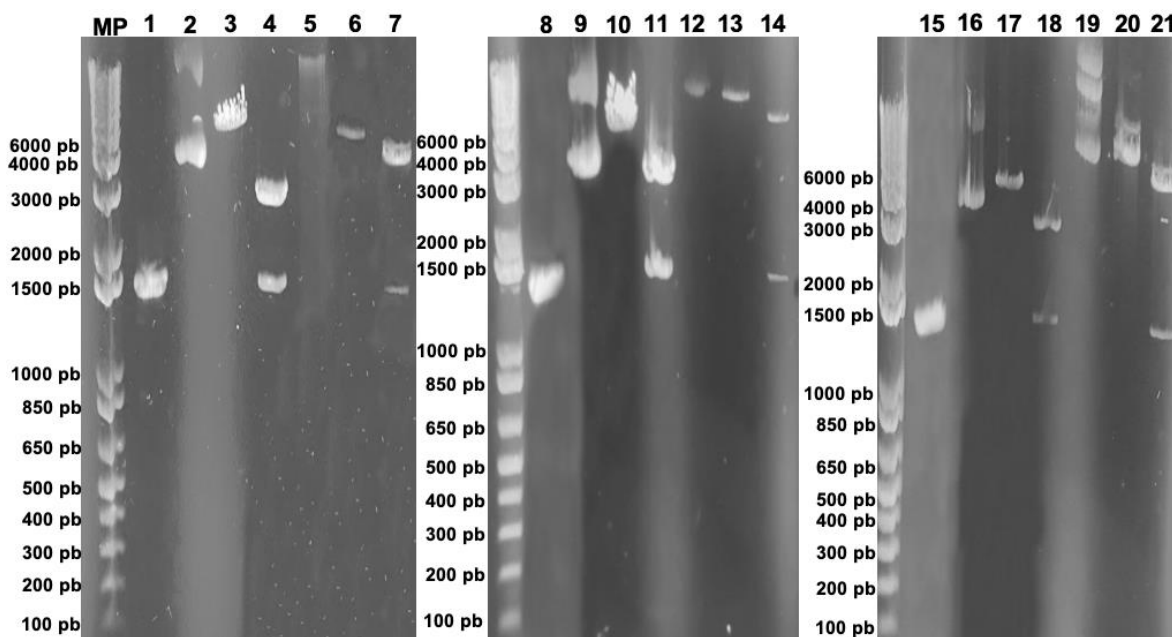


Fig 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del proceso de amplificación, clonación y subclonación de los genes de interés. Se muestra la amplificación del gen de levansasa (1), construcción pGEMt::LeV (2), construcción pGEMt::LeV linealizada (3), digestión de la construcción pGEMt::LeV (4), construcción pET28b(+):LeV (5), construcción pET28b(+):LeV linealizada (6), digestión de la construcción pET28b(+):LeV (7), amplificación del gen de inulinasa (8), construcción pGEMt::InU (9), construcción pGEMt::InU linealizada (10), digestión de la construcción pGEMt::InU (11), construcción pET28b(+):InU (12), construcción pET28b(+):InU linealizada (13), digestión de la construcción pET28b(+):InU (14), amplificación del gen de levansacarasa (15), construcción pGEMt::LvS (16), construcción pGEMt::LvS linealizada (17), digestión de la construcción pGEMt::LvS (18), construcción pET28b(+):LvS (19), construcción pET28b(+):LvS linealizada (20), digestión de la construcción pET28b(+):LvS (21).

7.7. Inducción de la expresión y comprobación de la actividad enzimática

Una vez que se comprobó que las colonias aisladas contenían la construcción óptima para la expresión, esta se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el apartado 7.7.2, resultando en un aumento de la densidad óptica O.D.₆₀₀ a 0.841, 0.907 y 0.950 para la inducción de los genes de levansasa, inulinasa y levansacarasa, respectivamente. Se realizaron SDS-PAGE de la proteína celular total, del sobrenadante del cultivo, del botón de restos celulares y de los extractos crudos recombinantes obtenidos tras la disrupción celular mediante el proceso de

sonicación para comprobar que la inducción de la proteína de interés fue exitosa, además de la proteína recombinante purificada mediante IMAC (excepto la levansacarasa) (Fig 22).

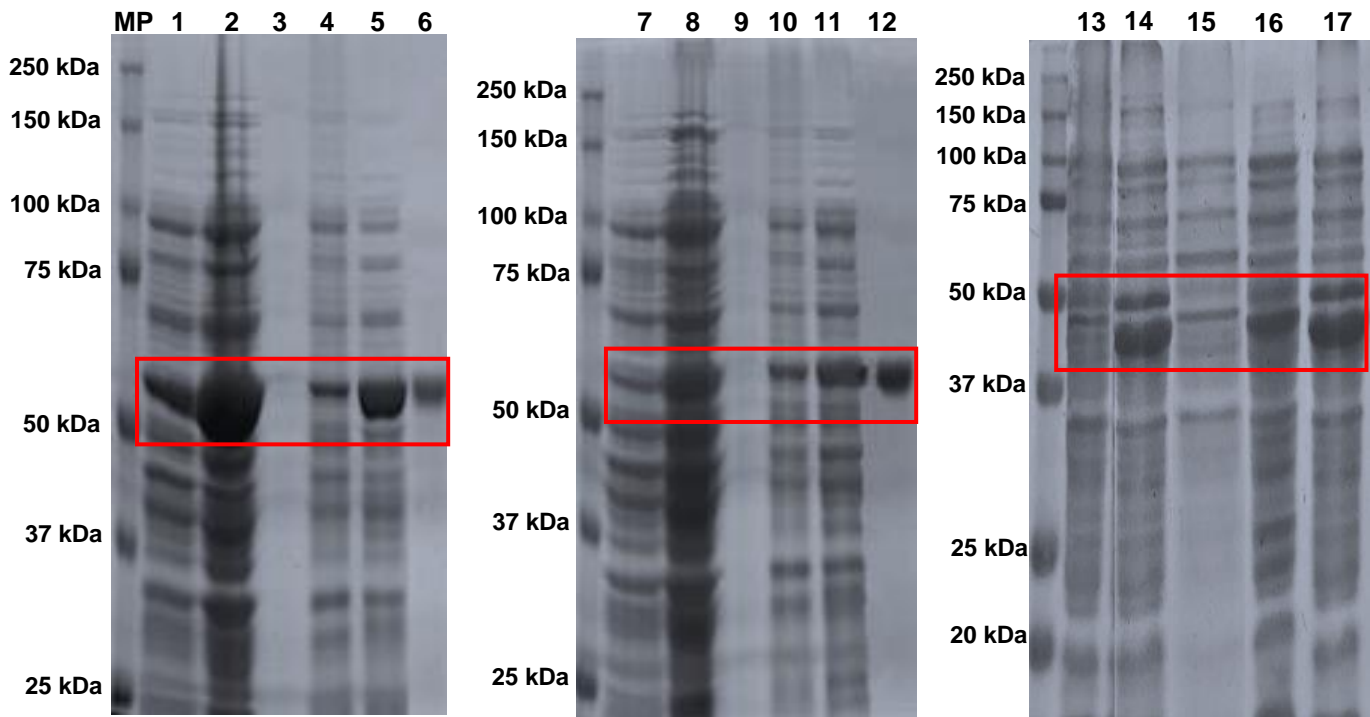


Fig 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% de la inducción de los genes de inulinasa, levansucrase y levansacarasa (concentración de proteína: 50-100 µg). La imagen muestra la migración del marcador de peso molecular (MP), la proteína celular total de un cultivo sin inducción del gen de inulinasa (1), proteína celular total de un cultivo con inducción del gen de inulinasa (2), sobrenadante del cultivo de inducción del gen de inulinasa (3), botón de restos celulares post-lisis de la inducción del gen de inulinasa (4), extracto crudo recombinante de la inducción del gen de inulinasa (5), inulinasa pura (6), proteína celular total de un cultivo sin inducción del gen de levansucrase (7), proteína celular total de un cultivo con inducción del gen de levansucrase (8), sobrenadante del cultivo de inducción del gen de levansucrase (9), pellet de restos celulares post-lisis de la inducción del gen de levansucrase (10), extracto crudo recombinante de la inducción del gen de levansucrase (11), levansucrase pura (12) proteína celular total de un cultivo sin inducción del gen de levansacarasa (13), proteína celular total de un cultivo con 4 horas de inducción del gen de levansacarasa (14), sobrenadante del cultivo de inducción del gen de levansacarasa (15), botón de restos celulares post-lisis de la inducción del gen de levansacarasa (16), extracto crudo recombinante de la inducción del gen de levansacarasa (17).

Como se puede observar en la figura 22, la inducción de las tres proteínas, inulinasa, levansucrase y levansacarasa, fueron exitosas observándose una banda de mayor densidad para los cultivos inducidos al compararlos con el control sin inducción. Cabe mencionar que a pesar de que tanto la levansucrase como la

levansacarasa poseen secuencia de péptido señal, estas parecen estar retenidas en el interior de la célula y no son exportadas.

De acuerdo con lo observado en el gel, cada proteína inducida posee un tamaño aproximado al esperado: la inulinasa posee un tamaño aproximado de 56 kDa, la levanasa de 58 kDa y la levansacarasa de 45 – 48 kDa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores para el género *Bacillus*, habiendo evidencia de inulinasas de pesos moleculares que varían entre 45 – 58 kDa, siendo la de *B. polymyxa* la más cercana con 58 kDa (Kato *et al.*, 1999; Belamri *et al.*, 1994; Zhrebtsov *et al.*, 2002 y Kwon *et al.*, 2003).

De manera similar, las levanasas reportadas para el género *Bacillus* poseen un peso molecular entre 56 y 135 kDa, siendo la de *B. licheniformis* la más cercana con un peso molecular de 56 kDa (Porrás-Dominguez *et al.*, 2014 y Jensen *et al.*, 2016).

Finalmente, las levansacarasas del género *Bacillus* reportadas hasta el momento poseen un peso molecular de 52 – 53 kDa, siendo un poco más grandes que la que se reporta en este estudio. Sin embargo, para otros géneros como lo son *Erwinia* y *Pseudomonas* se han reportado levansacarasas de entre 45 – 46 kDa respectivamente (Geier, *et al.*, 1993; Hettwer *et al.*, 1995; Euzenat, *et al.*, 1998 y Homann *et al.*, 2007) (Tablas 4, 5 y 6).

La comprobación de la actividad enzimática se realizó como se describe en el apartado 7.7.4 mediante ensayo de DNS y TLC. Los ensayos de DNS permitieron determinar la liberación de azúcares reductores (fructosa y glucosa) debido a la hidrólisis de los sustratos, lo cual a su vez nos permitió calcular la actividad enzimática de cada enzima frente a cada sustrato (tabla 11).

Tabla 11. Actividad enzimática (U/ mg prot) de la levanasa, inulinasa y levansacarasa frente a los cuatro sustratos probados.

	Sacarosa	Levana	Inulina	Agavina
Levanasa (pH 5)	0.13 ± 0.07	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.06	0.11 ± 0.08
Inulinasa (pH 8)	0.9 ± 0.08	0.06 ± 0.03	0.61 ± 0.11	0.49 ± 0.19
Levansacarasa (pH 5)	1.36 ± 0.10	0.17 ± 0.16	0.11 ± 0.05	0.13 ± 0.11

Los resultados obtenidos mostraron que las tres enzimas tuvieron actividad frente a los cuatro sustratos probados tanto a pH 5 como a pH 8. Sin embargo, la actividad residual y la generación de los productos de reacción (fructosa y/o glucosa) de algunas de estas reacciones fueron apenas detectables por el método de DNS y no fueron detectadas mediante TLC (la tabla muestra las actividades al pH óptimo de cada enzima, pH 8 para la inulinasa y pH 5 para la levanasa y levansacarasa).

No hubo diferencia significativa en la actividad de la levanasa como exo-hidrolasa a los valores de pH probados. Sin embargo, a pH 5 la reacción frente a la levana como sustrato generó como producto de reacción FOS de diferente grado de polimerización. Estos resultados sugieren que se trata de una endolevanasa, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores para el género *Bacillus* y cuyo valor de pH óptimo varía entre 5.5 y 6 (tabla 5) (Fig 23).

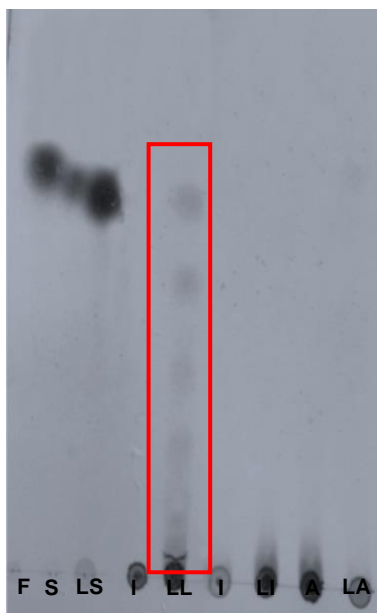


Fig 23. TLC de los productos de las reacciones entre el extracto crudo recombinante de levanasa frente a los distintos sustratos a pH 5 por 20 min de reacción. Se observan las señales de fructosa al 1 % (F), sacarosa al 1 % (S), reacción entre el extracto crudo y sacarosa (LS), levana al 0.1% (L), reacción entre el extracto crudo y levana (LL), inulina al 0.1% (I), reacción entre el extracto crudo e inulina (LI), agavina al 0.1% (A) y reacción entre el extracto crudo y agavina (LA).

Por otro lado, la inulinasa mostró actividad tanto a pH 5 como a pH 8 (siendo mayor su actividad a pH 8). Esta tuvo actividad frente a sacarosa, inulina de achicoria y agavina, y solamente actividad residual frente a levana, sugiriendo una incapacidad de hidrolizar los enlaces β -(2,6). Los productos de reacción corresponden únicamente a glucosa y fructosa, sugiriendo que se trata de una exoinulinasa, al hidrolizar la porción terminal del fructano en su extremo no reductor (Fig 24). Esta enzima, a diferencia de la mayoría de las inulinasas (tabla 5), posee mayor actividad a pH alcalino (pH 8) que a pH ácido (pH 5), lo cual la hace una de las pocas inulinasas bacterianas con esta característica. Otras son las inulinasas de *Marinimicrobium* sp. y *Nocardiopsis* sp. las cuales tienen un pH óptimo de 8 y 9, respectivamente (tabla 4).



Fig 24. TLC de los productos de las reacciones entre el extracto crudo recombinante de inulinasa frente a los distintos sustratos a pH 8 por 20 min de reacción. Se observan las señales de fructosa al 1 % (F), sacarosa al 0.1 % (S), reacción entre el extracto crudo y sacarosa (IS), levana al 0.1 % (L), reacción entre el extracto crudo y levana (IL), inulina al 0.1 % (I), reacción entre el extracto crudo e inulina (II), agavina al 0.1 % (A) y reacción entre el extracto crudo y agavina (IA).

La levansacarasa mostró actividad hidrolítica únicamente frente a la sacarosa como sustrato a pH 5, generando glucosa y fructosa como productos de reacción, también mostró actividad residual con los otros sustratos probados y a pH 8. Finalmente, las reacciones de transfructosilación a las condiciones especificadas en el apartado 7.2.2. tanto del extracto crudo nativo de nuestra cepa de trabajo, *B. amyloliquefaciens* 12GeP, como de el extracto crudo recombinante produjeron FOS de diferentes grados de polimerización tanto a pH 5 como a pH 8, siendo aparentemente mayor a pH 5 (Fig 25).

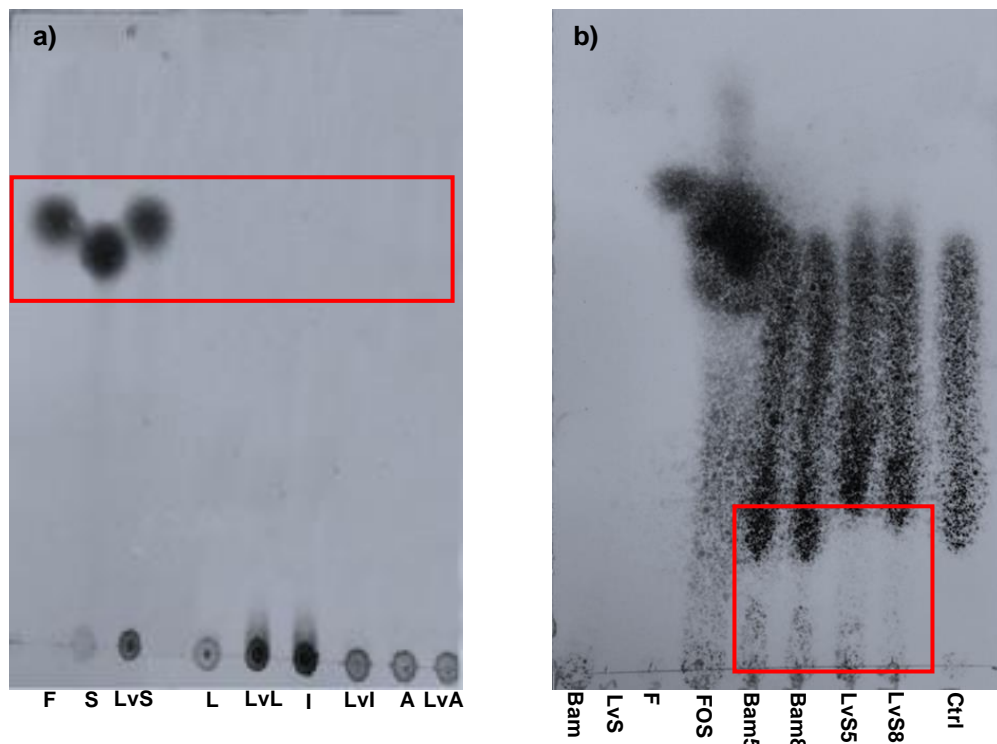


Fig 25. TLC de los productos de reacción de las reacciones entre el extracto crudo recombinante de levansacarasa y del extracto crudo nativo de *B. amyloliquefaciens* 12GeP frente a los distintos sustratos. Se observan las señales de a) fructosa al 1% (F), sacarosa al 0.1% (S), reacción entre el extracto crudo y sacarosa (LvS), levana al 0.1% (L), reacción entre el extracto crudo y levana (LvL), inulina al 0.1% (I), reacción entre el extracto crudo e inulina (Lvl), agavina al 0.1% (A) y reacción entre el extracto crudo y agavina (LvA). b) control de enzima nativa (Bam), control de enzima recombinante (LVS), fructosa al 1% (f), estándar de FOS al 1% (FOS), reacción de la enzima nativa a pH 5 (Bam5), reacción de la enzima nativa a pH 8 (Bam8), reacción de la enzima recombinante a pH 5 (LVS5), reacción de la enzima recombinante a pH 8 (LVS8) y control de medio de reacción sin enzima (Ctrl).

Nuevamente, estos resultados concuerdan con lo especificado por otros autores con respecto al género *Bacillus*, los cuales reportan un pH óptimo de entre 5.5 y 6.5. Cabe mencionar que este experimento se realizó con base en los estudios de Tian y Karboune 2012, en los que realizaron reacciones de transfructosilación con la levansacarasa de *B. amyloliquefaciens* utilizando sacarosa a una concentración de 1 M y permitiendo que la reacción se lleve a cabo únicamente por 20 min. Bajo estas condiciones, ellos reportan la generación de productos como 1-kestosa, neokestosa, blastosa y 6-kestosa, por lo que podríamos esperar que los productos obtenidos en este experimento sean los mismos o similares. Sin embargo, para poder identificar los productos obtenidos por nuestra enzima, se requiere del uso de otras técnicas de identificación y cuantificación como lo es el HPLC, además de

realizar otros estudios en los que se determine el tiempo óptimo de reacción, así como las condiciones de pH y temperatura óptimas (Tian y Karboune, 2012).

También hay que mencionar que debido a que se desconoce si el extracto crudo nativo contiene solo una o las tres enzimas de interés, no es posible comparar la actividad enzimática de este con respecto a las actividades enzimáticas de los extractos crudos recombinantes, ya que en el extracto crudo nativo podrían estar trabajando de manera conjunta dos o tres enzimas para degradar los sustratos probados.

8. Conclusiones

El estudio del genoma de *B. amyloliquefaciens* permitió identificar tres genes que están implicados en la degradación de agavina, permitiéndole utilizarla como única fuente de carbono. Estos son los genes que codifican para una levanasa, una inulinasa y una levansacarasa. Además, dicho estudio, así como la rectificación del análisis de la secuencia del rRNA 16S de la cepa de trabajo identificada como *B. amyloliquefaciens* 12GeP (dato no mostrado en este trabajo), nos permitió concluir que la cepa de trabajo corresponde a *B. velezensis* y no a *B. amyloliquefaciens*.

Se logró conocer la secuencia exacta de los genes que codifican para la levanasa, inulinasa y levansacarasa de nuestra cepa de trabajo, mediante su clonación en pGEMt easy vector y su secuenciación. Se produjo de manera recombinante la levanasa, la inulinasa y la levansacarasa y todas fueron analizadas para presentar su actividad frente a sacarosa, levana, inulina y agavina. La levanasa posee actividad endo- frente a la levana a pH 5, generando FOS de distintos grados de polimerización. La inulinasa posee actividad a pH 8, siendo una de las pocas inulinasas bacterias alcalinas reportadas hasta el momento. La inulinasa posee actividad exo- frente a sacarosa, inulina y agavina, generando únicamente fructosa, glucosa y/o sacarosa como productos de reacción. La levansacarasa posee tanto actividad hidrolítica como fructosiltransferasa a pH 5, utilizando sacarosa como

sustrato. La reacción de transfructosilación genera FOS de distintos grados de polimerización.

Al comparar con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación, los cuales mostraron dos proteínas de diferentes pesos moleculares, la proteína de menor peso molecular reportada previamente por nuestro grupo de investigación fue de 32 kDa la cual podría corresponder a la levansacarasa cuyo peso molecular determinado en este trabajo corresponde a 45-48 kDa. La otra proteína determinada previamente por nuestro laboratorio posee un peso molecular de entre 110-220 kDa, la cual podría corresponder a una oligomerización de la levansacarasa, la cual se ha reportado que tiene la capacidad de formar filamentos.

Con este estudio concluimos que la hidrólisis completa de la agavina se podría deber a la acción conjunta de las tres enzimas: La levansacarasa hidroliza los enlaces β -(2,6) que la inulinasa no puede hidrolizar, generando FOS de distintos grados de polimerización. La inulinasa por otro lado, hidroliza los enlaces β -(2,1) de los extremos no reductores de la molécula, generando glucosa, fructosa y/o sacarosa. Finalmente, los residuos de sacarosa son hidrolizados por la levansacarasa.

9. Perspectivas

Purificar cada enzima para caracterizarlas, determinando las condiciones óptimas de pH y temperatura de reacción para cada una, así como sus parámetros cinéticos, estabilidad y especificidad de sustrato.

Determinar las condiciones óptimas y tiempo de reacción para la generación de FOS mediante las reacciones de transfructosilación utilizando a la levansacarasa obtenida, así como la caracterización de los productos generados en dichas reacciones para evaluar los posibles usos de estos.

Estudio de la actividad de estas enzimas aplicando mutagénesis dirigida para el mejoramiento de su eficiencia catalítica.

Referencias

- Abdel, A., Gamal, A., Helmy, W., y Esawy, M. (2012). Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate polymers*. 89, 314-322.
- Allais, J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C., y Baratti, J. (1986). Isolation and characterization of bacterial strains with inulinase activity, *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1086–1090.
- Angel, S., Kavitha, C., Vidyadharani, G., Roy, P., y Dhandapani, R. (2012). Isolation of inulinase producing bacteria from sugarcane soil, *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 3, 320–326.
- Ayyachamy, M., Khelawan, K., Pillay, D., Permaul, K., y Singh, S. (2007). Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation, *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 439–444.
- Azhar, M., Natalia, D., Syukur, S., y Jamsari, V. (2015). Gene fragments that encodes inulin hydrolysis enzyme from genomic *Bacillus licheniformis*: isolation by PCR technique using new primers, *Int. J. Biol. Chem.* 9, 59–69.
- Bautista, J., García, L., Barboza, J., y Parra, L. (2001). El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta universitaria*, 11(2), 26-34.
- Belamri, M., Sassi, A., Savart, M., Tantaoui-Elaraki, A., y Cottin, P. (1994). Purification and properties of an extracellular inulinase like β -fructosidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 410–413.
- Bezzate, S., Aymerich, S., Chambert, R., Czarnes, S., Berge, O. and Heulin, T. (2000) Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ Microbiol.* 2, 333–342
- Castro, A., y Guerrero, J. (2013). El agave y sus productos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 7-2, 53-61.
- Chen, L., Gu, W., Xu, H., Yang, G., Shan, X., Chen, G., Kang, Y., Wang, C., y Qian, A. (2018). Comparative genome analysis of *Bacillus velezensis* reveals a potential for degrading lignocellulosic biomass. *3 Biotech*, 252(8), 1-5.

- Cho, Y., y Yun, J. (2002). Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5, *Process Biochem.* 37, 1325–1331.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M., y Rajamohan, N. (2011). Application of statistical design for the production of inulinase by *Streptomyces* sp. using pressmud, *Front. Chem. Sci. Eng.* 5, 463–470.
- Drent, W., y Gottschal, J. (1991). Fermentation of inulin by a new strain of *Clostridium thermoautotrophicum* isolated from dahlia tubers, *FEMS Microbiol. Lett.* 78, 285–292.
- Domínguez, M., González, M., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S., y Pérez, E. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y Ciencia*, 16(41), 53-62.
- Efstathiou, I., Reysset, G., y Truffaut, N. (1986). A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 143–149.
- Elyachioui, M., Hornez, J., y Talliez, R. (1992). General properties of extracellular bacterial inulinase, *J. Appl. Bacteriol.* 73, 514–519.
- Esawy, M., Ahmed, E., Helmy, W., Mansour, N., Senousy, W., y Safty, E. (2011). Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. *Carbohydrate polymers* 86, 823-830.
- Euzenat, O., Guibert, A., y Combes, D. (1998). Production and purification of *Bacillus subtilis* C4 levansucrase, kinetic characterization of the enzyme. *Annals New York Academy of Sciences*, 864, 288-294.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H., y Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form and “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in microbiology*, 8(22), 1-15.
- Gao, W., Bao, Y., Liu, Y., Zhang, X., y Wang, J. (2009). An, Characterization of a thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157, 498–506.
- Gao, J., Xu, Y., Yang, H., Xu, H., Xue, F., Li, S., y Feng, X. (2014). Gene cloning, expression and characterization of an exoinulinase from *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 1419–1430.

- García, A., y Galván, R. (1995). Riqueza de las familias *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56, 7-24.
- García, C. (2013). Selección y caracterización de cepas fermentadoras para su aplicación en la producción de bioetanol (tesis de licenciatura). *Universidad Nacional Autónoma de México*, México.
- García, E., Méndez, S., y Talavera, D. (2010). El género *Agave spp.* en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial 5*, 109-129.
- Gavrailov, S., y Ivanova, V. (2016). Effects of nitrogen and carbon sources on the production of inulinase from strain *Bacillus sp.* SG113. *ASN*, 3, 68–73.
- Geier, G. and Geider, K.K. (1993) Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire- blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* 42, 387–404.
- González, B. (2018). Purificación y caracterización de una inulinasa proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens* (tesis de licenciatura). *Universidad Nacional Autónoma de México*, México.
- Haraguchi, K., Akita, K., Hayashi, K., y Kubo, N. (1987). Production of β -D-fructofuranosidase by *Arthrobacter globiformis* S64-1, Rep. Natl. Food Res. Inst. 51 (1987) 1–5.
- Hernández, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vázquez, R., Coego, A., Suárez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M., y Chambert, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemistry Journal*, 309, 113-118.
- Hernández, L., Sotolongo, M., Rosaba, Y., Menéndez, C., Ramírez, R., Caballero-Mellado, J. y Arrieta, J. (2000) Structural levansucrase gene (IsdA) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol*, 174, 120–124.
- Hettwer, U., Gross, M. y Rudolph, K. (1995) Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Bacteriol*, 177, 2834–2839.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D. y Seibel, J. (2007) Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic

- studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J*, 407, 189–198.
- Huazano, A., y López, M. (2018). Enzymatic hydrolysis of agavins to generate branched fructooligosaccharides (α -FOS). *Appl biochem biotechnol*, 184, 25-34. DOI: 10.1007/s12010-017-2526-0
- Huerta, S., Larralde, C., y Narváez, J. (2014). Application of agave subproducts for production of microbial inulinases. *Revista Bio Ciencias*, 3(1), 4-16.
- Huitron, C., Pérez, R., Sánchez, A., Lappe, P., y Zavaleta, L. (2008). Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes. *Journal of Environmental Biology*, 29(1), 37-41.
- Igarashi, T., Takahashi, M., Yamamoto, A., Etoh, Y., y Takamori, K. (1987). Purification and characterization of levanase from *Actinomyces viscosus* ATCC 19246. *Infect Immun* 55:3001–3005
- Iñiguez, G., Díaz, R., Sanjuan, R., Anzaldo, J., y Rowell, R. (2001). Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. *Bioresource Technology*, 77, 101-108.
- Janer, C., Rohr, L., Pelaez, C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T., y Meile, T. (2004). Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 279–285.
- Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Tkaczuk, K., y Bielecki, S. (2011). Biosynthesis, purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29.1, *Process Biochem.* 46, 1963–1972.
- Jensen, S., Diemer M., Lundmark, M., Larsen, F., Blennow, A., Mogensen, H., y Nielsen, T. (2016). Levanase from *Bacillus subtilis* hydrolyses β -2,6 fructosyl bonds in bacterial levans and in grass fructans. *Int J Biol Macromol* 85:514–521
- Kang, S., Chang, Y., Oh, S., y Kim, S. (1998). Purification and properties of an endoinulinase from an *Arthrobacter* sp, *Biotechnol. Lett.* 20, 983–986.
- Kang, S., Lee, S., Lim, L., Jang, K., y Lee, T. (1998). Purification and characterization of a novel levanotriose-producing levanase from *Pseudomonas* strain K-52. *Biotechnol Appl Biochem* 27:159–166

- Kang, E., Lee, S., Lee, J., y Lee, T. (1999). Purification and characterization of a levanbiose-producing levanase from *Pseudomonas* sp. No. 43. *Biotechnol Appl Biochem* 29:263–268
- Kang, H., Seo, M., Seo, E., Kim, D., Chung, S., Kimura, A., Day, D., y Robyt, J. (2005). Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1727, 5–15.
- Kasperowicz, A., Pristas, P., Piknova, M., Javorsky, P., Guczynska, W., Michalowski, T., y Kwiatkowska, E. (2010). Fructanolytic and saccharolytic enzymes of *Treponema zioleckii* strain kT. *Anaerobe* 16:387–392
- Kato, K., Araki, T., Kitamura, T., Morita, N., Mouri, M., y Suzuki, Y. (1999). Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-Fructan Fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch/Stärke*, 51, 253–258.
- Kuzuwa, S., Yokoi, K., Kondo, M., Kimoto, H., Yamakawa, A., Taketo, A., y Kodaira, K. (2012). Properties of the inulinase gene levH1 of *Lactobacillus casei* IAM 1045; cloning, mutational and biochemical characterization. *Gene* 495, 154–162.
- Kwon, H., Jeon, S., You, D., Kim, J., Jeong, Y., Kim, Y., Kim, Y., y Kim, B. (2003). Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa*, *Biotechnol. Lett.* 25, 155–159.
- Kwon, Y., Kim, H., y Choi, Y. (2000). Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase, *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 238–243.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., y Wim Van den, E. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 727–740.
- Laowklom, N., Chantanaphan, R., y Pinphanichakarn, P. (2012). Production, purification and characterization of inulinase from a newly isolated *Streptomyces* sp. CP01, *Nat. Resour.* 3, 137–144.
- Li, A., Guo, L., y Lu, W. (2012). Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18 and inulin hydrolysis by the enzyme, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 81–89.

- Liebl, W., Brem, D., y Gotschilch, A. (1998). Analysis for the gene for β -fructosidase (invertase, inulinase) of the thermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 55–64.
- Lim, Y., Kang, S., Sang, S., Lee, J., y Lee, T. (1998) Purification and characterization of a levanase from *Streptomyces* sp. 366L. *J Biotechnol.* 61:33–41
- Lu, W., Li, A., y Guo, Q. (2014). Production of novel alkalitolerant and thermostable inulinase from marine actinomycete *Nocardiosis* sp. DN-K15 and inulin hydrolysis by the enzyme, *Ann. Microbiol.* 64, 441–449.
- Mancilla, N., y López, M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 7832-7839.
- Menéndez, C., Hernández, L., Banguela, A., y País, J. (2004). Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzym Microb Technol*, 34:446–452.
- Müller, S., y Seyfarth, W. (1997). Purification and substrate specificity of an extracellular fructanhydrolase from *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* P 4134, *New Phytol.* 136, 89–96.
- Müller, M., y Steller, J. (1995). Comparative studies of the degradation of grass fructan and inulin by strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus plantarum*, *J. Appl. Bacteriol.* 78, 229–236.
- Muramatsu, K., Onodera, S., Kikuchi, M., y Shiomi, N. (1993). Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 1681–1685.
- Miasnikov AN (1997) Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp. L7. *FEMS Microbiol Lett*, 154:23–28
- Montañez, J., Venegas, J., Vivar, M., y Ramos, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro* 23(3), 199-206.
- Montañez, J., Venegas, J., Bernardino, A., y Ramos, E. (2011). Enzymatic production of high fructose syrup from *Agave tequilana* fructans and its physicochemical characterization. *African Journal of Biotechnology* 10(82), 19137-19143. DOI: 10.5897/AJB11.2704.

- Montañez, J., Victoria, J., Flores, R., y Vivar, M. (2011). Fermentación de los fructanos del *Agave tequilana* Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. *Información tecnológica*, 6(22), 3-13.
- Murakami H, Kuramoto T, Mizutani K, Nakano H, Kitahata S (1992) Purification and some properties of a new levanase from *Bacillus* sp. no. 71. *Biosci Biotechnol Biochem*, 56:608–613.
- Murakami H, Muroi H, Kuramoto T, Tamura Y, Mizutani K, Nakano H, Kitahata S (1990) Purification and some properties of a levanase from *Streptomyces* sp. no. 7-3. *Agric Biol Chem* 54:2247–2255
- Naidoo, K., Ayyachamy, M., Permaul, K., y Singh, S. (2009). Enhanced fructooligosaccharides and inulinase production by a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* KM 24 mutant, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32, 689–695.
- Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Osawa, O., Kanematsu, T. and Uchida, T. (1992). Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Biosci Biotech Biochem.* 56, 1373–1377.
- Olvera, C., Castillo, E., y López, A. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotecnología* 14, 327-346.
- Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. and Olvera, C. (2003) Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J Bacteriol*, 185, 3606–3612.
- Pabst, M.J. (1977) Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infect Immun* 15(2), 518–526.
- Paludan-Müller, C., Gram, L., y Rattray, F. (2002) Purification and characterization of an extracellular fructan β -fructosidase from a *Lactobacillus pentosus* strain isolated from fermented fish, system, *Appl. Microbiol.* 25, 3–20.
- Pérez, G. (2016). Producción y caracterización de una exo-inulinasa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad sobre fructanos de *Agave tequilana* Weber var. Azul (tesis de licenciatura). *Universidad Nacional Autónoma de México*, México.

- Porras, J., Ávila, Á., Rodríguez, M., Miranda, A., Escalante, A., González, R., Olvera, C., y López, A. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochem* 49:783–790
- Priest, F., Goodfellow, M., Shute, L., y Berkeley, R. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International journal of systematic bacteriology*, 1(37), 69-71.
- Quitral, V., Torres, M., Velásquez, M., y Bobadilla, M. (2018). Efecto de la inulina en la saciedad en humanos. *Perspect Nutr Humana*, 20, 79-89.
- Ryan, S., Fitzgerald, G., y Van Sinderen, D., (2005). Transcriptional regulation and characterization of a novel β -fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3475–3482.
- Reddy, K., Deepthi, S., Jayachandra, S., Parameshwar, A., Agsar, D., Bikshapathi, E., y Sulochana, M. (2016). In silico structural analysis for exoinulinases in proteomes of *Streptomyces* sp. using PDB structures as templates. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4, 858–867.
- Ritsema, T., y Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in plant biology*, 6, 223-230.
- Santos, L., Leal, A., Cortés, E., Gutiérrez, U., y Janet, A. (2012). Agave (*Agave* spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds. *Current bioactive compounds*, 8(3), 1-14.
- Schroeder, V., Michalek, S., y Macrina, F. (1989) Biochemical characterization and evaluation of virulence of a fructosyltransferase deficient mutant of *Streptococcus mutans* V403. *Infect Immun* 57, 3560–3569.
- Selvakumar, P., y Pandey, A. (1999). Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*, *Process Biochem.* 34 (1999) 851–855.
- Selvakumar, P., y Pandey, A. (1999). Comparative study on inulinase synthesis by *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus* under submerged fermentation, *Bioresour. Technol.* 69 (1999) 123–127.
- Sharma, A., Kainth, S., y Gill, P. (2006). Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. *J. Food Eng.* 77, 486–491.

- Singh, R., Chauhan, K., y Kennedy, J. (2017). A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications. *International journal of biological macromolecules*, 96, 312-322.
- Singh, R., y Singh, R. (2014). Response surface optimization of endoinulinase production from a cost effective substrate by *Bacillus safensis* AS-08 for hydrolysis of inulin. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 365–372.
- Singh, R., y Singh, R., y Yadav, M. (2013). Molecular and biochemical characterization of a new endoinulinase producing bacterial strain of *Bacillus safensis* AS-08, *Biologia (Bratisl.)* 68, 1028–1033.
- Singh, P., Joseph, J., Goyal, S., Grover, A., y Shukla, P. (2016). Functional analysis of the binding model of microbial inulinases using docking and molecular dynamics simulation. *J. Mol. Model*, 22, 69.
- Song, D.D. and Jacques, N.A. (1999) Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J* 341, 285–291.
- Tian, F., y Karboune, S. (2012). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics, and product characterization. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 82, 71-79.
- Tian, F., Inthanavong, L., y Karboune, S. (2011). Purification and characterization of levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in intra- and extracellular forms useful for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 75(10), 1929-1938. DOI: 10.1271/bbb.110315
- Tieking, M., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. and Gänzel, M.G. (2005) Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66, 655–663.
- Tohamy, E. (2006). Purification and characterization of exoinulinase enzyme from *Streptomyces griseus*, *Pak. J. Biol. Sci.* 9, 911–916.
- Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K., Tsukihara, T., Suzuki, Y. (2003). Gene cloning expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 180–185.

- Uzunova, K., Vassileva, A., Ivanova, V., Spasova, D., Tonkova, A. (2002). Thermostable exo-inulinase production by semicontinuous cultivation of membrane-immobilized *Bacillus* sp. 11 cells, *Process Biochem.* 37, 863–868.
- Van Hijum, S., Szalowska, E., van der Maarel, M., y Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* 150, 621–630.
- Van Hijum, S., van Geel-Schutten, G., Rahaoui, H., van der Maarel, M., y Dijkhuizen, L. (2002) Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol*, 68, 4390–4398.
- Vargas, D. (2015). Caracterización e identificación de cepas degradadoras de agavina (tesis de licenciatura). *Universidad Nacional Autónoma de México*. México.
- Venturi, V. (2016). Sequencing of a set of identified and characterized rice bacterial endophytes. *DOE Joint Genome Institute*, United States. doi:10.25585/1488278.
- Vullo, D., Cotto, C., y Sineriz, F. (1991). Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby), *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2392–2394.
- Warchol, M., Perrin, S., Grill, J., y Schneider, F. (2002). Characterization of a purified β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697, *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 462–467.
- Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., Kato, N. and Tonomura, K. (1992) Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zyomonas mobilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 1335– 1337.
- Yokota, A., Yamauchi, O., y Tomita, F. (1995). Production of inulotriose from inulin by inulin-degrading enzyme from *Streptomyces rochei* E87, *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 330–333.
- Zhang, W., Xu, W., Ni, D., Dai, Q., Guang, C., Zhang, T., y Mu, W. (2019). An overview of levan-degrading enzyme from microbes. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-12.
- Zhang, N., Yang, D., Kendall, J., Borriss, R., Druzhinina, I., Kubicek, C., Shen, Q., y Zhang, R. (2016). Comparative genomic analysis of *Bacillus*

amyloliquefaciens and *Bacillus subtilis* reveals evolutionary traits for adaption to plan-associated habitats. *Frontiers in microbiology*, 7, 1-14.

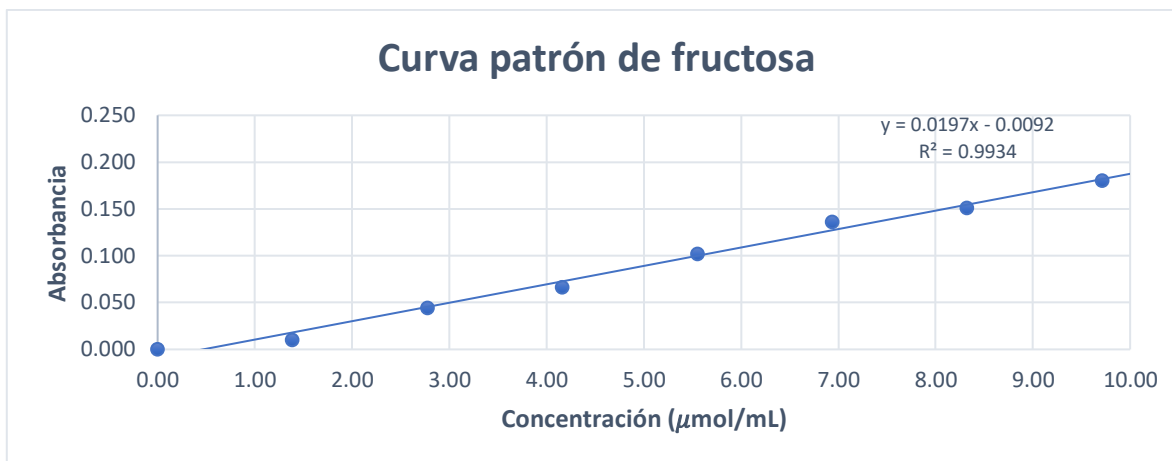
Zhou, J., Gao, Y., Zhang, R., Mo, M., Tang, X., Li, J., Xu, B., Ding, J., y Huang, Z. (2014). A novel low-temperature-active exo-inulinase identified based on molecular-activity strategy from *Sphingobacterium* sp. GN25 isolated from feces of *Grus nigricollis*, *Process Biochem.* 49, 1656–1663.

Zherebtsov, N., Shelamova, S., y Abramova, I. (2002). Biosynthesis of inulinases from *Bacillus* bacteria, *Appl. Biochem. Microbiol.* 38, 544–548.

Anexos



Anexo 1. Curva patrón de BSA utilizada para la cuantificación de proteína total por el método de Bradford.



Anexo 2. Curva patrón de fructosa.

Anexo 3. Equipos utilizados durante el proceso experimental.

Equipo	Marca
Agitador orbital Aros 160	Thermolyne
Baño de agua	IKA
Cámara de electroforesis para DNA	Select Bioproducts
Cámara de lectroforesis para proteínas	BIO-RAD
Centrífuga	Eppendorf
Centrífuga Pro-Research	Centurion Scientific Lid
Columna HisTrap HP 5 mL	General Electric
Espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S	Thermo Scientific
Fuente de poder	Major Science
Incubadora Innova 4330	New Brunswick Scientific
Liofilizadora FD1.0	Heto
Microscopio óptico	Olympus BX40
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Potenciómetro	Beckman
Purificador de Agua MilliQ	Millipore
Sonicador de punta Q500	Fisherbrand
Speed Vac DNA 120	Thermo Scientific
Termociclador	Applied Biosystems
Termomixer	Eppendorf
Ultracongelador ULT390	Gs Laboratory

	cov	pid	1201		1280
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	TCTGTTCTCGCGGGAATAGAGCAACGGGAAGGCTCCAGTGAAAGAGATCCTCCGCGCCCGCCAGCA	:	
2 BamY14	99.7%	27.5%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
3 BamLS60	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
4 BamLH15	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
5 BamLM2303	99.6%	27.3%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAAT-		
6 BamUCMB5113	99.7%	27.6%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
7 BamWS8	99.7%	27.5%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
8 BamNAUB3	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
9 BamYAUB9601Y2	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
10 BamB15	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
11 BamUCMB5033	99.7%	27.6%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
12 BamL2GeP	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
13 BamS141	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
14 BamUCMB5036	99.7%	27.6%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
15 BamDSM7	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
16 BamSRCM12101267	99.7%	27.4%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
17 BamMT45	99.7%	27.5%	TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
consensus/100%			ssusstCuTssCsGGssstAuuGCAsGGsAuGssCCAAAGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
consensus/90%			TCuAAAsCuTssCsGGsGCuAAuGCAsGGCAuGCTCCAAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
consensus/80%			TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		
consensus/70%			TCGAATTCCTCCCGGGAGCTAAGCAACCGGAGGCTCCCAATGAAAGAGATCTTACATTTTACATGCCCAATG		

	cov	pid	1281		1360
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG	3	
2 BamY14	99.7%	27.5%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
3 BamLS60	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
4 BamLH15	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
5 BamLM2303	99.6%	27.3%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
6 BamUCMB5113	99.7%	27.6%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
7 BamWS8	99.7%	27.5%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
8 BamNAUB3	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
9 BamYAUB9601Y2	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
10 BamB15	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
11 BamUCMB5033	99.7%	27.6%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
12 BamL2GeP	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
13 BamS141	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
14 BamUCMB5036	99.7%	27.6%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
15 BamDSM7	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
16 BamSRCM12101267	99.7%	27.4%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
17 BamMT45	99.7%	27.5%	CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
consensus/100%			stss		
consensus/90%			CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
consensus/80%			CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		
consensus/70%			CTTCGGCCCCCAAGGCTCAATCATAAGGATGCTCGAAAGAAACCGTGGATTCCTTTAAACTGAAATAGCCCGTCG		

	cov	pid	1361		1440
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG	4	
2 BamY14	99.7%	27.5%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
3 BamLS60	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
4 BamLH15	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
5 BamLM2303	99.6%	27.3%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
6 BamUCMB5113	99.7%	27.6%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
7 BamWS8	99.7%	27.5%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
8 BamNAUB3	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
9 BamYAUB9601Y2	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
10 BamB15	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
11 BamUCMB5033	99.7%	27.6%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
12 BamL2GeP	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
13 BamS141	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
14 BamUCMB5036	99.7%	27.6%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
15 BamDSM7	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
16 BamSRCM12101267	99.7%	27.4%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
17 BamMT45	99.7%	27.5%	GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
consensus/100%			GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
consensus/90%			GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
consensus/80%			GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		
consensus/70%			GTCTTTCCCCCTCAGGTTTTCGGGAATTAACGAAAGAACTGAAATTTTCCCTTCCGAAAGAACTAAACCCGTCG		

	cov	pid	1441	:	.	.]	1472
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%		-----			
2 BamY14	99.7%	27.5%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTGTCCAT			
3 BamLS60	99.7%	27.4%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTGTCCAT			
4 BamLH15	99.7%	27.4%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTGTCCAT			
5 BamLM2303	99.6%	27.3%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTGTCCAT			
6 BamUCMB5113	99.7%	27.6%		AGAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
7 BamWS8	99.7%	27.5%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
8 BamNAUB3	99.7%	27.4%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
9 BamYAUB9601Y2	99.7%	27.4%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
10 BamB15	99.7%	27.4%		AAAGCTTCTCCGCATGCTGAATTCTATCCAT			
11 BamUCMB5033	99.7%	27.6%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
12 BamI2GeP	99.7%	27.4%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
13 BamS141	99.7%	27.4%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
14 BamUCMB5036	99.7%	27.6%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
15 BamDSM7	99.7%	27.4%		AAGGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
16 BamSRCM12101267	99.7%	27.4%		AAGGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
17 BamMT45	99.7%	27.5%		AAAGCTTCTCCGCCTGCTGAATTCTATCCAT			
consensus/100%						
consensus/90%				AuuGC ^T T ^C s ^T CCG ^C s ^T GC ^T GAA ^T T ^C Tu ^T CCA ^T			
consensus/80%				AAAGC ^T T ^C T ^T CCG ^{CC} T ^G C ^T GAA ^T T ^C Tu ^T CCA ^T			
consensus/70%				AAAGC ^T T ^C T ^T CCG ^{CC} T ^G C ^T GAA ^T T ^C T ^A T ^T CCA ^T			

Anexo 4. Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos del gen que codifica para la inulinasa de 15 cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Thermotoga maritima*.

	cov	pid	241	3	320
1 SbsuttilisLevanase	100.0%	100.0%	CATCCATACCGGCCTCAGTGGGGGCCCTGGCATGGGGCCATGCCACAGCAAAGATTGGTTACAGGGAA-----CA		
2 BamLM2303	72.4%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
3 BamY14	72.4%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
4 BamLS60	72.4%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
5 BamLH15	72.4%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
6 BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
7 BamB15	72.2%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
8 BamNAUB3	72.2%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
9 BamI2GeP	72.2%	35.9%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
10 BamWS-8	72.2%	36.0%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
11 BamUCMB5036	72.2%	35.9%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
12 BamS141	72.2%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
13 BamUCMB5113	72.2%	35.9%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
14 BamUCMB5033	72.2%	35.8%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
15 BamDSM7	72.2%	35.3%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
16 BamSRCM101267	72.2%	35.3%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
17 BamMT45	72.2%	35.3%	AATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
consensus/100%			ATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
consensus/90%			ATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
consensus/80%			ATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		
consensus/70%			ATCGGGATTACCGAATCGGCAACGGCCAGCATGGCGGCCGCCATATCAGGAGCATGGTGCACGGACGGACGAAGG		

	cov	pid	321	4	400
1 SbsuttilisLevanase	100.0%	100.0%	CCATTCCGTCGCGCTTACCGGATGAAAAGGCGCATCTTTTCGGGAGCGCAGTTGAGTAAAAAATACACAGGCG		
2 BamLM2303	72.4%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
3 BamY14	72.4%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
4 BamLS60	72.4%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
5 BamLH15	72.4%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
6 BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
7 BamB15	72.2%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
8 BamNAUB3	72.2%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
9 BamI2GeP	72.2%	35.9%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
10 BamWS-8	72.2%	36.0%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
11 BamUCMB5036	72.2%	35.9%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
12 BamS141	72.2%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
13 BamUCMB5113	72.2%	35.9%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
14 BamUCMB5033	72.2%	35.8%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
15 BamDSM7	72.2%	35.3%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
16 BamSRCM101267	72.2%	35.3%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
17 BamMT45	72.2%	35.3%	CACGGCATTCGAAATCAGCAACGAAACGGCGATTCGGCCGGTCTCTGTCATGATAAATCAACACCGCGG		
consensus/100%			CCATTCCGTCGCGCTTACCGGATGAAAAGGCGCATCTTTTCGGGAGCGCAGTTGAGTAAAAAATACACAGGCG		
consensus/90%			CCATTCCGTCGCGCTTACCGGATGAAAAGGCGCATCTTTTCGGGAGCGCAGTTGAGTAAAAAATACACAGGCG		
consensus/80%			CCATTCCGTCGCGCTTACCGGATGAAAAGGCGCATCTTTTCGGGAGCGCAGTTGAGTAAAAAATACACAGGCG		
consensus/70%			CCATTCCGTCGCGCTTACCGGATGAAAAGGCGCATCTTTTCGGGAGCGCAGTTGAGTAAAAAATACACAGGCG		

	cov	pid	401	480
1 SbsuttilisLevanase	100.0%	100.0%	TTTTCAACAGGCAAAGAGAAGCCCTTGGCCATTTACACAGGA-----TCGGGAGGCCATACAGTCAAAAT	
2 BamLM2303	72.4%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
3 BamY14	72.4%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
4 BamLS60	72.4%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
5 BamLH15	72.4%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
6 BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
7 BamB15	72.2%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
8 BamNAUB3	72.2%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
9 BamI2GeP	72.2%	35.9%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
10 BamWS-8	72.2%	36.0%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
11 BamUCMB5036	72.2%	35.9%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
12 BamS141	72.2%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
13 BamUCMB5113	72.2%	35.9%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
14 BamUCMB5033	72.2%	35.8%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
15 BamDSM7	72.2%	35.3%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
16 BamSRCM101267	72.2%	35.3%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
17 BamMT45	72.2%	35.3%	CTTCGGCAAAA-----CGCCGCGCCCGCACACCGCAGCCGACAGCAGCAAAACAAAGCCCGAAACAAATA	
consensus/100%			TTTTCAACAGGCAAAGAGAAGCCCTTGGCCATTTACACAGGA-----TCGGGAGGCCATACAGTCAAAAT	
consensus/90%			TTTTCAACAGGCAAAGAGAAGCCCTTGGCCATTTACACAGGA-----TCGGGAGGCCATACAGTCAAAAT	
consensus/80%			TTTTCAACAGGCAAAGAGAAGCCCTTGGCCATTTACACAGGA-----TCGGGAGGCCATACAGTCAAAAT	
consensus/70%			TTTTCAACAGGCAAAGAGAAGCCCTTGGCCATTTACACAGGA-----TCGGGAGGCCATACAGTCAAAAT	

	cov	pid	481	560
1 SbsuttilisLevanase	100.0%	100.0%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
2 BamLM2303	72.4%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
3 BamY14	72.4%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
4 BamLS60	72.4%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
5 BamLH15	72.4%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
6 BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
7 BamB15	72.2%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
8 BamNAUB3	72.2%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
9 BamI2GeP	72.2%	35.9%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
10 BamWS-8	72.2%	36.0%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
11 BamUCMB5036	72.2%	35.9%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
12 BamS141	72.2%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
13 BamUCMB5113	72.2%	35.9%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
14 BamUCMB5033	72.2%	35.8%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
15 BamDSM7	72.2%	35.3%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
16 BamSRCM101267	72.2%	35.3%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
17 BamMT45	72.2%	35.3%	TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
consensus/100%			TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
consensus/90%			TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
consensus/80%			TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	
consensus/70%			TTTGGCTACGACCGGATAAAGGAAAACCTTACTTCCATAGGATCGCCCTTGAATAAATCCCGGAACTAAGGA	

	cov	pid	961	0	1040
1 SsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	ACAGACAGCC	CCGGCTATGGT	AGGCGGATGAGCAATTTGGCAATTGCGAATGAGTTCCCACTCCCAAGGAGAG
2 BamLM2303	72.4%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
3 BamY14	72.4%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
4 BamLS60	72.4%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
5 BamLH15	72.4%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
6 BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
7 BamB15	72.2%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
8 BamNAUB3	72.2%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
9 BamI2GeP	72.2%	35.9%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
10 BamWS-8	72.2%	36.0%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
11 BamUCMB5036	72.2%	35.9%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
12 BamS141	72.2%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
13 BamUCMB5113	72.2%	35.9%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
14 BamUCBM5033	72.2%	35.8%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
15 BamDSM7	72.2%	35.3%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
16 BamSRCM101267	72.2%	35.3%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
17 BamMT45	72.2%	35.3%	CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
consensus/100%			CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
consensus/90%			CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
consensus/80%			CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT
consensus/70%			CCGCTCAAAAAC	CTATGCGG	GCATGGATGACAAATTTGGGATTTCCGAAAGAACACCGCACTAAAACACGGCTT

	cov	pid	1041	1	1120
1 SsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	TGCAACCGTCC	TCAGAGAGT	AAAAATGAAACGCTTTCCGAGGGGTTAGAGTGGTCCAAACCCGGTGAAGAG
2 BamLM2303	72.4%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
3 BamY14	72.4%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
4 BamLS60	72.4%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
5 BamLH15	72.4%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
6 BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
7 BamB15	72.2%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
8 BamNAUB3	72.2%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
9 BamI2GeP	72.2%	35.9%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
10 BamWS-8	72.2%	36.0%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
11 BamUCMB5036	72.2%	35.9%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
12 BamS141	72.2%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
13 BamUCMB5113	72.2%	35.9%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
14 BamUCBM5033	72.2%	35.8%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
15 BamDSM7	72.2%	35.3%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
16 BamSRCM101267	72.2%	35.3%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
17 BamMT45	72.2%	35.3%	TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
consensus/100%			TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
consensus/90%			TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
consensus/80%			TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG
consensus/70%			TAAACGGCAC	CGGATCTCT	-----CGTCCGGAAATCCGCTCTCAGCAGC-AGGACCGCGGCACATCCAGCCTTGTCAG

	cov	pid	1121	2	1200
1 SsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	CGGAAACCN	TCGCGAACCT	CAAGAACGGAGAAATCGACCAATCCGCCACACATCTTAATGTTAGCGGGCC
2 BamLM2303	72.4%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
3 BamY14	72.4%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
4 BamLS60	72.4%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
5 BamLH15	72.4%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
6 BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
7 BamB15	72.2%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
8 BamNAUB3	72.2%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
9 BamI2GeP	72.2%	35.9%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
10 BamWS-8	72.2%	36.0%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
11 BamUCMB5036	72.2%	35.9%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
12 BamS141	72.2%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
13 BamUCMB5113	72.2%	35.9%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
14 BamUCBM5033	72.2%	35.8%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
15 BamDSM7	72.2%	35.3%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
16 BamSRCM101267	72.2%	35.3%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
17 BamMT45	72.2%	35.3%	-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
consensus/100%			-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
consensus/90%			-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
consensus/80%			-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA
consensus/70%			-----	AGCCGATG	AAGCACTGA-ACCATTAACCTTCTCAACGACAGCATAGACACAAACAGGTAA

	cov	pid	1201	1280	
1 SsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	ATCGGAGAT	-----TGCCCTGAA	-----ATAAATTCAGAAATTAAGAACGCCGGTTCAGCTGCAGAT
2 BamLM2303	72.4%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
3 BamY14	72.4%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
4 BamLS60	72.4%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
5 BamLH15	72.4%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
6 BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
7 BamB15	72.2%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
8 BamNAUB3	72.2%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
9 BamI2GeP	72.2%	35.9%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
10 BamWS-8	72.2%	36.0%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
11 BamUCMB5036	72.2%	35.9%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
12 BamS141	72.2%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
13 BamUCMB5113	72.2%	35.9%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
14 BamUCBM5033	72.2%	35.8%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
15 BamDSM7	72.2%	35.3%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
16 BamSRCM101267	72.2%	35.3%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
17 BamMT45	72.2%	35.3%	CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
consensus/100%			CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
consensus/90%			CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
consensus/80%			CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG
consensus/70%			CGCTTCAGAGACAC	CGCCGTCNA	AGGTGATCTATCAGCTTGAATCGATTCGCTTCGACATATCAAAATATGCAG

	cov	pid	1601		1680
1	BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	TACACCC	TTAAAAAGG
2	BamLM2303	72.4%	35.8%	ATGGGAAC	GCACCC
3	BamY14	72.4%	35.8%	TTT	ATCCAA
4	BamLS60	72.4%	35.8%	TATGAC	GGC
5	BamLH15	72.4%	35.8%	GGACGAC	CG
6	BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	AAA	TGGC
7	BamB15	72.2%	35.8%	CG	CTG
8	BamNAUB3	72.2%	35.8%		
9	Bam12GeP	72.2%	35.9%		
10	BamWS-8	72.2%	36.0%		
11	BamUCMB5036	72.2%	35.9%		
12	BamS141	72.2%	35.8%		
13	BamUCMB5113	72.2%	35.9%		
14	BamUCBM5033	72.2%	35.8%		
15	BamDSM7	72.2%	35.3%		
16	BamSRCM101267	72.2%	35.3%		
17	BamMT45	72.2%	35.3%		
	consensus/100%				
	consensus/90%				
	consensus/80%				
	consensus/70%				

	cov	pid	1681		1760
1	BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	GGCAGAC	CAAT
2	BamLM2303	72.4%	35.8%	TTGAGGG	GAACA
3	BamY14	72.4%	35.8%	CAAGGG	GAGG
4	BamLS60	72.4%	35.8%	CGGAC	GGC
5	BamLH15	72.4%	35.8%	TTCC	TTAT
6	BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	CTTG	CTT
7	BamB15	72.2%	35.8%	CAGC	TCC
8	BamNAUB3	72.2%	35.8%	GGG	CAGAC
9	Bam12GeP	72.2%	35.9%	CTG	CTG
10	BamWS-8	72.2%	36.0%		
11	BamUCMB5036	72.2%	35.9%		
12	BamS141	72.2%	35.8%		
13	BamUCMB5113	72.2%	35.9%		
14	BamUCBM5033	72.2%	35.8%		
15	BamDSM7	72.2%	35.3%		
16	BamSRCM101267	72.2%	35.3%		
17	BamMT45	72.2%	35.3%		
	consensus/100%				
	consensus/90%				
	consensus/80%				
	consensus/70%				

	cov	pid	1761		1840
1	BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	CTTAA	GAA
2	BamLM2303	72.4%	35.8%	TC	GAT
3	BamY14	72.4%	35.8%	TC	CCA
4	BamLS60	72.4%	35.8%	TTA	AGGA
5	BamLH15	72.4%	35.8%	CGAAA	CGA
6	BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	AGGGG	GGC
7	BamB15	72.2%	35.8%	AGG	AGC
8	BamNAUB3	72.2%	35.8%	AA	CTT
9	Bam12GeP	72.2%	35.9%	CTC	CTC
10	BamWS-8	72.2%	36.0%	CTG	CA
11	BamUCMB5036	72.2%	35.9%	CA	AA
12	BamS141	72.2%	35.8%	AG	AG
13	BamUCMB5113	72.2%	35.9%	AG	AG
14	BamUCBM5033	72.2%	35.8%	AG	AG
15	BamDSM7	72.2%	35.3%	AG	AG
16	BamSRCM101267	72.2%	35.3%	AG	AG
17	BamMT45	72.2%	35.3%	AG	AG
	consensus/100%				
	consensus/90%				
	consensus/80%				
	consensus/70%				

	cov	pid	1841		1920
1	BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	AAAAAC	GGT
2	BamLM2303	72.4%	35.8%	ACCT	GCCT
3	BamY14	72.4%	35.8%	TG	GGAT
4	BamLS60	72.4%	35.8%	GC	GAAG
5	BamLH15	72.4%	35.8%	GC	GAAG
6	BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	GC	GAAG
7	BamB15	72.2%	35.8%	GC	GAAG
8	BamNAUB3	72.2%	35.8%	GC	GAAG
9	Bam12GeP	72.2%	35.9%	GC	GAAG
10	BamWS-8	72.2%	36.0%	GC	GAAG
11	BamUCMB5036	72.2%	35.9%	GC	GAAG
12	BamS141	72.2%	35.8%	GC	GAAG
13	BamUCMB5113	72.2%	35.9%	GC	GAAG
14	BamUCBM5033	72.2%	35.8%	GC	GAAG
15	BamDSM7	72.2%	35.3%	GC	GAAG
16	BamSRCM101267	72.2%	35.3%	GC	GAAG
17	BamMT45	72.2%	35.3%	GC	GAAG
	consensus/100%				
	consensus/90%				
	consensus/80%				
	consensus/70%				

	cov	pid	1921	0	2000
1	BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	CATTGCTGAAACAAAACCCGATAGACCGTTAAATAAAAGTTCATCTGAAACAGAGGCCGAGGGCGATCGCTTTAAAA	
2	BamLM2303	72.4%	35.8%	-----	
3	BamY14	72.4%	35.8%	-----	
4	BamLS60	72.4%	35.8%	-----	
5	BamLH15	72.4%	35.8%	-----	
6	BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	-----	
7	BamB15	72.2%	35.8%	-----	
8	BamNAUB3	72.2%	35.8%	-----	
9	Bam12GeP	72.2%	35.9%	-----	
10	BamWS-8	72.2%	36.0%	-----	
11	BamUCMB5036	72.2%	35.9%	-----	
12	BamS141	72.2%	35.8%	-----	
13	BamUCMB5113	72.2%	35.9%	-----	
14	BamUCBM5033	72.2%	35.8%	-----	
15	BamDSM7	72.2%	35.3%	-----	
16	BamSRCM101267	72.2%	35.3%	-----	
17	BamMT45	72.2%	35.3%	-----	
	consensus/100%			
	consensus/90%			
	consensus/80%			
	consensus/70%			

	cov	pid	2001	2080
1	BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	TCAATTTAGATGATCCGTCATGATGAGGCAAGATTCCCTATTTTCAGAAGGCCCTTTGGCTTGAATGGTGGGAC
2	BamLM2303	72.4%	35.8%	-----
3	BamY14	72.4%	35.8%	-----
4	BamLS60	72.4%	35.8%	-----
5	BamLH15	72.4%	35.8%	-----
6	BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	-----
7	BamB15	72.2%	35.8%	-----
8	BamNAUB3	72.2%	35.8%	-----
9	Bam12GeP	72.2%	35.9%	-----
10	BamWS-8	72.2%	36.0%	-----
11	BamUCMB5036	72.2%	35.9%	-----
12	BamS141	72.2%	35.8%	-----
13	BamUCMB5113	72.2%	35.9%	-----
14	BamUCBM5033	72.2%	35.8%	-----
15	BamDSM7	72.2%	35.3%	-----
16	BamSRCM101267	72.2%	35.3%	-----
17	BamMT45	72.2%	35.3%	-----
	consensus/100%		
	consensus/90%		
	consensus/80%		
	consensus/70%		

	cov	pid	2081	1	2116
1	BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	CGGACTGCTGCTCTTTTCAGAAATCTAACGAAGGAGTCT	
2	BamLM2303	72.4%	35.8%	-----	
3	BamY14	72.4%	35.8%	-----	
4	BamLS60	72.4%	35.8%	-----	
5	BamLH15	72.4%	35.8%	-----	
6	BamYAUB9601-Y2	72.2%	35.8%	-----	
7	BamB15	72.2%	35.8%	-----	
8	BamNAUB3	72.2%	35.8%	-----	
9	Bam12GeP	72.2%	35.9%	-----	
10	BamWS-8	72.2%	36.0%	-----	
11	BamUCMB5036	72.2%	35.9%	-----	
12	BamS141	72.2%	35.8%	-----	
13	BamUCMB5113	72.2%	35.9%	-----	
14	BamUCBM5033	72.2%	35.8%	-----	
15	BamDSM7	72.2%	35.3%	-----	
16	BamSRCM101267	72.2%	35.3%	-----	
17	BamMT45	72.2%	35.3%	-----	
	consensus/100%			
	consensus/90%			
	consensus/80%			
	consensus/70%			

Anexo 5. Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos del gen que codifica para la levanasa de 15 cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*.

	cov	pid	561	6	640
1 SbsuttilisLevansucrase	100.0%	100.0%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAACTCCCAAGTAACTTACAGCATCAGACAGCCCTTGAACCTCAACGGGGA		
2 BamNAUB3	99.5%	82.3%	CACATTCGGTAAACAAAGCCGACAAAGCCACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
3 BamYAUB9601-Y2	99.5%	82.4%	CACATTCGGTAAACAAAGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
4 BamL2GeP	99.5%	83.0%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
5 BamLS60	99.5%	83.0%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
6 BamLH15	99.5%	83.0%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
7 BamY14	99.5%	82.8%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
8 BamLM2303	99.5%	83.0%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
9 BamWS-8	99.5%	82.1%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
10 BamUCMB5036	99.5%	82.4%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
11 BamS141	99.5%	82.4%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
12 BamUCMB5113	99.5%	82.2%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
13 BamUCBM5033	99.5%	82.4%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
14 BamDSM7	99.5%	82.0%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
15 BamSRCM101267	99.5%	82.0%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
16 BamMT45	99.5%	82.0%	AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
consensus/100%			sACATTCGGsAAACAAAGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
consensus/90%			sACATTCGGsAAACAAAGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
consensus/80%			sACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		
consensus/70%			AACATTCGGCAACCAACGCCGACAAAGCCGACAGGTAATTTGCAAACTGATGACACGGTCAAGCTCAACGGAGG		

	cov	pid	641	7	720
1 SbsuttilisLevansucrase	100.0%	100.0%	GAGGATTAATAAATCAATCTTTGACCGTGACGGAAAAACGATCAAAATTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTACAG		
2 BamNAUB3	99.5%	82.3%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATACCAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
3 BamYAUB9601-Y2	99.5%	82.4%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
4 BamL2GeP	99.5%	83.0%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
5 BamLS60	99.5%	83.0%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
6 BamLH15	99.5%	83.0%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
7 BamY14	99.5%	82.8%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
8 BamLM2303	99.5%	83.0%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
9 BamWS-8	99.5%	82.1%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
10 BamUCMB5036	99.5%	82.4%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
11 BamS141	99.5%	82.4%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
12 BamUCMB5113	99.5%	82.2%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
13 BamUCBM5033	99.5%	82.4%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
14 BamDSM7	99.5%	82.0%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
15 BamSRCM101267	99.5%	82.0%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
16 BamMT45	99.5%	82.0%	GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
consensus/100%			GAAGTCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
consensus/90%			GAAGTCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
consensus/80%			GAAGTCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		
consensus/70%			GAGATCTATAAAGCAATTTTGACCGTGACGGAAAAACATCAAAACTTCAGCAGTTTCATCGATGAAGGCACTATAC		

	cov	pid	721	8	800
1 SbsuttilisLevansucrase	100.0%	100.0%	CTCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
2 BamNAUB3	99.5%	82.3%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
3 BamYAUB9601-Y2	99.5%	82.4%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
4 BamL2GeP	99.5%	83.0%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
5 BamLS60	99.5%	83.0%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
6 BamLH15	99.5%	83.0%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
7 BamY14	99.5%	82.8%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
8 BamLM2303	99.5%	83.0%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
9 BamWS-8	99.5%	82.1%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
10 BamUCMB5036	99.5%	82.4%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
11 BamS141	99.5%	82.4%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
12 BamUCMB5113	99.5%	82.2%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
13 BamUCBM5033	99.5%	82.4%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
14 BamDSM7	99.5%	82.0%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
15 BamSRCM101267	99.5%	82.0%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
16 BamMT45	99.5%	82.0%	ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
consensus/100%			sTCsGGCAACCCsATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
consensus/90%			sTCsGGCAACCCsATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
consensus/80%			ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		
consensus/70%			ATCCGGCAACCCATCCCGAGAGACCCCTCCCTCCTGAGAGATAAGGCCCAAAATCTTACATTTGAGCAACAC		

	cov	pid	801	880	
1 SbsuttilisLevansucrase	100.0%	100.0%	CTGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
2 BamNAUB3	99.5%	82.3%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
3 BamYAUB9601-Y2	99.5%	82.4%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
4 BamL2GeP	99.5%	83.0%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
5 BamLS60	99.5%	83.0%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
6 BamLH15	99.5%	83.0%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
7 BamY14	99.5%	82.8%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
8 BamLM2303	99.5%	83.0%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
9 BamWS-8	99.5%	82.1%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
10 BamUCMB5036	99.5%	82.4%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
11 BamS141	99.5%	82.4%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
12 BamUCMB5113	99.5%	82.2%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
13 BamUCBM5033	99.5%	82.4%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
14 BamDSM7	99.5%	82.0%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
15 BamSRCM101267	99.5%	82.0%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
16 BamMT45	99.5%	82.0%	CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
consensus/100%			CsGGAAACsGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
consensus/90%			CsGGAAACsGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
consensus/80%			CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		
consensus/70%			CGGAAACGAAATCGGATCCAGGGCAAGAACTTTTAAACAAAGCGTACACGGGGGAGCACAACCTCTCCCGT		

	cov	pid	881	9	960
1 SbsuttilisLevansucrase	100.0%	100.0%	CAAGAAAG	CAAAACCT	CACAAAGCGA
2 BamNAUB3	99.5%	82.3%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
3 BamYAUB9601-Y2	99.5%	82.4%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
4 BamI2GeP	99.5%	83.0%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
5 BamLS60	99.5%	83.0%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
6 BamLH15	99.5%	83.0%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
7 BamY14	99.5%	82.8%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
8 BamLM2303	99.5%	83.0%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
9 BamWS-8	99.5%	82.1%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
10 BamUCMB5036	99.5%	82.4%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
11 BamS141	99.5%	82.4%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
12 BamUCMB5113	99.5%	82.2%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
13 BamUCBM5033	99.5%	82.4%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
14 BamDSM7	99.5%	82.0%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
15 BamSRCM101267	99.5%	82.0%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
16 BamMT45	99.5%	82.0%	AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
consensus/100%			sAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
consensus/90%			AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
consensus/80%			AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC
consensus/70%			AAAGAAAG	CAAGGCCT	CAACAAAGTC

	cov	pid	961	0	1040
1 SbsuttilisLevansucrase	100.0%	100.0%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
2 BamNAUB3	99.5%	82.3%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
3 BamYAUB9601-Y2	99.5%	82.4%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
4 BamI2GeP	99.5%	83.0%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
5 BamLS60	99.5%	83.0%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
6 BamLH15	99.5%	83.0%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
7 BamY14	99.5%	82.8%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
8 BamLM2303	99.5%	83.0%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
9 BamWS-8	99.5%	82.1%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
10 BamUCMB5036	99.5%	82.4%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
11 BamS141	99.5%	82.4%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
12 BamUCMB5113	99.5%	82.2%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
13 BamUCBM5033	99.5%	82.4%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
14 BamDSM7	99.5%	82.0%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
15 BamSRCM101267	99.5%	82.0%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
16 BamMT45	99.5%	82.0%	AAACCA	GAATACAC	CAACCGC
consensus/100%			AAASub	GAATACAC	CAACCGC
consensus/90%			AAASub	GAATACAC	CAACCGC
consensus/80%			AAASub	GAATACAC	CAACCGC
consensus/70%			AAASub	GAATACAC	CAACCGC

	cov	pid	1041	1	1120
1 SbsuttilisLevansucrase	100.0%	100.0%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
2 BamNAUB3	99.5%	82.3%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
3 BamYAUB9601-Y2	99.5%	82.4%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
4 BamI2GeP	99.5%	83.0%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
5 BamLS60	99.5%	83.0%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
6 BamLH15	99.5%	83.0%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
7 BamY14	99.5%	82.8%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
8 BamLM2303	99.5%	83.0%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
9 BamWS-8	99.5%	82.1%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
10 BamUCMB5036	99.5%	82.4%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
11 BamS141	99.5%	82.4%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
12 BamUCMB5113	99.5%	82.2%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
13 BamUCBM5033	99.5%	82.4%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
14 BamDSM7	99.5%	82.0%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
15 BamSRCM101267	99.5%	82.0%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
16 BamMT45	99.5%	82.0%	ACCTTT	CAAAA	GACCGC
consensus/100%			ACCTTT	CAAAA	GACCGC
consensus/90%			ACCTTT	CAAAA	GACCGC
consensus/80%			ACCTTT	CAAAA	GACCGC
consensus/70%			ACCTTT	CAAAA	GACCGC

	cov	pid	1121	2	1200
1 SbsuttilisLevansucrase	100.0%	100.0%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
2 BamNAUB3	99.5%	82.3%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
3 BamYAUB9601-Y2	99.5%	82.4%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
4 BamI2GeP	99.5%	83.0%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
5 BamLS60	99.5%	83.0%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
6 BamLH15	99.5%	83.0%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
7 BamY14	99.5%	82.8%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
8 BamLM2303	99.5%	83.0%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
9 BamWS-8	99.5%	82.1%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
10 BamUCMB5036	99.5%	82.4%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
11 BamS141	99.5%	82.4%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
12 BamUCMB5113	99.5%	82.2%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
13 BamUCBM5033	99.5%	82.4%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
14 BamDSM7	99.5%	82.0%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
15 BamSRCM101267	99.5%	82.0%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
16 BamMT45	99.5%	82.0%	AACGA	TTTCA	GGTGGT
consensus/100%			AAAGA	TTTCA	GGTGGT
consensus/90%			AACGA	TTTCA	GGTGGT
consensus/80%			AACGA	TTTCA	GGTGGT
consensus/70%			AACGA	TTTCA	GGTGGT

	cov	pid	1201		1280
1	100.0%	100.0%	AAAAA	GGATCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
2	99.5%	82.3%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
3	99.5%	82.4%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
4	99.5%	83.0%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
5	99.5%	83.0%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
6	99.5%	83.0%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
7	99.5%	82.8%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
8	99.5%	83.0%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
9	99.5%	82.1%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
10	99.5%	82.4%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
11	99.5%	82.4%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
12	99.5%	82.2%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
13	99.5%	82.4%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
14	99.5%	82.0%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
15	99.5%	82.0%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
16	99.5%	82.0%	GCAAA	GGCTCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
consensus/100%			AAAAA	GGATCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
consensus/90%			AAAAA	GGATCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
consensus/80%			AAAAA	GGATCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC
consensus/70%			AAAAA	GGATCTG	CCAAACGAGTAACTTACCTC

	cov	pid	1281		1360
1	100.0%	100.0%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
2	99.5%	82.3%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
3	99.5%	82.4%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
4	99.5%	83.0%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
5	99.5%	83.0%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
6	99.5%	83.0%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
7	99.5%	82.8%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
8	99.5%	83.0%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
9	99.5%	82.1%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
10	99.5%	82.4%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
11	99.5%	82.4%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
12	99.5%	82.2%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
13	99.5%	82.4%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
14	99.5%	82.0%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
15	99.5%	82.0%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
16	99.5%	82.0%	TGATTC	CACAGC	TTTGC
consensus/100%			TGATTC	CACAGC	TTTGC
consensus/90%			TGATTC	CACAGC	TTTGC
consensus/80%			TGATTC	CACAGC	TTTGC
consensus/70%			TGATTC	CACAGC	TTTGC

	cov	pid	1361		1429
1	100.0%	100.0%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
2	99.5%	82.3%	AAA	AAACAAGAAA	CACTTGG
3	99.5%	82.4%	AAA	AAACAAGAAA	CACTTGG
4	99.5%	83.0%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
5	99.5%	83.0%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
6	99.5%	83.0%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
7	99.5%	82.8%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
8	99.5%	83.0%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
9	99.5%	82.1%	AAA	AAACAAGAAA	CACTTGG
10	99.5%	82.4%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
11	99.5%	82.4%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
12	99.5%	82.2%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
13	99.5%	82.4%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
14	99.5%	82.0%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
15	99.5%	82.0%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
16	99.5%	82.0%	AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
consensus/100%			AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
consensus/90%			AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
consensus/80%			AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG
consensus/70%			AAAGG	CAAGAAA	CACTTGG

Anexo 6. Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos del gen que codifica para la levansacarasa de 15 cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*.

Reference sequence (1): TmaritimaInulinase
 Identities normalised by aligned length.
 Colored by: identity

	cov	pid	1 [80
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	-----	PK-NYHFF-TCN-ND-N-L-FWK-KYH-FYOYN-RK-EN-N-CM-H-AV-SDD-A-HWRH
2 BamY14	99.5%	32.6%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
3 BamLS60	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
4 BamLH15	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
5 BamLM2303	99.5%	32.0%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
6 BamB15	99.5%	32.2%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
7 BamUCMB5113	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
8 BamS141	99.5%	32.6%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
9 BamUCMB5036	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
10 BamL2GeP	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
11 BamNAUB3	99.5%	32.6%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
12 BamYAUB9601-Y2	99.5%	32.6%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
13 BamWS-8	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
14 BamUCBM5033	99.5%	32.6%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
15 BamDSM7	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
16 BamSRCM101267	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
17 BamMT45	99.5%	32.4%	MDRIQQAEEALKEAEGKVKQRYRLGYHIMPRANWIND-NGLLQPKCEYHVFQHHYDEHWCPMHYCHVKSKDIDHWBHL	
consensus/100%		hat.sYHhphssWIND-NGLL.aKcCYHhFap.hc.pWshhpWChhScdIDHWBHL	
consensus/90%			DR-OO-EE-LK-E-K-KQRYRLGYHIMPR-NW-IND-NGLL-QPK-EYH-FFQHH-aDEP-WCP-HWCH-KSKD-IDHWBHL	
consensus/80%			DR-OO-EE-LK-E-K-KQRYRLGYHIMPR-NW-IND-NGLL-QPK-EYH-FFQHH-aDEP-WCP-HWCH-KSKD-IDHWBHL	
consensus/70%			DR-OO-EE-LK-E-K-KQRYRLGYHIMPR-NW-IND-NGLL-QPK-EYH-FFQHH-aDEP-WCP-HWCH-KSKD-IDHWBHL	

	cov	pid	81	160
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	-----	PVALY-DDE--THVFSVAV-EKD-K-F-VYTYRD-THNK-F-EKETQCVAN-SENGI-DF-KYD-NPVIKPEE-ETHFR
2 BamY14	99.5%	32.6%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
3 BamLS60	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
4 BamLH15	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
5 BamLM2303	99.5%	32.0%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
6 BamB15	99.5%	32.2%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
7 BamUCMB5113	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
8 BamS141	99.5%	32.6%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
9 BamUCMB5036	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
10 BamL2GeP	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
11 BamNAUB3	99.5%	32.6%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
12 BamYAUB9601-Y2	99.5%	32.6%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
13 BamWS-8	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
14 BamUCBM5033	99.5%	32.6%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
15 BamDSM7	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
16 BamSRCM101267	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
17 BamMT45	99.5%	32.4%	PVALAFGDFDQSCFCFS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
consensus/100%		ppesFCS-VAVDHDERLALIVTGHNIIDQEKDLFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
consensus/90%			LALAPGDGDFDQSCFCFS-VAVDH-R-LALIVT-HN-D-EKDFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
consensus/80%			LALAPGDGDFDQSCFCFS-VAVDH-R-LALIVT-HN-D-EKDFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	
consensus/70%			LALAPGDGDFDQSCFCFS-VAVDH-R-LALIVT-HN-D-EKDFYQTQNIIVSODGIVFQKQENPVIAPFEDSARHFR	

	cov	pid	161	240
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	-----	D-K-NRSN-EWR-VLCS-RDEKIGR-VL-YTSDD-FHWKYE-GV-FEDEL-TKE-EC-DLV-RIGERDILYS-TSTNSV-
2 BamY14	99.5%	32.6%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
3 BamLS60	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
4 BamLH15	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
5 BamLM2303	99.5%	32.0%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
6 BamB15	99.5%	32.2%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
7 BamUCMB5113	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
8 BamS141	99.5%	32.6%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
9 BamUCMB5036	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
10 BamL2GeP	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
11 BamNAUB3	99.5%	32.6%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
12 BamYAUB9601-Y2	99.5%	32.6%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
13 BamWS-8	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
14 BamUCBM5033	99.5%	32.6%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
15 BamDSM7	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
16 BamSRCM101267	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
17 BamMT45	99.5%	32.4%	D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSDGNLGYMWCCDFPELGGKRVLLISPGQIEADGD	
consensus/100%			D-K-V-+p.s-WHVLISsupcpLGR-LIYpSsLhpWcTcllhpS-s..sh.hECdhhcLgRcllhpS.puhpush.	
consensus/90%			D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSD-pLGY-WCCDFPELGGKRVLLIS-OGIE-DCD	
consensus/80%			D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSD-pLGY-WCCDFPELGGKRVLLIS-OGIE-DCD	
consensus/70%			D-K-WKHLVDVYHVIENSSKENVGR-VI-YRSPD-IRDMEYAGVLAQSD-pLGY-WCCDFPELGGKRVLLIS-OGIE-DCD	

	cov	pid	241	3	320
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	-----FSK--E-K-N-EKRRGLDH TDFY VQTFP-L-DRVVVIGW QSW RTGLY TKRE WNVMS LRE		
2 BamY14	99.5%	32.6%	SYNNLHQTGYLI DYNNETN FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
3 BamLS60	99.5%	32.4%	SYNNLHQTGYLI DYNNETN FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
4 BamLH15	99.5%	32.4%	SYNNLHQTGYLI DYNNETN FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
5 BamLM2303	99.5%	32.0%	SYNNLHQTGYLI DYNNETN FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
6 BamB15	99.5%	32.2%	SYNNLHQTGYLI DYNNETN FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
7 BamUCMB5113	99.5%	32.4%	SYQNLHQTGYLI DYHDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
8 BamS141	99.5%	32.6%	SYQNLHQTGYLI DYHDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
9 BamUCMB5036	99.5%	32.4%	SYQNLHQTGYLI DYHDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
10 BamL2GeP	99.5%	32.4%	SYQNLHQTGYLI DYHDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
11 BamNAUB3	99.5%	32.6%	SYQNLHQTGYLI DYHDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
12 BamYAUB9601-Y2	99.5%	32.6%	SYQNLHQTGYLI DYHDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
13 BamWS-8	99.5%	32.4%	SYQNLHQTGYLI DYHDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
14 BamUCMB5033	99.5%	32.6%	SYQNLHQTGYLI DYHDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
15 BamDSM7	99.5%	32.4%	SYKNLHQTGYLI DYNDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
16 BamSRCM101267	99.5%	32.4%	SYKNLHQTGYLI DYNDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
17 BamMT45	99.5%	32.4%	SYQNLHQTGYLI DYNDETNR FTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKGRRIAIGWMDMNES--EMTRADGWCALTLRE		
consensus/100%		a.hg-hp.psghstht.DH pDFY sQThss.srhls.lwhp.w.p...hTKT-cwsshohLRE		
consensus/90%			SYpN HQTGYLIC DYpsENKRFTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKRRRLAIGW D WESL EMTK D WGCALTLRE		
consensus/80%			SYpN HQTGYLIC DYpsENKRFTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKRRRLAIGW D WESL EMTK D WGCALTLRE		
consensus/70%			SYpN HQTGYLIC DYDETNRKRFTHGAFKE DH HDYFV VQTLDDKRRRLAIGW D WESL EMTK D WGCALTLRE		

	cov	pid	321	4	400
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	Y ENN E K K P DE ALA RRRK E --ET K S TF A D KENS YE V C F S E -----E R M N E S E V I A --K		
2 BamY14	99.5%	32.6%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
3 BamLS60	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
4 BamLH15	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
5 BamLM2303	99.5%	32.0%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
6 BamB15	99.5%	32.2%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
7 BamUCMB5113	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
8 BamS141	99.5%	32.6%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
9 BamUCMB5036	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
10 BamL2GeP	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
11 BamNAUB3	99.5%	32.6%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
12 BamYAUB9601-Y2	99.5%	32.6%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
13 BamWS-8	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
14 BamUCMB5033	99.5%	32.6%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
15 BamDSM7	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
16 BamSRCM101267	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
17 BamMT45	99.5%	32.4%	TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
consensus/100%			hlcss.c.hhhpV-Ehht.RKhhchh...tpuh.Scoahcs.Ep.hel.s.ashp.....hth+h.h.tpeELlIt..h		
consensus/90%			TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
consensus/80%			TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		
consensus/70%			TLRDDHKILMNPVEETKQ RKMEYRECAGRSVSSYLAKTS DDLLEVRVAVDVNDSDAETAGFKIRLDEEELLYVNL		

	cov	pid	401	480
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	SRDEIVDTRSGVSGGE RKST EDE TNR R F D S C S Y E F F N D S A F S F R H E N V Y N I S V --KSNQV---KQE	
2 BamY14	99.5%	32.6%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
3 BamLS60	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
4 BamLH15	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
5 BamLM2303	99.5%	32.0%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
6 BamB15	99.5%	32.2%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
7 BamUCMB5113	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
8 BamS141	99.5%	32.6%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
9 BamUCMB5036	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
10 BamL2GeP	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
11 BamNAUB3	99.5%	32.6%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
12 BamYAUB9601-Y2	99.5%	32.6%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
13 BamWS-8	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
14 BamUCMB5033	99.5%	32.6%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
15 BamDSM7	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
16 BamSRCM101267	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
17 BamMT45	99.5%	32.4%	TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
consensus/100%			occcchldso+.chattstR+sp-hspp.tl+hflDpsSlehhphcu.s.ho.Rtalppsh.h1pl..cpstV...chp	
consensus/90%			TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
consensus/80%			TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	
consensus/70%			TDKKITLDCCKMKAKDGR RRVRLDANGKALRHFD R S S H E V A N H G E T T M T S R Y N E G R L G I E L F S E K G A V K V E E F T	

	cov	pid	481	.]	491
1 TmaritimaInulinase	100.0%	100.0%	VFELENLWL--		
2 BamY14	99.5%	32.6%	YWTLKDIWKKS		
3 BamLS60	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKKS		
4 BamLH15	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKKS		
5 BamLM2303	99.5%	32.0%	YWTLKDIWKKS		
6 BamB15	99.5%	32.2%	YWTLKDIWKRS		
7 BamUCMB5113	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKKS		
8 BamS141	99.5%	32.6%	YWTLKDIWKKS		
9 BamUCMB5036	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKKS		
10 Bam12GeP	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKRS		
11 BamNAUB3	99.5%	32.6%	YWTLKDIWKKS		
12 BamYAUB9601-Y2	99.5%	32.6%	YWTLKDIWKKS		
13 BamWS-8	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKRS		
14 BamUCBM5033	99.5%	32.6%	YWTLKDIWKRS		
15 BamDSM7	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKKS		
16 BamSRCM101267	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKKS		
17 BamMT45	99.5%	32.4%	YWTLKDIWKR-		
consensus/100%			hapLcsIWh..		
consensus/90%			YWTLKDIWK+.		
consensus/80%			YWTLKDIWK+S		
consensus/70%			YWTLKDIWK+S		

Anexo 7. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos del gen que codifica para la levansacarasa de 15 cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*.

Reference sequence (1): BsubtilisLevanase
 Identities normalised by aligned length.
 Colored by: identity

	cov	pid	1
1 BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	KKR L I Q M I M F T --- L L T M A F S D A D S S Y D E D Y R Q Y H F T E N N N D N G H V Y A C E Y H P Y Q V H Y G L Q N
2 BamNAUB3	73.6%	31.7%	V R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K T H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
3 BamB15	73.6%	31.7%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K T H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
4 BamYAUB9601-Y2	73.6%	31.9%	V R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K T H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
5 BamY14	73.7%	31.1%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
6 BamLS60	73.7%	30.9%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
7 BamLH15	73.7%	30.9%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
8 BamLM2303	73.7%	30.9%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
9 BamUCMB5036	73.6%	31.3%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
10 BamWS-8	73.6%	31.7%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
11 Bam12GeP	73.6%	31.5%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
12 BamS141	73.6%	30.9%	M S R R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
13 BamUCMB5113	73.6%	31.1%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
14 BamUCBM5033	73.6%	31.1%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P N K H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
15 BamDSM7	73.6%	30.4%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P D K H N S S E T N T A H K T D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
16 BamSRCM101267	73.6%	30.4%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P D K H N S S E T N T A H K T D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
17 BamMT45	73.6%	30.4%	M A R K W P V I L F L G A F L F V G L P D K H N S S E T N T A P A K D Y R A A Y H F T P D K K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
consensus/100%			K . t . . l . l h . h s L L . p h a s a s u s t s . s o . . c t s Y R e t Y H F T s . s p . h N D . . p t . l a a t . c V H a Y V . p . . h . p h
consensus/90%			M s + K W l s L L F L G A F L F V G L L S K S H N S S T N T N T a K P D Y R A A Y H F T T D K W K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
consensus/80%			M A R K W l s L L F L G A F L F V G L L S K S H N S S T N T N T H R C D Y R A A Y H F T T D K W K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G
consensus/70%			M A R K W l V I L F L G A F L F V G L L N K S H N S S D T N T E H K K D Y R A A Y H F T T D K W K N D Q K P I F F E K Y H Y Y V L Y N R D Y P N G

	cov	pid	81
1 BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	G P N H V C H A V S K D V A T W E H L - - P V A L Y D E R C T F S C S V V D K N N T S F O T G E K P L V A L Y T Q - - D R E C H O Q S L A Y S N D K
2 BamNAUB3	73.6%	31.7%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
3 BamB15	73.6%	31.7%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
4 BamYAUB9601-Y2	73.6%	31.9%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
5 BamY14	73.7%	31.1%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
6 BamLS60	73.7%	30.9%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
7 BamLH15	73.7%	30.9%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
8 BamLM2303	73.7%	30.9%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
9 BamUCMB5036	73.6%	31.3%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
10 BamWS-8	73.6%	31.7%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
11 Bam12GeP	73.6%	31.5%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
12 BamS141	73.6%	30.9%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
13 BamUCMB5113	73.6%	31.1%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
14 BamUCBM5033	73.6%	31.1%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G K N A L - - - V A V T Q P T A K T K A Q E C Y L W Y S D K
15 BamDSM7	73.6%	30.4%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G E N A L - - - V A V T Q P T A K T Q A Q E C Y L W Y S D K
16 BamSRCM101267	73.6%	30.4%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G E N A L - - - V A V T Q P T A K T Q A Q E C Y L W Y S D K
17 BamMT45	73.6%	30.4%	N G T E W R H A V S E D V H W T D E G T A I P R Y T N E N C D I M S C S V I D R K N T A E F G E N A L - - - V A V T Q P T A K T Q A Q E C Y L W Y S D K
consensus/100%			s s h c w t h a v s c d v a w p c . . . s l s h y s s . p c s f a s c s s v i d r k n t s e f t p s t . . . v a l h t q . . s + p t t q . q . l h y s s d k
consensus/90%			N C T E W R H A V S E D V H W T D E T A I P R Y T N E N C D W S C S V I D R K N T A E F G C N A L . . . V A V T Q P T K K P Q E Q Y W Y S T D K
consensus/80%			N C T E W R H A V S E D V H W T D E T A I P R Y T N E N C D W S C S V I D R K N T A E F G C N A L . . . V A V T Q P T K K P Q E Q Y W Y S T D K
consensus/70%			N C T E W R H A V S E D V H W T D E T A I P R Y T N E N C D W S C S V I D R K N T A E F G C N A L . . . V A V T Q P T K K P Q E Q Y W Y S T D K

	cov	pid	161
1 BsubtilisLevanase	100.0%	100.0%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
2 BamNAUB3	73.6%	31.7%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
3 BamB15	73.6%	31.7%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
4 BamYAUB9601-Y2	73.6%	31.9%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
5 BamY14	73.7%	31.1%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
6 BamLS60	73.7%	30.9%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
7 BamLH15	73.7%	30.9%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
8 BamLM2303	73.7%	30.9%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
9 BamUCMB5036	73.6%	31.3%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
10 BamWS-8	73.6%	31.7%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
11 Bam12GeP	73.6%	31.5%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
12 BamS141	73.6%	30.9%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
13 BamUCMB5113	73.6%	31.1%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
14 BamUCBM5033	73.6%	31.1%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - Q I G L V E C P D Y M
15 BamDSM7	73.6%	30.4%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - E I G L V E C P D Y M
16 BamSRCM101267	73.6%	30.4%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - E I G L V E C P D Y M
17 BamMT45	73.6%	30.4%	G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q - - - E I G L V E C P D Y M
consensus/100%			G R F a d p y u s p v h . n p c k d f r d . k i l n d e o d d k w v a m a e e k e g f y e s p d l r n w y t g g i h p p . . . p h l h e c p d a .
consensus/90%			G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q . . . p i g l l e c p d y m
consensus/80%			G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q . . . p i g l l e c p d y m
consensus/70%			G R F T S Y S D Q V M K N P C K D F R D K I L N D E O D D K W V A M A E E K E G F Y E S P D L R N W Y T G G I T Q . . . p i g l l e c p d y m

	cov	pid	241	:	:	:	:	:	3	:	:	320
1	SbustillisLevanase	100.0%	100.0%									
2	BamNAUB3	73.6%	31.7%	MRG	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
3	BamB15	73.6%	31.7%	MRG	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
4	BamYAUB9601-Y2	73.6%	31.9%	MRG	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
5	BamY14	73.7%	31.1%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
6	BamLS60	73.7%	30.9%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
7	BamLH15	73.7%	30.9%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
8	BamLM2303	73.7%	30.9%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
9	BamUCMB5036	73.6%	31.3%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
10	BamWS-8	73.6%	31.7%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
11	BamL2GeP	73.6%	31.5%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
12	BamS141	73.6%	30.9%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
13	BamUCMB5113	73.6%	31.1%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
14	BamUCBM5033	73.6%	31.1%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
15	BamDSM7	73.6%	30.4%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
16	BamSRCM101267	73.6%	30.4%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
17	BamMT45	73.6%	30.4%	MRA	--	DDGTA	KW	LG	S	ANGK	PAGK	PNTY
consensus/100%				h.s. . sssptkmlhts sssst. utssshytas sfd pcpss-p. tcs. mdyg dhuu voapsh. sp. . o+rhl								
consensus/90%				MR. . DD oskml hss N K h c K NNY YWT NFD KEFSDQ. . te QW DYGDWYGGVTFED GNSD PLTKRYAL								
consensus/80%				MR. . DD TSKW LGS N K h c K NNY YWT NFD KEFT DQ. . pE QW DYGDWYGGVTFED GNSD PLTKRYAL								
consensus/70%				MR. . DD T K W LGS N K h c K NNY YWT NFD KEFT DQ. . EE QW DYGDWYGGVTFED GNSD PLTKRYAL								

	cov	pid	321	:	:	:	:	:	:	:	:	4	400
1	SbustillisLevanase	100.0%	100.0%										
2	BamNAUB3	73.6%	31.7%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
3	BamB15	73.6%	31.7%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
4	BamYAUB9601-Y2	73.6%	31.9%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
5	BamY14	73.7%	31.1%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
6	BamLS60	73.7%	30.9%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
7	BamLH15	73.7%	30.9%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
8	BamLM2303	73.7%	30.9%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
9	BamUCMB5036	73.6%	31.3%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
10	BamWS-8	73.6%	31.7%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
11	BamL2GeP	73.6%	31.5%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
12	BamS141	73.6%	30.9%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
13	BamUCMB5113	73.6%	31.1%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
14	BamUCBM5033	73.6%	31.1%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
15	BamDSM7	73.6%	30.4%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
16	BamSRCM101267	73.6%	30.4%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
17	BamMT45	73.6%	30.4%	AW	NNWD	Y	NET	TL	K	N	G	F	N
consensus/100%				uW sNWP LGS -eT. . . apuss -rel+pt. ptesh.lhpp lct.lppluoocphcpplls. . . ts.hhs.p.dny									
consensus/90%				AW NNWDY -eT TLKN FNCTDS VRE R pDQ -uCHYS hSE lE uN Q TSSTDS ECKO N. . . uSER lS K D eW									
consensus/80%				AW NNWDY -eT TLKN FNCTDS VRE R pDQ -uCHYS hSE lE uN Q TSSTDS ECKO N. . . uSER lS K D eW									
consensus/70%				AW NNWDY -eT TLKN FNCTDS VRE R pDQ -uCHYS hSE lE uN Q TSSTDS ECKO N. . . uSER lS K D eW									

	cov	pid	401	:	:	:	:	:	:	:	:	:	480
1	SbustillisLevanase	100.0%	100.0%										
2	BamNAUB3	73.6%	31.7%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
3	BamB15	73.6%	31.7%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
4	BamYAUB9601-Y2	73.6%	31.9%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
5	BamY14	73.7%	31.1%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
6	BamLS60	73.7%	30.9%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
7	BamLH15	73.7%	30.9%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
8	BamLM2303	73.7%	30.9%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
9	BamUCMB5036	73.6%	31.3%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
10	BamWS-8	73.6%	31.7%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
11	BamL2GeP	73.6%	31.5%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
12	BamS141	73.6%	30.9%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
13	BamUCMB5113	73.6%	31.1%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
14	BamUCBM5033	73.6%	31.1%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
15	BamDSM7	73.6%	30.4%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
16	BamSRCM101267	73.6%	30.4%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
17	BamMT45	73.6%	30.4%	QLD	MDIA	W	SD	IK	N	G	V	R	L
consensus/100%				plsh-hthshps+thth+. pssppahc.lshstcsuhha sRS.ospsshssa. . scpph.c.sp+th+thhd+o									
consensus/90%				Q.D.D.WSD.KNAGVR.RESDQSRH.D.VG.S.E.S.HAY.NRSFTS.Q.D.KT.C.Y..s.ESK.PFD.NK.R.V.H.K.L.V.D.K.T									
consensus/80%				Q.D.D.WSD.KNAGVR.RESDQSRH.D.VG.S.E.S.HAY.NRSFTS.Q.D.KT.C.Y..s.ESK.PFD.NK.R.V.H.K.L.V.D.K.T									
consensus/70%				Q.D.D.WSD.KNAGVR.RESDQSRH.D.VG.S.E.D.Y.V.NRSFTD.Q.D.KT.C.Y..s.ESK.PFD.NK.R.V.H.K.L.V.D.K.T									

Anexo 9. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos del gen que codifica para la levansacarasa de 15 cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*.

Bacillus velezensis strain AL7 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP045926.1](#) Length: 3894709 Number of Matches: 1

Range 1: 3108266 to 3109810 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2754 bits(1491)	0.0	1527/1545(99%)	0/1545(0%)	Plus/Plus
Query 1		ATGGCAGCAAATGGCCCGTTGTAATATGATCTTTTGGGTGCGTTCCTGTGTGTCGGC		60
Sbjct 3108266	CG.....A.....T		3108325
Query 61		TTACTCCGACCAAACACCAATTCCTCTGACACAACACCGGACATAGAAAGGATTAC		120
Sbjct 3108326	C.....		3108385
Query 121		CGGGCGCGTATCATTTTACGACCCCGGACAAATGGAAAACCGACCTCAAAGCCCAtt		180
Sbjct 3108386			3108445
Query 181		tttttCGAGGGGAATATCATTACTACTATCTTTATAATCGGGATTACCCGAAACGGCAAC		240
Sbjct 3108446			3108505
Query 241		GGCACAGAAATGGCGGACCGCGTATCAGAGGACTTGGTGCCTGGACGGACGAAGGCACG		300
Sbjct 3108506	C.....		3108565
Query 301		GCTATTCGAAATACACCAACGAAAACGGCGATATCTGGGCGGGTTCGTGCGTCATTGAT		360
Sbjct 3108566			3108625
Query 361		AAACAACACACCGCGGCTTCGGCAAACCGCGTGGTCCCGTCAACGACGACGGACCA		420
Sbjct 3108626	A.....		3108685
Query 421		GCCAAAACAAAAGCCAGGACAAATATTTATGGTACAGCACGGATAAAGGAAAACGTTT		480
Sbjct 3108686			3108745
Query 481		ACTTCCTATAGTGATCAGCCCGTATGAAAATCCGGAACTAAGGATTCGGGACCCG		540
Sbjct 3108746	T.....		3108805
Query 541		AAAGTGATCTGGGATGAACAGGATGACAAATGGGTGATGGCCATGGCCGAGGGCAAAA		600
Sbjct 3108806			3108865
Query 601		ATCGGTTTTATGAATCACCAGATTAAAAAATGGACATACACGGGCGGTTTATCACT		660
Sbjct 3108866			3108925
Query 661		CAGCAGATCGGCGCTCGAATGCCCGACCCTTTATATGATGCGTGCAGATGACGGACA		720
Sbjct 3108926			3108985
Query 721		GCCAAAGTGGTCTCTGGCGTAAGCGCAACCGCAACCCCGCAGGCAACCGAATACGTAC		780
Sbjct 3108986	C.....		3109045
Query 781		CGTATTCGACCGGAAACTTTGACCGGAAAGAATTEACCCCGATCAAGAGAACCGCAA		840
Sbjct 3109046	G.....T.....		3109105
Query 841		TGGCTCGATTACGGCTTTGACTGGTACGGCGGCGTCACTTTGAAGACGGTAATAGCGAA		900
Sbjct 3109106			3109165
Query 901		GATCCGCTGACAAAACGCTATGCGCTGGCATGGATGAACAAATGGGATTAACCGAATGAA		960
Sbjct 3109166			3109225
Query 961		ACACCACACTAAAACCGCTTTAACCGCACGGATTCATCGTCCGGGAAATCCGCCTT		1020
Sbjct 3109226	T.....		3109285
Query 1021		CAGCAGCAGGACCGCGCACATACAGCCTTGTGTCAGAGCCGGTTGAAGCATTGAACCAA		1080
Sbjct 3109286			3109345
Query 1081		TTAACCTTCAACTGACAGCATAGAACACAAACAGGTGAACAGTTCAGAGCACATGCCG		1140
Sbjct 3109346	G.....		3109405
Query 1141		ATCAAAGTGATACATATCAGCTTGATATGGATATCGCTGGTCAGATATCAAAAATGCA		1200
Sbjct 3109406			3109465
Query 1201		GGCCTCAGACTCAGGAATCAGCAGACCAAAGTCGGCATATGATGTCGGTATTCAGCA		1260
Sbjct 3109466			3109525
Query 1261		GAAGCGGCTATGCTATCTGAACAGATCGTTTACAGACCAGCCTGATAAAACCGCGCA		1320
Sbjct 3109526	T.....C.....		3109585
Query 1321		TACCCGAAAGCAAAGCCCATTTGACGGAAACAAAGGGCGCGTCCATCTGAAAATPTCTC		1380
Sbjct 3109586	T.....C.....		3109645
Query 1381		GTGGACAAACAGTATTGAAGTATTGACAGACGACGGAAAACCGTTCTGACAAATGAA		1440
Sbjct 3109646			3109705
Query 1441		GTGTTCCAAAACCGAAGATCAGGGAATCAGCTCTTTCTGAAGGGCGGCTCCGCTGAC		1500
Sbjct 3109706			3109765
Query 1501		TTTCAGCATATGAGATGAAGCATCTCGGTTGATTCATGCTTAG	1545	
Sbjct 3109766	T.....	3109810	

Anexo 10. Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos del gen que codifica para la levansacarasa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP y *B. velezensis* AL7.

Bacillus velezensis strain S4 chromosome, complete genome

Sequence ID: [CP050424.1](#) Length: 4065174 Number of Matches: 1

Range 1: 3423496 to 3424965 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2649 bits(1434)	0.0	1458/1470(99%)	0/1470(0%)	Plus/Minus	
Query	1	ATGGATAGAATTCAGCAGGCCGAAGAAGCTTTGAAGGAAGCCGAGGGTAAAGTGAACAA			60
Sbjct	3424965			3424906
Query	61	AGATATCGATTGGGGTACCATATTTATGCCCGGGCGAATGGATCAATGATCCGAACGGG			120
Sbjct	3424905			3424846
Query	121	CTTATTCAGTTTAAAGGAGAATACCACGTCCTTTTCAGCATCATCCGATGATGAGCAT			180
Sbjct	3424845			3424786
Query	181	TGGGGCCCGATGCATGGGGACATGTAAAAGTAAAGATCTCATTCATGGGGACACCTG			240
Sbjct	3424785			3424726
Query	241	CCGGTTCCTTAGCTCCGGGCGATGCATTGCACCAAAGCCGCTGTTTTCCGGGAAGCCCG			300
Sbjct	3424725A.....T.....			3424666
Query	301	GTCGATGATCATGGAAGATTAGCCCTCATCTATACAGGCCATAATATAATGATCAAGAG			360
Sbjct	3424665A.....			3424606
Query	361	AAAGACCTATTCTATCAAACTCAAATATCGCTGTACGCCAAGATGGAACCGTGTGAA			420
Sbjct	3424605T.....			3424546
Query	421	AAGCTTCAGAAAACCCCTGTTATTCGGGAACCGCCGGAAGACAGCCCGTCATTTCCGC			480
Sbjct	3424545G.....			3424486
Query	481	GATCCGAAAGTATGGAAGCATCCGATGTTTGGTATATGGTCATCGCCAACCTCTTCAAA			540
Sbjct	3424485			3424426
Query	541	GAACCGTCGGACGGGTCGTTTTATACCGTTACCTGATTTGCGTATGGGAATACGGC			600
Sbjct	3424425			3424366
Query	601	GGGGTTCGCCCCAAGTGAAGTAACTCGGCTATATGPGGAATGTCCGATTTCTT			660
Sbjct	3424365T.....			3424306
Query	661	GAATTAGCCGGCAAGCATGTCCCTGCTGATTTGCCCCAGGGGATCGAGCCGACGGTGT			720
Sbjct	3424305			3424246
Query	721	TCCTATCAAAATTTACATCAAAACCGCTATTTAATCGGTGATCATCATGATGAAACAAC			780
Sbjct	3424245			3424186
Query	781	AAATTTACACACGGCGCTTTTAAAGRACTGGATCACGGCCATGACTTTTACCCGCTGCAA			840
Sbjct	3424185			3424126
Query	841	ACATATTAGATGATAAAGGACCGAATTTGCTATCGGGTGGATGGATATGTGGGAATCT			900
Sbjct	3424125C.....			3424066
Query	901	GAGATGCCGACAAAAGCCGACGGATGGTGGGGTGCCTGACTTTGCCCGGAGAACTGACT			960
Sbjct	3424065			3424006
Query	961	TTGCCGTGATGATCATAAATTTTGGATGAATCCCGTGGAAAGAACCAAGCAGCTGCCGAA			1020
Sbjct	3424005			3423946
Query	1021	ATGGAGTATCGGGAATGTGCCGGACGATCGGTTTCAGGGAGTTACTTGACAAAAGACATCC			1080
Sbjct	3423945A.....C.....G.....G.....			3423886
Query	1081	GAAGACCTGCTTGAAGTCCGAGTCGTGTTTGATATAAAGGATTCGATGCCGAAACGGCA			1140
Sbjct	3423885			3423826
Query	1141	GGTTTAAAGATTCCGGCCCTTGACGAGAAGAAGCTTGTGCTGACATCAATCTAAGCGAT			1200
Sbjct	3423825			3423766
Query	1201	AAAAAGCTGACACTTGATGACCAAGATGGGAAAGCCAAAGACGGTGTGAGAAGGGTG			1260
Sbjct	3423765			3423706
Query	1261	CAGACGGATACAAACGGCAAGCTGGCGCTGCCGTATCTTTATTGACAGATCCTCGATTGAA			1320
Sbjct	3423705			3423646
Query	1321	GTATTCGCCAATCATGAGAAACAACGATGACAAAGCCGTATCTATCCGAATGAAGCCAGA			1380
Sbjct	3423645			3423586
Query	1381	TTGGGGATTGAGCTGCTTTCTGAGAAAGGCGCCGTAAGGTTGAGGAATTCACCTATTGG			1440
Sbjct	3423585A.....			3423526
Query	1441	ACGTTAAAGGACATTTGGAAAAGAGCTGA	1470		
Sbjct	3423525	3423496		

Anexo 11. Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos del gen que codifica para la inulinasa de *B. amyloliquefaciens* 12GeP y *B. velezensis* S4.

Bacillus velezensis strain LPL061 chromosome, complete genome

Sequence ID: [CP042271.1](#) Length: 3907268 Number of Matches: 1

Range 1: 2822170 to 2823591 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2549 bits(1380)	O.0	1408/1422(99%)	0/1422(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAACATCaaaaaaaTTGCAAAACGAGCCACAGTCTCTAACTTTACGACTGCACCTTCTG			60
Sbjct 2822170T.....			2822229
Query 61	GCAGGAGGAGCGACTCAAGCCTTCGGCAAGAAAATACCCAAAAACCTTACAAAGAAACG			120
Sbjct 2822230G.....			2822289
Query 121	TACGGCGTCTCTCACATCACACGCCATGATATGCTGCAGATCCCTAACAGCAGCAAAGT			180
Sbjct 2822290T.....			2822349
Query 181	GA AAAATACCAAGTGCCTCAATTCGACCAATCAACAATTA AAAATATCGAGTCCGCAAA			240
Sbjct 2822350C.....			2822409
Query 241	GGACTGGATGTATGGGACAGCTGGCCGCTCCAAAACGCTGACGGAACTAGCTGAATAC			300
Sbjct 2822410G.....			2822469
Query 301	AACGGCTATCACGTTGTGTGTTGCTCTGCGGGAAGCCGAAAGAGCGCTGATGACACATCC			360
Sbjct 2822470C.....			2822529
Query 361	ATCTACATGTTTATCAAAAAGTTCGGCGCAACTCGATCGACAGCTGGAAAAACGGGGC			420
Sbjct 2822530C.....			2822589
Query 421	CGTGTCTTTAAAGACAGCGATAAGTTCACGCCAACGATGAAATCCTGAAGAACAGACA			480
Sbjct 2822590G.....			2822649
Query 481	CAAGAATGGTCGGTCTGCAACCTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATCTACACT			540
Sbjct 2822650			2822709
Query 541	GACTTTCCCGTAAACATTAACGGCAAAACAAGCCTGCAACGGCCAGGTAATGTGTCA			600
Sbjct 2822710			2822769
Query 601	AAATCTGATGACACCGTTCAGATCAACGGAGTGGAAAGATCAAAAACGATTTTTCAGCGC			660
Sbjct 2822770C.....			2822829
Query 661	GACGAAAAACATATCAAAAAGTTCAGCAGTTTATCGATGAAGGAACTATACATCCGGC			720
Sbjct 2822830			2822889
Query 721	GACAAACATACGCTGAGAGACCCCTCACTACGTTGAAGACAAGGCCATAAATACCTTGTA			780
Sbjct 2822890			2822949
Query 781	TTCCGAAGCCAAACCGGAAACAGAAAACGGATACCAAGCCGAAGATCTTTATTTAACAAA			840
Sbjct 2822950			2823009
Query 841	GCGTACTACGGCGGACGACAAAACCTCTCCGTAAGAAGTCAAGAGCTTCAGCAAGC			900
Sbjct 2823010			2823069
Query 901	GCTAAAAAACCGGATGCTGAATTAGCGAACGGCCCTCCGTTATGTTAGGTAAACCAT			960
Sbjct 2823070			2823129
Query 961	GATTACACATTTAAAAAAGTCAATGAAGCCGCTGATTACTTCAAATACGGTAAACAGATGA			1020
Sbjct 2823130C.....C.....T.....			2823189
Query 1021	ATCGAGCCGCGAATGTTTTCAAATGAACGGCAAAATGGTACCTGTTCACTGATTCACGC			1080
Sbjct 2823190			2823249
Query 1081	GGTTCAAAAATGACGATCGACGGTATTAACCTCAACCGATATTTACATGCTGGTTATGTA			1140
Sbjct 2823250			2823309
Query 1141	TCARAACCTTTAACAGGTCCTTACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGTCTTGTACTGCAAAATG			1200
Sbjct 2823310C.....			2823369
Query 1201	GGTCTGATCCTAACGATGTAACGTTCACTTACTTCACCTTCGCAGTCCCGCAAGCCAAA			1260
Sbjct 2823370			2823429
Query 1261	GGCAACAATGTCGTGATCAAAAGCTACATGACAAAACGAGGCTTCTTTGAGGATAAAAAG			1320
Sbjct 2823430			2823489
Query 1321	GCAACATTTGCCCAAGCTTCTTAATGAACATCAAAAGCCAAAGAAAACATCCGTTGTTAAA			1380
Sbjct 2823490G.....			2823549
Query 1381	AACAGCATCCTTGAACAAGGACAGCTACCGTTAAACACTAA	1422		
Sbjct 2823550			2823591

Anexo 12. Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos del gen que codifica para la levansucrase de *B. amyloliquefaciens* 12GeP y *B. velezensis* LPL061.

Anexo 13. Cálculo de la eficiencia de transformación.

$$UFC\ transformadas_{Lev} = \frac{(No.\ de\ colonias)(Coeficiente\ de\ dilución)(Vol.\ original\ de\ transformación)}{Volumen\ empleado\ en\ la\ placa}$$

$$UFC\ transformadas_{Lev} = \frac{(360)(20,000)(200\ \mu L)}{200\ \mu L} = 7.2 \times 10^6 \text{ (360, 86,92 Lev, Inu, lvs)}$$

$$Eficiencia\ de\ transformación_{Lev} = \frac{UFC\ transformadas}{DNA\ de\ plásmido\ (\mu g)}$$

$$Eficiencia\ de\ transformación_{Lev} = \frac{7.2 \times 10^6}{0.15\ \mu g} = 4.8 \times 10^7$$