



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Kluyveromyces marxianus* AZ8 PARA LA PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA INULINASA ACH1.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
ANAHÍ CITLALLI RAYA CHAMOL**



MÉXICO, CDMX.

AÑO 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Sobeida Sánchez Nieto

SECRETARIO: Carmina Montiel Pacheco

1er. SUPLENTE: Oscar Hernández Meléndez

2do. SUPLETE: Genaro Jiménez Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 314, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional
Autónoma de México**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carmina Montiel Pacheco _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Jonathan Trapala Reyna _____

SUSTENTANTE:

Anahí Citlalli Raya Chamol _____

AGRADECIMIENTOS

Por el financiamiento del proyecto,
a la UNAM, a través de la DGAPA (PAPIIT IA-204118),
y a la Facultad de Química (PAIP 5000-9153).

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	4
3.1. Agave	4
3.1.1. Importancia, principales usos y producción anual	4
3.2. Fructanos	10
3.2.1. Inulina	12
3.2.2. Agavina	13
3.2.3. Subproductos de la inulina	14
3.3. Beneficios de los fructooligosacáridos (FOS)	14
3.3.1. Efecto prebiótico	14
3.4. Inulinasas	15
3.5. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	19
3.5.1. Taxonomía y filogenia de <i>K. marxianus</i>	19
3.5.2. Aplicaciones de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	21
3.6. Purificación de proteínas por cromatografía de exclusión molecular	23
IV. JUSTIFICACIÓN	25
V. HIPÓTESIS	26
VI. OBJETIVOS	26
6.1. Objetivo general	26
6.2. Objetivos particulares	27
VII. METODOLOGÍA	27
7.1. Preparación de medios de cultivo	27
7.2. Aislamiento, verificación de pureza y conservación de la cepa AZ8.	28

7.3. Caracterización del crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8.	28
7.3.1. Efecto de la fuente de carbono	28
7.3.2. Efecto del pH inicial de medio de cultivo	29
7.3.3. Efecto de la temperatura de incubación	29
7.3.4. Monitoreo del consumo de sustrato	30
7.3.5. Ensayo de actividad enzimática	30
7.3.6. Cuantificación de proteína	31
7.4. Preparación de la muestra para la purificación	32
7.4.1. Concentración del extracto celular	32
7.4.2. Diálisis	32
7.4.3. Elaboración de geles de poliacrilamida	32
7.4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)	33
7.5. Purificación de la enzima.	34
7.5.1. Cromatografía por exclusión molecular	34
7.5.2. Monitoreo de purificación	34
7.5.3. Cromatografía en capa fina (TLC)	35
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
8.1. Aislamiento y verificación de pureza	35
8.2. Caracterización del crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> cepa AZ8	36
8.2.1. Efecto de la fuente de carbono	36
8.2.2. Efecto del pH inicial del medio de cultivo	41
8.2.3. Efecto de la temperatura de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8	45
8.2.4. Efecto de la presencia de metales en el medio de cultivo para la producción y actividad de la inulinasa ACH1	48
8.3. Purificación de la enzima.	54
IX. CONCLUSIONES	59
X. PERSPECTIVAS	59
XI. ANEXOS	60
11.1. Curvas de crecimiento con barras de error	60
11.1.1. Fuente de carbono	60
11.1.2. pH	62
11.1.3. Temperaturas	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de los diferentes tipos de fructanos (a) inulina (b) levana (c) neoserias de inulina (d) neoserias de levano (e) fructanos ramificados (Arrizón <i>et al.</i> , 2014)	11
Figura 2. Estructura propuesta para la inulina proveniente de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul (agavina) (López y Mancilla, 2007).	13
Figura 3. Mecanismo de acción de la inulinasa (Kango y Jain, 2011).	17
Figura 4. Relación filogenética de <i>Kluyveromyces marxianus</i> con otras levaduras (Lane y Morrissey, 2010).	20
Figura 5. a) Esquema de una cromatografía de exclusión molecular (Lehninger <i>et al.</i> , 2009) b) Microscopía de una esfera de dextrano (Roca <i>et al.</i> , 2003).....	25
Figura 6. Observación al microscopio de una colonia aislada de <i>K. marxianus</i> AZ8. Tinción simple con safranina.	36
Figura 7. Aislamiento de colonias de <i>K. marxianus</i> AZ8 por agotamiento.....	36
Figura 8. Curvas de crecimiento de <i>K. marxianus</i> con diferentes fuentes de carbono.	37
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>K. marxianus</i> AZ8 con inulina de agave azul como fuente de carbono y consumo del sustrato como fuente de carbono.	38
Figura 10. Actividad enzimática de la inulinasa producida por <i>K. marxianus</i> cepa AZ8 crecida en diferentes fuentes de carbono (los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave 0.5% m/v pH 5 a 50°C por 24 horas).....	39
Figura 11. Concentración de proteína de 1 mL de cultivo a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 en diferentes fuentes de carbono.	40
Figura 12. Crecimiento de <i>K. marxianus</i> AZ8 variando el pH inicial del medio de cultivo.	41
Figura 13. Actividad enzimática de la inulinasa ACH1 producida por la cepa AZ8 en distintos valores de pH inicial del medio de cultivo. (Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave 0.5% m/v pH 5 a 50°C por 24 h)	44
Figura 14. Contenido de proteína total a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 variando el pH inicial del medio de cultivo.	44
Figura 15. Crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8 a diferentes temperaturas de incubación.	45
Figura 16. Actividad enzimática de la inulinasa ACH1 producida por <i>K. marxianus</i> AZ8 a diferentes temperaturas de crecimiento. (Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave 0.5% m/v pH 5 a 50°C por 24 h).....	46
Figura 17. Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8 a diferentes temperaturas.....	47

Figura 18. a) Actividad enzimática con Mg^{2+} adicionado al medio de cultivo de <i>K. marxianus</i> AZ8. b) Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Mg^{2+} adicionado al medio de cultivo. c) Relación del producto fructosa/ concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Mg^{2+} adicionado al medio de cultivo.....	49
Figura 19. a) Actividad enzimática con Ca^{2+} adicionado al medio de cultivo de <i>K. marxianus</i> AZ8. b) Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Ca^{2+} adicionado al medio de cultivo. c) Relación del producto fructosa/ concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Ca^{2+} adicionado al medio de cultivo.	50
Figura 20. a) Actividad enzimática con Cu^{2+} adicionado al medio de cultivo de <i>K. marxianus</i> AZ8. b) Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Cu^{2+} adicionado al medio de cultivo. c) Relación del producto fructosa/ concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Cu^{2+} adicionado al medio de cultivo.	51
Figura 21. a) Actividad enzimática con Mn^{2+} adicionado al medio de cultivo de <i>K. marxianus</i> AZ8. b) Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Mn^{2+} adicionado al medio de cultivo. c) Relación del producto fructosa/ concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Mn^{2+} adicionado al medio de cultivo.....	52
Figura 22. a) Actividad enzimática con Fe^{3+} adicionado al medio de cultivo de <i>K. marxianus</i> AZ8. b) Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Fe^{3+} adicionado al medio de cultivo. c) Relación del producto fructosa/ concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Fe^{3+} adicionado al medio de cultivo.....	53
Figura 23. Cromatograma de exclusión molecular de la purificación de la inulinasa ACH1.....	55
Figura 24. Cromatografía en capa fina de las reacciones de hidrólisis de inulina de <i>Agave azul</i> con inulinasa ACH1. 1) Extracto celular crudo. 2) Extracto celular liofilizado. 3) Enzima purificada por exclusión molecular. 4) Control de fructosa. 5) Control de inulina de <i>Agave tequilana Weber var. azul</i>	56
Figura 25. SDS-PAGE para la verificación y monitoreo de la purificación de la inulinasa ACH1. 1) Marcadores de peso molecular. 2) Extracto celular crudo. 3) Fracción A obtenida de la cromatografía de exclusión molecular.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica del <i>Agave spp.</i> en México (García <i>et. al.</i> , 2010).	5
Tabla 2. Producción anual de agave en México (SIAP, 2017).	9
Tabla 3. Composición de <i>Agave tequila Weber</i> variedad azul (Praznik <i>et al.</i> , 2002).	9
Tabla 4. Tipos de carbohidratos en <i>Agave tequila Weber</i> variedad azul (Praznik <i>et al.</i> , 2002).	10
Tabla 5. Fuentes y propiedades de algunas inulinasas microbianas (Kango y Jain, 2011).	18
Tabla 6. Principales aplicaciones de <i>K. marxianus</i> (Lane y Morrissey, 2010).	21
Tabla 7. Composición del medio de cultivo.	27
Tabla 8. Variación en el pH del medio de cultivo antes y después del crecimiento celular.	42
Tabla 9. Efecto de la presencia de metales en la producción y actividad de la inulinasa ACH1.	54
Tabla 10. Tabla de purificación por cromatografía de exclusión molecular de la inulinasa ACH1 producida por <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8.	57
Tabla 11. Valores de K_a y volúmenes de elución de los estándares empleados para la calibración de la columna Superdex 200.	58

I. RESUMEN

El objetivo de este proyecto es encontrar las mejores condiciones de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* cepa AZ8 para la producción de inulinasa y llevar a cabo la purificación de dicha enzima.

Inicialmente se verificó que la cepa proporcionada estuviera pura: se creció el microorganismo y se realizó una tinción simple. Una vez pura la cepa, esta se criogenizó con 50% de glicerol para su conservación. Se realizaron curvas de crecimiento del microorganismo variando la única fuente de carbono en el medio: inulina de *Agave azul*, inulina de *Agave salmiana*, inulina de achicoria, sacarosa, fructosa y glucosa. Se tomaron muestras a distintos tiempos durante 48 h. Una vez que se tuvo ubicada la fase de crecimiento exponencial, se cuantificó proteína y actividad de la enzima extracelular en una muestra de dicha fase de crecimiento. El mejor sustrato para obtener inulinasas de la cepa AZ8 es la inulina de *Agave azul*.

Posteriormente, se varió el pH inicial del medio de cultivo, ajustando con NaOH o HCl 0.1 N a pH 3, 4, 5, 6 y 7. Se siguió la misma metodología que para la fuente de carbono, resultando que el mejor pH inicial del medio de crecimiento con inulina de *Agave azul* es pH 5. Después de que se tuvo la mejor fuente de carbono y el pH inicial del medio, se evaluaron las temperaturas de crecimiento: 30, 35, 40, 45 y 50°C. Los resultados obtenidos indican que la mejor temperatura para la producción de inulinasas por *K. marxianus* AZ8 es 35°C.

Una vez que se tuvieron las mejores condiciones de crecimiento de la levadura para la producción de la enzima, se evaluó el efecto de la presencia de metales en el medio de cultivo. Se adicionó Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} en concentraciones de 0.5 - 2.5 mM. A los extractos celulares se les realizó el ensayo de actividad enzimática mencionado anteriormente, así como cuantificación de proteína. La presencia de estos metales no aumenta la producción o actividad de la enzima, por lo que se descartan como posibles componentes del medio de crecimiento de la cepa AZ8.

Para la purificación de la inulinasa ACH1, se obtuvo el extracto celular de 1 L de cultivo de *K. marxianus* AZ8 con las condiciones determinadas anteriormente (35°C, pH 5 y medio con inulina de agave). Se centrifugó la muestra para eliminar las células del medio y el sobrenadante se liofilizó. Posteriormente, la muestra se dializó para eliminar las sales y proteínas menores a 10 kDa y poder realizar un SDS-PAGE para conocer la población proteica en la muestra y así plantear la metodología de purificación. La purificación se llevó a cabo mediante FPLC (Cromatografía líquida rápida de proteínas, por sus siglas en inglés) empleando la técnica de exclusión molecular. Para esta tarea se utilizó una columna Superdex 200 y buffer de fosfatos 50 mM + 500 mM de NaCl pH 7.2. A las fracciones purificadas se les cuantificó proteína, actividad enzimática y se hizo un SDS-PAGE para corroborar la pureza de la enzima.

II. INTRODUCCIÓN

La inulina es un polímero de fructosa que está formado de cadenas lineales de ésta con enlaces β -2,1 y un residuo terminal de glucosa unido a través de un enlace de tipo sacarosa (Cazetta *et al.*, 2010). Después del almidón, los fructanos son los polisacáridos no estructurales más abundantes en el mundo; la inulina sirve como un polisacárido de reserva en muchas plantas como las del género *Vernonia herbacea*, alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), achicoria (*Cichorium intibus*, *Cichorium endivia*), Dalia (*Dahlia pinnata*) y Agave (*Agave tequilana*) (Kango y Jain, 2011).

En México, como resultado de la industria de la producción de tequila, pulque, mezcal, etc, se generan aproximadamente 300 mil toneladas anuales de residuos de agave (González *et al.*, 2005) por lo que es de suma importancia aprovechar esta valiosa fuente de inulina en procesos biotecnológicos como la producción de inulinasas y sus derivados.

La hidrólisis de la inulina puede generar compuestos de valor agregado como jarabes de alta fructosa, que se emplean como edulcorantes bajos en calorías gracias a que posee un poder edulcorante mayor que la sacarosa, y fructooligosacáridos (FOS) que son empleados en la industria alimenticia por su función como prebiótico y fibra dietética (Golunski *et al.*, 2011). Para degradar la inulina a dichos productos se requiere, ya sea de procesos químicos (ácido y alta temperatura), generando subproductos no deseables, o bien de enzimas, particularmente de una llamada inulinasas o β -2,1-fructan-fructanohidrolasa, la cual hidroliza los enlaces β -2,1 fructano del polímero. Esta enzima es producida por una amplia gama de organismos, incluyendo plantas, bacterias, hongos y levaduras (Kango y Jain, 2011).

Dentro del grupo de las levaduras, se ha encontrado que *Kluyveromyces marxianus* es la más empleada para la producción de inulinasas debido a que muestra un buen rendimiento y alta actividad enzimática (Cazetta *et al.*, 2010).

III. ANTECEDENTES

3.1. Agave

El Agave, o mejor conocido como maguey, es una planta monocotiledónea, perteneciente a la familia *Agavaceae*, la cual está integrada por los géneros *Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Hesperaloë*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyantes* y *Yucca*. El género *Agave* cuenta con 166 especies, de las cuales 125 se encuentran en territorio mexicano (García y Galván, 1995).

El Agave se considera originario de México, ya que se encuentra desde los 34° latitud norte hasta los 60° latitud sur; coincidiendo en nuestro país el centro de origen con el centro de diversidad de especies. Debido a esto, cerca del 75% de las especies de agave se encuentran en México, de las cuales un 55% son endémicas (García *et al.*, 2010).

3.1.1. Importancia, principales usos y producción anual

En el México prehispánico, la planta de agave era llamada “*Metl*” (del náhuatl), la cual era sagrada ya que se consideraba como un regalo de los dioses. En 1753, Charles Linneo utilizó la palabra *Agave* (del griego “noble” y del latín “admirable”) para referirse a este género, debido a la notable habilidad de dichas plantas para crecer en ambientes extremadamente secos, en donde muchas veces son la flora predominante o exclusiva en una zona geográfica. Sin embargo, las plantas de agave también pueden ser encontradas en una gran variedad de ecosistemas. La diversidad botánica encontrada para estas plantas son el resultado de una prehistórica selección humana, cuyo objetivo empírico era incrementar cualidades específicas en un diverso y especializado sistema productivo de agave, siendo México el centro de origen y región endémica de la mayoría de las especies de este género (López y Mancilla, 2007).

Su uso se remonta a la época precolombina, cuando los pueblos indígenas lo utilizaron como fuente abastecedora de materia prima para elaborar cientos de productos; a partir de entonces ha tenido suma importancia para nuestro país desde el punto de vista económico, ecológico y social (Castillo *et al.*, 2007).

En la Tabla 1 se muestran algunos de los usos del agave en nuestro país, sin embargo, los más importantes son para la producción de tequila (*A. tequilana* Weber variedad azul), mezcal (principalmente *Agave salmiana*), pulque (sección *Salmianae*), y para la obtención de larvas (mejor conocidas como gusanos de maguey), las cuales son muy apreciadas en la gastronomía.

Tabla 1. Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica del *Agave spp.* en México (García *et. al.*, 2010).

Usos	Producto	Parte de la planta
Alimentación	Azúcar	Tallo (piña)
	Guisos	Flores y frutos (cápsulas frescas)
	Dulce	
	Envolver barbacoa	Escapo floral (quiote)
	Mixiotes	Hojas
	Gusanos blancos	Cutícula del cogollo
	Gusanos rojos (Chinicuiles)	Hojas
	Pan de pulque	Tallo (piña)
	Tortillas	Perianto de flores + nixtamal
Bebidas	Aguamiel, miel, atole de aguamiel	Tallo (piña)
	Pulque	
	Mezcal	
	Tequila	
	Sotol	
	Bacanora	
	Vinagre Jarabe	
Agrícola	Cerca viva	Planta completa
	Evitar erosión como formadora de suelo	Planta completa
	Abono orgánico (fertilizante)	Composta de hojas
	Planta líder de ecosistemas	Planta completa
Forraje	Bovinos, caprinos, porcinos	Hojas, escapos florales, flores y parte de la inflorescencia, bagazo

Los principales productos que se obtienen del agave y que son de gran importancia y representativos de nuestro país se describen a continuación:

Tequila: es una bebida alcohólica regional, obtenida por destilación de mostos de *Agave tequilana* Weber var. azul. Se debe procesar en las instalaciones de una fábrica autorizada, la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la Declaración General de Protección a la Denominación de Origen “Tequila” (DOT).

Dicha Denominación de Origen “Tequila” comprende 178 municipios de cinco estados de la República Mexicana: Jalisco con sus 125 municipios, Nayarit con 8, Guanajuato con 5, Tamaulipas con 11 y Michoacán con 29, y sólo en estos estados se puede utilizar la especie de agave mencionada anteriormente para la elaboración de tequila (Consejo Regulador del Tequila, 2017).

Mezcal: es una bebida alcohólica de origen mexicano, producto de la fermentación de los azúcares extraídos de la piña cocida de diferentes agaves como *A. salmiana* (Verdugo *et al.*, 2011) y *A. angustifolia*, *A. esperrima*, *A. weberi*, y *A. potatorum*, entre otros (Molina *et al.*, 2007). Su proceso de elaboración es artesanal y muy parecido al del tequila.

Las levaduras que fermentan los azúcares son de diferentes géneros, como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Clavispora lisitaniae*, *Pichia kluyveri*, *Candida ethanolica*, entre otras (Verdugo *et al.*, 2011).

Pulque: es una bebida ancestral, la cual tuvo un gran auge y control por los aztecas en el siglo XIII. Es de color blanco, lechosa y viscosa, con un fuerte sabor y olor a agave, tiene un contenido de alcohol menor al 6%. Con la caída del imperio azteca, esta bebida perdió su importancia religiosa, sin embargo, se siguió consumiendo por su importancia nutricional, inclusive como sustituto de agua (Castro y Guerrero, 2013).

Hace algunos años comúnmente se vendía en pulquerías con una escasa higiene. Pero, gracias a los esfuerzos que se han hecho por intentar revivir su consumo, actualmente se comercializa en restaurantes, donde muchas veces es considerado como una bebida gourmet. Desde 2009, la empresa “Productos Naturales de Agave, S.A. de C.V.”, exporta pulque natural y de sabores en latas a Estados Unidos de América y Alemania (Servin, 2009).

Escamoles (del náhuatl “*Azcamolli*”): son larvas de las hormigas *Liometopun apiculatum* y *Liometopun occidentale* que han sido consumidas desde la época prehispánica por diversos grupos étnicos. Se considera un platillo exótico cuya importancia radica en su alto valor nutritivo por ser fuente de proteínas y

carbohidratos, además de ser una fuente importante de trabajo para los pobladores de las zonas áridas y semiáridas donde se recolectan. El consumo de escamoles se realiza principalmente en grandes ciudades como la Ciudad de México y la zona metropolitana, en los estados de Puebla, Tlaxcala, Morelos, Hidalgo, y en el extranjero como Nueva York, Tokio, San Francisco, etc., en donde alcanzan precios muy altos en el mercado (García *et al.*, 2010).

Gusano rojo (*Hypochoeris agavis* B.): también se le conoce como “Chinicuil”, es una plaga mayormente relacionada con *A. salmiana*. El estado larval lo pasa en la base de las hojas pegadas al tronco (tallo), viven en grupos dentro del tejido vegetal y conforme van creciendo emigran hacia el centro del tallo (piña) formando galerías, en las cuales se desarrollan durante medio año aproximadamente. Si el daño a la piña es severo puede no ser utilizada para producir mezcal. Se recolecta en los meses de septiembre; las plantas donde se ubica presentan falta de vigor y un color amarillento en la punta de las pencas (García *et al.*, 2010; Nieto *et al.*, 2016).

Este ha sido consumido durante mucho tiempo por diversas culturas étnicas, sin embargo en la actualidad ha tenido un auge en la gastronomía mexicana. Se consume frito o molido para hacer salsas, además de ser el distintivo de los mezcales, ya que se deposita en el envases de estos (Morales y Esparza, 2002), o bien, con preparaciones con sal, dando el sabor característico del mezcal.

Gusano blanco (*Acentrocne me hesperiaris*): es la larva de una mariposa cuya oviposición de huevecillos se realiza en el envés de las pencas y se presenta de octubre a noviembre. La emergencia de las larvas ocurre entre diciembre y enero. Las larvas empiezan hacer galerías del tercio superior de la penca para salir al exterior y continuar haciendo galerías en la base de la penca. La larva bien desarrollada se dirige a la base de las pencas para pupar. El daño en agave tequilero se manifiesta en una reducción en el crecimiento de la planta, una marchitez precoz, áreas necróticas en las pencas y muerte de éstas.

Es un insecto con un alto valor nutritivo y es muy apreciado en México, Estados Unidos de América y Europa por su exquisito sabor. Se distribuye y extrae en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Veracruz, Querétaro, Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla. El principal mercado de este insecto es la industria restaurantera de la Ciudad de México. Se consumen asados con sal y limón, o preparados en diferentes guisos (García *et al.*, 2010; Morales y Esparza, 2002).

Como ya se mencionó, el agave representa uno de los recursos naturales de mayor importancia desde el punto de vista económico, social y agroecológico en México. Las principales especies de agaves que se cultivan son el azul y el espadín. Sin embargo la mayoría de especies son silvestres y prosperan particularmente en los bosques de pino, los encinares, las selvas y los pastizales de las regiones templadas, aunque el mayor porcentaje, se concentra en las regiones áridas y semiáridas del país (Illsley *et al.*, 2004). Respecto a los magueyes mezcaleros, unas 20 especies o más, se encuentran en todos los estados de la República, excepto en Tabasco y la península de Yucatán, aunque en años recientes se ha hecho mezcal a partir del maguey henequenero (García *et al.*, 2010).

En la Tabla 2 se muestra la producción de agave en México del año 2011 al 2016, de acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), es importante destacar que hay una disminución en la superficie total sembrada con agave en el país, sin embargo, la superficie cosechada y la producción han ido en aumento, esto gracias a las iniciativas y esfuerzos que se han hecho para su estudio, conservación y desarrollo, además de que ha habido un nuevo auge de muchos productos derivados de esta planta, como el pulque, por lo que se busca aprovechar al máximo este recurso natural tan importante en México.

Tabla 2. Producción anual de agave en México (SIAP, 2017).

Año	Superficie Sembrada (Ha)	Superficie Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)
2011	165,310.38	19,731.10	1,703,852.61	86.35	1,132.30
2012	137,626.27	19,876.07	1,686,337.41	84.84	1,258.54
2013	128,133.28	23,697.11	1,899,735.14	80.17	1,712.51
2014	120,339.51	27,689.34	2,408,884.28	87.00	4,208.27
2015	108,119.83	21,731.41	1,846,345.07	84.96	4,337.73
2016	111,420.03	21,892.01	1,875,931.43	85.69	4,575.65

3.1.2. Características del metabolismo del agave

Las plantas que crecen en hábitats áridos, como es el caso del agave, desarrollan procesos adaptativos al estrés ambiental generado por la escasa disponibilidad de agua o CO₂, tal como el “Metabolismo Ácido de las Crasuláceas” (CAM, por sus siglas en inglés), en donde las plantas fijan el CO₂ por la noche, lo almacenan en vacuolas y durante el día lo asimilan en los cloroplastos. Debido a esto se reduce considerablemente el consumo y la pérdida de agua por transpiración.

Los fructanos son un producto fotosintético de CAM y actúan como osmoprotectores durante la sequía o el congelamiento, además su principal función es el almacenamiento de energía y actúan en tolerancia al estrés biótico en plantas (Conceição *et al.*, 2013).

3.1.3. Composición

La composición de las plantas de agave depende de las condiciones de crecimiento de la misma. En las Tablas 3 y 4 se muestra la composición del *Agave tequila Weber* variedad *azul*, resultado de una investigación realizada por Praznik y colaboradores en el año 2002. Cabe destacar que está compuesto mayormente por carbohidratos del tipo fructano, con diferentes grados de polimerización.

Tabla 3. Composición de *Agave tequila Weber* variedad *azul* (Praznik *et al.*, 2002).

	Piña y base de la penca (%)	Penca, zona media (%)
Carbohidratos	22.3 – 22.7	9.0
Proteína	1.4 - 1.4	0.35

Fibra dietética insoluble	5.9 - 7.1	6.8
Minerales	1.7 - 1.9	0.7
Materia seca	31 - 31.5	17.4

Tabla 4. Tipos de carbohidratos en *Agave tequila Weber* variedad azul (Praznik *et al.*, 2002).

	Piña y base de la penca (%)	Penca, zona media (%)
Monosacáridos (G, F)	Ausentes	5.2
Sacarosa	0.5 - 1.3	9.3
Fructooligosacáridos DP 3-10*	35 - 43	60
Fructanos DP 11-60*	56 - 64	30

* El DP es el grado de polimerización (por sus siglas en inglés) de la cadena de fructosa, es decir, cuántas unidades de fructosa componen el polímero.

En las plantas del género *Agave* se han encontrado diversas estructuras de fructanos: en *Agave americana*, la inulina fue identificada como el principal carbohidrato de reserva. Los tallos de *Agave Veracruz* y de *Agave tequilana* almacenan una mezcla compleja de fructooligosacáridos, inulinas, neoserias de inulinas y fructanos ramificados (Ulloa *et al.*, 2010).

3.2. Fructanos

Los fructanos son polímeros de varias unidades de fructosa, unidas a través de enlaces glicosídicos (β -2-1), y un residuo de glucosa, el cual a su vez, está unido por un enlace tipo sacarosa (α -1,2).

Después del almidón, los fructanos son los polisacáridos no estructurales más abundantes en la naturaleza, presentes en muchas especies de plantas, en hongos del tipo *Aspergillus sp.* y en bacterias (Madrigal y Sangronis, 2007). Estos polímeros están presentes en plantas como mezclas heterogéneas y su principal función es la reserva de energía, sin embargo, la cantidad y el tipo de fructanos encontrados depende del hábitat y condiciones de crecimiento de la planta.

Existen principalmente 5 clases de fructanos: inulina, levana, mezclas de fructanos ramificados, neoserias de inulina y neoserias de levano, los cuales se diferencian por el grado de polimerización, la presencia de ramificaciones, el tipo de enlace

entre las unidades de fructosa adyacentes y la posición del residuo de glucosa. En la Figura 1 se muestra la estructura química de los distintos tipos de fructanos.

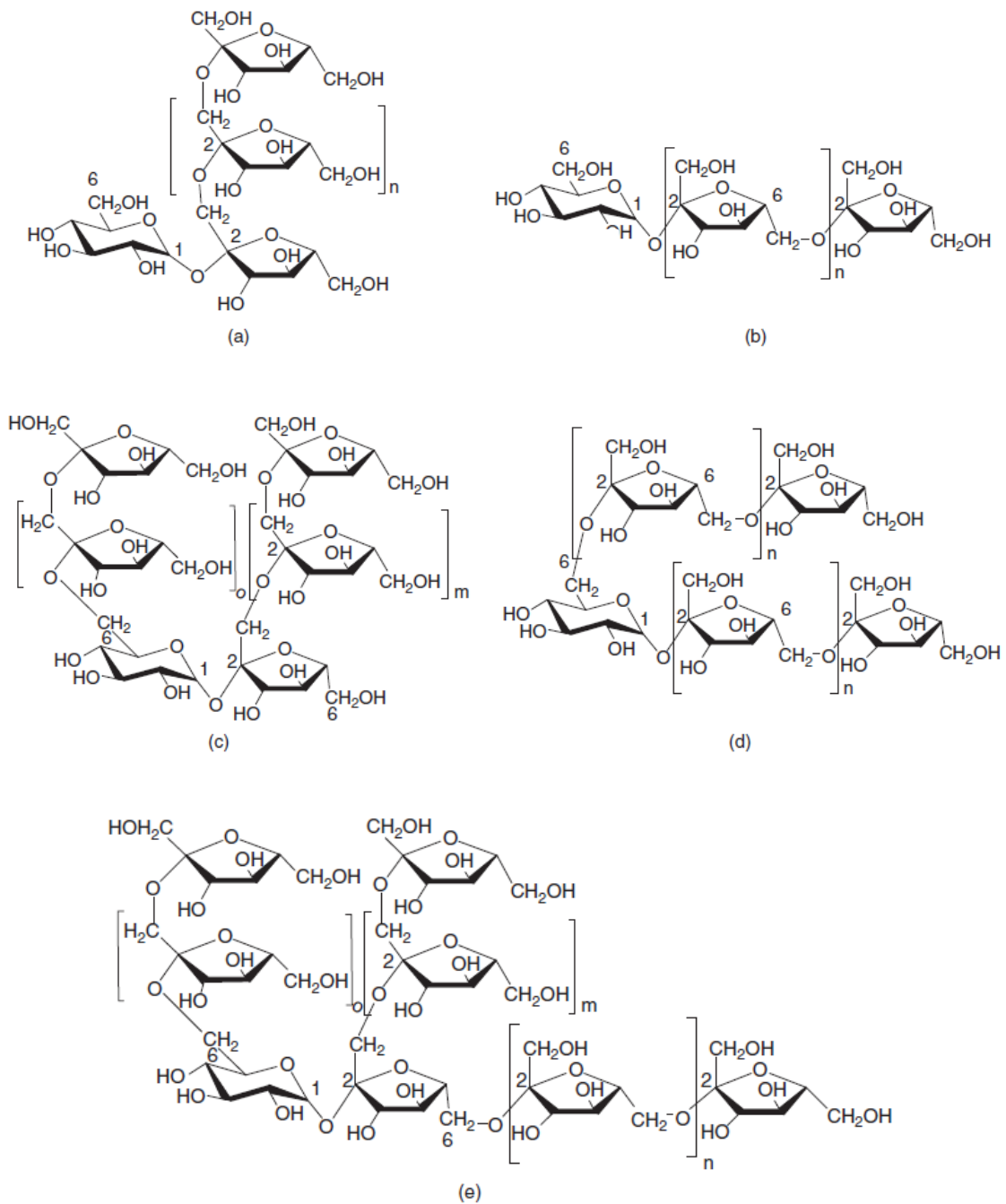


Figura 1. Estructuras de los diferentes tipos de fructanos (a) inulina (b) levana (c) neoserias de inulina (d) neoserias de levano (e) fructanos ramificados (Arrizón *et al.*, 2014)

Cada vez existe más evidencia experimental que revela la importante función de los fructanos en la protección contra la sequía y el frío en las plantas. A diferencia de las fuentes microbianas, los fructanos de las plantas son principalmente solubles en agua, tienen un grado de polimerización (DP) que varía de 3 a 120 unidades de fructosa, además son estructuralmente más diversos y complejos (Conceição, *et al.*, 2013).

3.2.1. Inulina

La inulina es un polímero de fructosa, perteneciente a la familia de los fructanos, que consiste en cadenas lineales de ésta con enlaces β -2,1 y un residuo terminal de glucosa unido a través de un enlace de tipo sacarosa (Cazetta *et al.*, 2010).

La inulina se extrae de plantas frescas, tomando precauciones para prevenir la hidrólisis ácida del polímero, además, las plantas que naturalmente acumulan fructanos también poseen la enzima que puede degradarlo con el fin de remover y utilizar el carbono almacenado, lo cual representa un gran inconveniente para la extracción de inulina. Debido a dicha actuación enzimática, el DP de la inulina varía durante el almacenamiento de la planta.

Este fructano es el más conocido y estudiado, así como el número y distribución de diferentes oligómeros, que se demostró, son característicos de la inulina producida por plantas (Conceição *et al.*, 2013). El grado de polimerización de la inulina producida por plantas depende de muchos factores: de la especie, del clima y condiciones de crecimiento, la madurez de la planta al cosecharla y el tiempo de almacenamiento (Chi *et al.*, 2011). La inulina de achicoria tiene un DP medio (~12), mientras que la de alcachofa y el cardo abadejo (*Echinops ritro*; planta europea de la familia *Asteracea*) tienen un alto DP (más de 100).

La estructura química de éste fructano, como ya se mencionó anteriormente, depende en gran medida de la especie de la planta. Por ejemplo, la inulina de *Agave tequilana* tiene una cadena principal unida por enlaces 2,1- β -D-fructosilo y cadenas laterales o ramificaciones con enlaces 2,6- β -D-fructosilo. A la inulina proveniente de agaves le ha denominado Agavina (Ávila *et al.*, 2011).

3.2.2. Agavina

La primera estructura de fructanos propuesta para las plantas de agave, fue para el caso particular del *Agave Veracruz*. De acuerdo con esto, los fructanos presentes en este agave están constituidos por una cadena principal con enlaces β -2,1-fructosilo, en la cual hay múltiples ramificaciones y se alargan con n residuos unidos por enlaces β -2,6-fructosilo. Para el caso de *Agave tequilana* se ha propuesto una estructura similar. La estructura general de estas especies constituye una estructura graminante, en su mayoría ramificada. En cada punto ramificado la cadena podría alargarse en dos unidades fructosil. En la Figura 2 se muestra la estructura propuesta por López y Mancilla en 2007 para dichos fructanos. Estas estructuras graminianas de agaves se llaman agavinas.

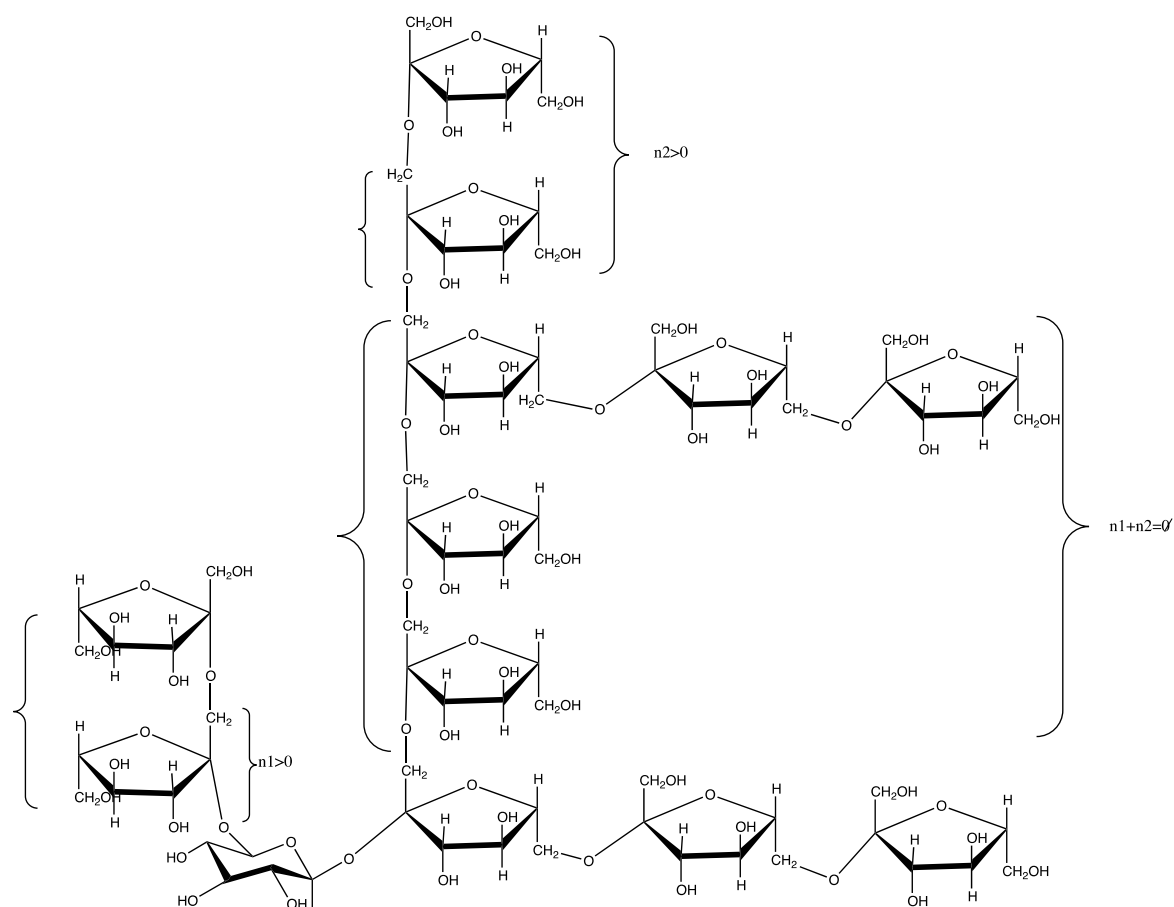


Figura 2. Estructura propuesta para la inulina proveniente de *Agave tequilana* Weber var. azul (agavina) (López y Mancilla, 2007).

3.2.3. Subproductos de la inulina

La hidrólisis de la inulina puede generar compuestos de valor agregado como:

- Jarabes de alta fructosa, que se emplea como edulcorante en la industria de los alimentos gracias a que presenta de 1.5- 2 veces más dulzor que la sacarosa, 2.5 veces más dulzor que la glucosa y es 2 veces más soluble que esta última, es menos cariogénica y posee un menor nivel calórico, además no presenta resabio amargo como otros edulcorantes artificiales (Kango y Jain, 2011; Salcedo *et al.*, 2009).
- Fructooligosacáridos (FOS), que son fructanos con un DP menor a 10 y son empleados en la industria para la formulación de alimentos funcionales, especialmente por su función como prebiótico y fibra dietética (Golunski y Astolfi, 2011).

3.3. Beneficios de los fructooligosacáridos (FOS)

Existen diversas propiedades benéficas a la salud que se han asociado a los fructooligosacáridos, entre ellas el efecto como prebióticos, protección contra infecciones entéricas, activan la función intestinal, asisten la digestión y absorción de nutrientes, estimulan la respuesta inmune, actividad reductora de colesterol, efecto positivo en la absorción de calcio, reducción de la concentraciones séricas de fosfolípidos y triglicéridos, inmunomodulación intestinal, etc. (Ávila *et al.*, 2011)

3.3.1. Efecto prebiótico

Se define como prebiótico a los ingredientes de alimentos que no son digeribles y brindan efectos benéficos a la salud del huésped mediante una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias del colon (Gibson y Roberfroid, 1995). Durante el proceso de fermentación de ciertos fructanos del tipo oligofructosa o inulina se forman ácidos grasos de cadena corta, los cuales estimulan el crecimiento de las células de la mucosa colorrectal, retarda la atrofia de la mucosa y disminuye el riesgo de transformación maligna del colon. Entre las bacterias intestinales estimuladas por el consumo de

prebióticos, las más importantes las bifidobacterias y los lactobacilos (Ulloa *et al.*, 2010).

Los efectos prebióticos de los fructooligosacáridos del tipo inulina, es decir, aquellos que tienen principalmente enlaces β -(2,1), han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, se ha prestado menos atención a los fructooligosacáridos de tipo levano, los cuales presentan principalmente enlaces β -(2,6) o una mezcla de fructanos. Se ha reportado que los levanos actúan como prebióticos, estimulando el crecimiento de bacterias ácido- lácticas (BAL) en modelos animales, además de mostrar actividad antitumoral (Ávila *et al.*, 2011).

En 2010, Gómez y colaboradores reportaron que el fructano del agave tiene actividad prebiótica. Se demostró la función prebiótica del fructano obtenido de *Agave tequilana* mediante cultivos anaerobios inoculados con lodos fecales humanos; los resultados obtenidos muestran un aumento en el número de bifidobacterias y lactobacilos, esto como consecuencia del impacto diferencial de este tipo de carbohidratos en la microbiota del tracto digestivo humano. Debido a la complejidad estructural de los FOS provenientes del agave, proporcionan dicho efecto prebiótico, además de propiedades funcionales interesantes en comparación con los FOS del tipo inulina que están disponibles comercialmente (Ávila *et al.*, 2011). Debido a esto es importante realizar una investigación intensiva en búsqueda de endofructanasas que sean capaces de hidrolizar a los fructanos provenientes del agave.

3.4. Inulinasas

La vida depende de una gran cantidad de reacciones químicas, las cuales están mediadas casi en su totalidad por un conjunto de catalizadores biológicos: las enzimas (Voet y Voet, 2006). Las enzimas aumentan la velocidad de la(s) reacción(es) en la(s) que participan y sin ellas, procesos como la oxidación de la sacarosa, del cual obtenemos la energía requerida por nuestras funciones

celulares, no podrían llevarse a cabo en una escala útil de tiempo (Lehninger *et al.*, 2009).

Las enzimas son proteínas que tienen un gran poder catalítico, a menudo muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos, poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos y funcionan en soluciones acuosas en condiciones moderadas de temperatura, presión y pH, además de capacidad de regulación, ya que muchas enzimas varían su actividad catalítica en respuesta a la disponibilidad de diferentes sustratos y productos. En general, son pocos los catalizadores no biológicos que posean todas estas propiedades (Lehninger *et al.*, 2009).

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan. Cabe mencionar que todas las enzimas tienen números y nombres formales del sistema EC (por sus siglas en inglés, Enzyme Commission numbers) y la mayoría tiene también nombres comunes.

Las enzimas que tienen acción sobre la inulina pertenecen a la familia de las glicosilhidrolasas (GH32), las cuales representan a miles de enzimas como las inulinasas, invertasas, 1-exohidrolasas, fructosiltransferasas, por mencionar algunas (Singh *et al.*, 2017).

Las inulinasas (E.C. 3.2.1.7) son fructosilhidrolasas, encargadas de hidrolizar los enlaces β -(2-1) fructosil-fructosa en la inulina, generando fructosa y glucosa como productos. Es por ello, que la inulina es un sustrato potencial para la producción de fructosa y fructooligosacáridos. La especificación estructural de la inulina o de los FOS puede expresarse como GF_n y/o F_m donde n o m representa unidades de fructosa y estas pueden variar de 2 a 60 (Ruano, 2012; Singh *et al.*, 2017).

De acuerdo con la reacción regioselectiva y el modo de acción sobre la inulina, las inulinasas se clasifican en dos categorías: exoinulinasa y endoinulinasa. La exoinulinasa lleva a cabo la degradación de la inulina desde su extremo terminal no reductor para liberar unidades de fructosa, mientras que la endoinulinasa rompe los enlaces glicosídicos al interior de la molécula de inulina de una forma

arbitraria, obteniendo como producto fructooligosacáridos de diferentes longitudes de cadena (Singh *et al.*, 2017).

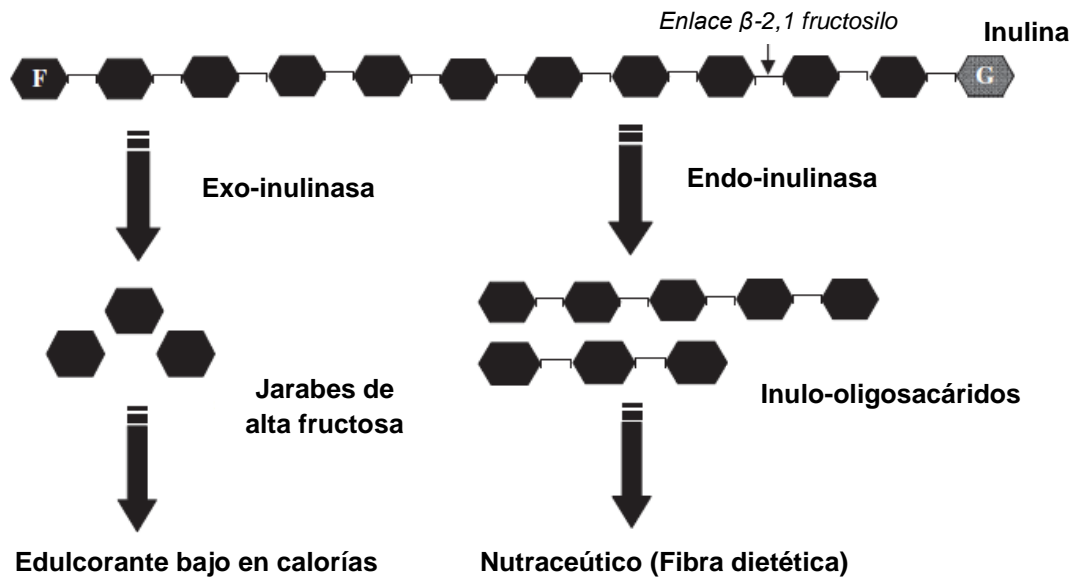


Figura 3. Mecanismo de acción de la inulinasa (Kango y Jain, 2011).

Las características y las propiedades bioquímicas de una enzima dependen principalmente de su fuente y origen. La inulinasa es producida por una amplia gama de organismos, incluyendo plantas, bacterias, hongos y levaduras. Las fuentes animales y vegetales no son exploradas comercialmente debido a su pequeño rendimiento enzimático. Por lo tanto, las fuentes microbianas como hongos filamentosos, levaduras y bacterias se han convertido en una elección eminente para la producción de inulinasa. Además, las fuentes microbianas proporcionan ventajas debido a su fácil manejo, cultivo y manipulación genética. Las inulinasas son una clase versátil de enzimas industriales que se utilizan principalmente para la producción de productos derivados de carbohidratos como el jarabe de alta fructosa, fructooligosacáridos, bioetanol, biocombustibles, ácido cítrico, ácido láctico, etc. (Kango y Jain, 2011; Singh *et al.*, 2017).

Entre los hongos, *Aspergillus* y *Penicillium* son los géneros prominentes, mientras que para las levaduras, *Kluyveromyces* es el género más estudiado para la producción de inulinasas. En la Tabla 5 se muestran algunas características y

fuentes de algunas inulinasas microbianas reportadas por varios grupos de investigación.

Tabla 5. Fuentes y propiedades de algunas inulinasas microbianas (Kango y Jain, 2011).

Microorganismo	Acción	Temperatura (°C)	pH	Referencia
Hongos				
<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz		45	4.0, 4.8	de Souza-motta et al., 2005
<i>Aspergillus awamori</i> var. 2250	Endo		4.5	Arand et al., 2002
<i>Aspergillus niger</i>		50	6	Mutanda et al., 2008
<i>A. niger</i> M89		55-60	4.0– 5.0	Ji et al., 1998
<i>A. niger</i>		55	4.35	Derycke, 1981
<i>A. niger</i> 12				Nakamura et al., 1978
II		45	5.0	
III		55	5.3	
<i>A. niger</i> 319		60	5.0	Chen et al., 1997
<i>A. fumigatus</i>				
I	Exo	60	5.5	Gill et al., 2004
II	Exo	60	6.0	Gill et al., 2006
<i>Aspergillus ficcum</i> JNSP5-06				Chen et al., 2009
I	Exo	45	4.5	
II	Exo	45	4.5	
III	Exo	45	4.5	
IV	Endo	45	5.0	
V	Endo	45	5.0	
<i>Aspergillus ficcum</i>	Exo	50	5.4	Mutanda et al., 2009
<i>Aspergillus ficcum</i>	Endo			Uhm et al., 1999
<i>Alternaria arternata</i>		55	4.5	Hamdy, 2002
<i>Chaetomium</i> sp. C34	Endo	55	6.0	Zhang et al., 2004a
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	Exo			Ferreira et al., 1991
<i>Fusarium oxysporum</i>				Gupta et al., 1988
I (Micelial)				
II (Extracelular)		30	5.8	
		37	6.2	
<i>Penicillium janczewskii</i>	Exo	60	4- 5.5	Pessoni et al., 2007
<i>Penicillium janczewskii</i>		55	5	Pessoni et al., 1999
<i>Penicillium</i> sp. TN-88		55	4.0	Moriyama et al., 2002
<i>Penicillium</i> sp.				Nakamura y Nakatsu, 1977
I		45	4.5	
II		55	5.0	
III		45	4.0	
<i>Rhizopus</i> sp. TN-96		40	5.5	Ohta et al., 2002
Levaduras				
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	Exo	50	5	Sheng et al., 2008
<i>Debaryomyces phaffii</i>		50	4.0	Demeulle et al., 1981
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y1	Exo	55	5.5	Yuan y Bai, 2008
<i>Kluyveromyces</i> sp.		55	4.4	Wang et al., 2000

<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85	Exo	52	4.6	Wei et al., 1997
<i>Pichia guilliermondii</i>	Exo	60	6	Gong et al., 2007
Bacterias				
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>		50	6.0	Uchiyama et al., 1975
<i>Bacillus polymyxa</i> MGL21		37	7	Kwon et al., 2003
<i>Bacillus subtilis</i>	Exo	55	5.5	Wanker et al., 1995
<i>Bacillus subtilis</i> 403A				Vullo et al., 1991
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697		37	6.0	Warchol et al., 2002
<i>Sterptomyces</i> sp.	Exo	70	6	Sharma y Gill, 2007
<i>Xanthomonas oryzae</i> No. 5	Endo	50	7.5	Cho y Yun, 2002

3.5. *Kluyveromyces marxianus*

De forma general, las levaduras han sido ampliamente utilizadas tanto en la biotecnología tradicional como en la moderna para la producción de alimentos, bebidas, productos químicos finos y reactivos farmacéuticos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más conocida debido a su importancia en la elaboración de bebidas fermentadas como cerveza, vino y sidra, sin embargo existe una gran diversidad de levaduras que son importantes roles en la biotecnología como *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debarromyces* y *Yarrowia* (Lane y Morrissey, 2010).

Kluyveromyces marxianus es una levadura de la familia de los hemiascomycetos, está relacionada filogenéticamente con *S. cerevisiae* y es hermana de la especie más conocida, *Kluyveromyces lactis* (Lachance, 1998; Llorente *et al.*, 2000). La principal característica común de *K. lactis* y *K. marxianus* es la capacidad de asimilar lactosa y utilizar este azúcar como fuente de carbono (Lane y Morrissey, 2010).

3.5.1. Taxonomía y filogenia de *K. marxianus*

Antes del desarrollo de la biología molecular, la clasificación de las levaduras se basaba principalmente en la morfología y la fisiología, en particular la capacidad de asimilar determinadas fuentes de carbono. Las limitaciones obvias de estos métodos fomentaron la aplicación de enfoques moleculares, pero diferentes técnicas que a menudo generaron hallazgos conflictivos o no concluyentes. Posteriormente, Kurtzman y sus colaboradores (1998), establecieron una variación

en una región de la subunidad grande (25S) del ADNr como el punto de referencia para la categorización de los géneros de levaduras y sus cepas. La aplicación de esta técnica dio como resultado una importante reorganización y reclasificación de las levaduras previamente clasificadas como parte del género *Saccharomyces*, siendo *Kluyveromyces* el género más afectado (Lane y Morrissey, 2010).

Debido a la naturaleza altamente polifilética del género *Kluyveromyces* original, requirió el cambio de nombre de la mayoría de sus especies y actualmente cuenta únicamente con seis especies. En la Figura 4 se muestran las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Kluyveromyces*, también incluye *Saccharomyces cerevisiae* como comparativo. Además se presentan algunas características importantes de *K. marxianus* que diferencian a esta levadura de otras especies del género *Kluyveromyces*.



Figura 4. Relación filogenética de *Kluyveromyces marxianus* con otras levaduras (Lane y Morrissey, 2010).

* $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad de crecimiento del microorganismo.

3.5.2. Aplicaciones de *Kluyveromyces marxianus*

K. lactis ha sido la especie de investigación predominante dentro del género *Kluyveromyces*, principalmente para estudios sobre el metabolismo de la lactosa y como un modelo para levaduras no convencionales (Fukuhara, 2006; Schaffrath y Breunig, 2000).

Por otra parte, *K. marxianus* ha sido usada más ampliamente por la industria, principalmente porque posee características útiles para aplicaciones biotecnológicas. Estas características incluyen la capacidad de asimilar carbohidratos clave como lactosa e inulina, una tasa de crecimiento extremadamente rápida en comparación a otros microorganismos eucariotes, con tiempos de generación típicos de ~70 minutos, es termotolerante, ya que tiene la capacidad de crecer hasta 52° C. Además posee una alta capacidad secretora de enzimas líticas, por ejemplo; la inulinasa, la cual es una enzima endógena de *K. marxianus* (Lane y Morrissey, 2010; Castillo y Chamy, 2010). En la Tabla 6 se muestran ejemplos de la gama de aplicaciones biotecnológicas de algunas cepas de *K. marxianus* estudiadas para dichas aplicaciones.

Tabla 6. Principales aplicaciones de *K. marxianus* (Lane y Morrissey, 2010).

Aplicación	Cepa(s) especificada(s)	Referencia
Producción de etanol a partir de suero de leche o lactosa		
Inmovilizado y células suspendidas	<i>K. marxianus</i> NBRC 1963	Oda y Nakamura (2009)
Fermentaciones continuas y por lotes	<i>K. marxianus</i> DSMZ-7239 <i>K. marxianus</i> MTCC 1288 n/a <i>K. marxianus</i> IMB3	Ozmihci y Kargi (2007) Zafar y Owais (2006) Kourkoutas <i>et al.</i> (2002) Brady <i>et al.</i> (1997)
Producción de biomasa o proteína unicelular		
Fermentaciones continuas, por lotes y por lotes alimentados	<i>K. marxianus</i> ZIM 1867	Pas <i>et al.</i> (2007)
Biomasa rica en nucleótidos y hierro	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Schultz <i>et al.</i> (2006)
Composición de autolisado comparable a <i>S. cerevisiae</i>	<i>K. fragilis</i> NRS 5790 <i>K. marxianus</i> FII 510700 <i>K. marxianus</i> CBS 6556 <i>K. marxianus</i> ATCC1002; CBS 7894	Ghaly <i>et al.</i> (2005) Lukondeh <i>et al.</i> (2005) Revillion <i>et al.</i> (2003) Pinheiro <i>et al.</i> (1998)
Producción de enzimas endógenas		

β -xilosidasa	n/a	Rajoka (2007)
β -galactosidasa	<i>K. marxianus</i> CBS 7894	Pinheiro <i>et al.</i> (2003)
β -glucosidasa	<i>K. fragilis</i> IpF1	Szczodrak (2000)
Inulinasa	<i>K. marxianus</i> CDBB-L278	Cruzguerrero <i>et al.</i> (1995)
	<i>K. marxianus</i> Y1	Yuan y Bai (2008)
Expresión heteróloga de enzimas		
Celulasas termoestables	<i>K. marxianus</i> NBRC 0219; NBRC 0541; NBRC 0617; NBRC 1777	Hong <i>et al.</i> (2007)
Lactato deshidrogenasa	<i>K. marxianus</i> KM1	Pecota <i>et al.</i> (2007)
Endopoligalacturonasa	<i>K. marxianus</i> BKM Y-719	Siekstele <i>et al.</i> (1999)
α -galactosidasa	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Bergkamp <i>et al.</i> (1993)
Industria de alimentos		
Emulsificantes naturales-manoproteínas	n/a	Vasallo <i>et al.</i> (2006)
	n/a	Lukondeh <i>et al.</i> (2003)
Compuestos aromáticos	<i>K. marxianus</i> ATCC 10024	Medeiros <i>et al.</i> (2000)
Levadura de panadería	<i>K. marxianus</i> NRRL-Y-2415; NRRL-Y-1109	Caballero <i>et al.</i> (1995)
Aplicaciones ambientales		
Tratamiento de desperdicios de papel y lodo	<i>K. marxianus</i> Y01070	Kadar <i>et al.</i> (2004)
Eliminación de lactosa/ otros azúcares de aguas residuales	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-610	Hang <i>et al.</i> (2003)
Biosorción de colorantes	<i>K. marxianus</i> IMB3	Meehan <i>et al.</i> (2000)
Recuperación de metales pesados de aguas residuales	n/a	Pal <i>et al.</i> (2009)

Debido a su capacidad para asimilar lactosa, el cual es un rasgo ausente en *S. cerevisiae*, es frecuente encontrar a *K. marxianus* en fuentes lácteas como leches fermentadas, yogur y quesos. Gracias a su larga historia de asociación segura con productos alimenticios esta levadura obtuvo el estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés) y QPS (presunción de seguridad calificada, por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos y la Unión Europea, respectivamente. Esta designación significa que hay pocas restricciones en la aplicación y mejora en gran medida su potencial en el sector de la biotecnología (Lane y Morrissey, 2010).

Para poder estudiar a la inulinasa producida por *K. marxianus* AZ8 se requiere purificarla, es decir, separar la fracción con actividad inulinolítica, del resto de los residuos del medio de cultivo y de los metabolitos producidos durante el crecimiento de la levadura.

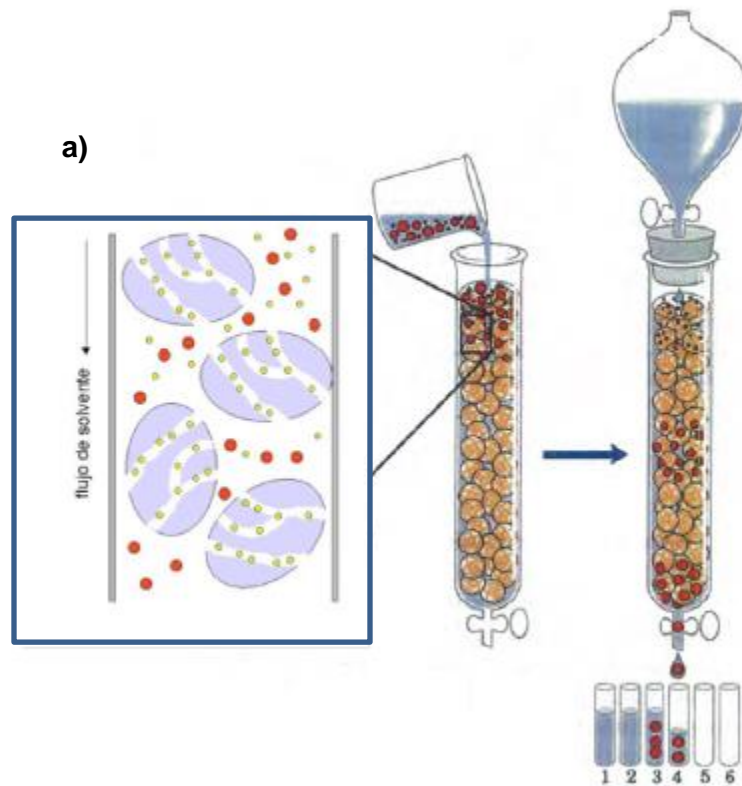
3.6. Purificación de proteínas por cromatografía de exclusión molecular

En 1903 el botánico ruso Mikhail Tswett describió la separación de los pigmentos de hojas vegetales en solución mediante el uso de adsorbentes sólidos y denominó dicho proceso cromatografía (del griego *chroma*, color y *graphein*, escribir), quizá por las bandas coloreadas que se formaban en los adsorbentes a medida que los componentes de la mezcla se separaban unos de otros. Los métodos modernos de separación se basan en gran medida en los métodos cromatográficos.

La cromatografía de exclusión molecular permite la separación de las moléculas en función de su peso molecular y forma. El proceso tiene lugar al pasar las moléculas a través de una matriz porosa, formada por diferentes gránulos de un material esponjoso, de manera que, en general, las moléculas que tienen menor tamaño realizan su recorrido pasando a través de los poros de la matriz, mientras que las moléculas de mayor tamaño se mueven de manera más rápida, ya que transitan por los espacios entre los gránulos. En la Figura 5 (a) se muestra un esquema que ejemplifica lo mencionado anteriormente para este tipo de cromatografía. Evidentemente, la forma de cada molécula también influirá en su capacidad de recorrer más lenta o más rápidamente la matriz. Esta técnica también recibe el nombre de cribado molecular, de filtración en gel o de permeabilidad. Se han utilizado un gran número de materiales, en donde se varía el tamaño del poro, lo que permite discriminar entre diferentes tamaños de moléculas, según las moléculas que se deseen separar. Los materiales más usuales para esta cromatografía son: Sephadex® (dextrano), Sepharose®, Bio-Gel A® y Savagac® (agarosa), Bio-GelP® (poliacrilamida), Bio-Beads S® (poliestirenos), Bio-Glas® (vidrio poroso) y Porasil® (sílice porosa) (Roca *et al.*, 2003).

Un ejemplo característico de un material muy utilizado es este tipo de cromatografía es el Sephadex®, que se obtiene por entrecruzamiento entre el polisacárido dextrano y la epíclorhidrina, convirtiéndose de esta manera en

dextrano insoluble en agua. Al tener un carácter hidrofílico, se hincha rápidamente en medios acuosos, y forma los gránulos de gel que permiten el cribado molecular. Los enlaces cruzados no son regulares, sino que hay un componente debido al azar, lo que provoca la existencia de una gama amplia de tamaño de poro. En la Figura 5 (b) se muestra una micrografía de una esfera de dextrano, donde se pueden observar los poros formados debido al entrecruzamiento del polímero. Esto determina que las moléculas, según su tamaño, puedan penetrar en el gel. A medida que aumenta el tamaño de las moléculas, su capacidad de penetración en el gel será menor, por lo que cuanto más grande sea una molécula más rápidamente se eluirá, es decir, las moléculas de mayor tamaño saldrán primero de la columna, mientras que las últimas en salir serán las más pequeñas (Roca *et al.*, 2003).



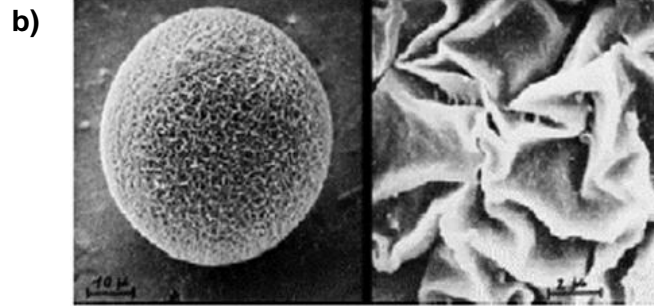


Figura 5. a) Esquema de una cromatografía de exclusión molecular (Lehninger *et al.*, 2009) **b)** Microscopía de una esfera de dextrano (Roca *et al.*, 2003).

Esta técnica de separación puede emplearse, además, para la determinación de las masas moleculares de distintas proteínas, ya que existe una relación lineal entre el volumen de elución relativo de una sustancia y el logaritmo decimal de su masa molecular en un intervalo considerable de masas moleculares. Si se presenta, para una determinada columna de filtración en gel, el volumen de elución relativo y la masa molecular de diferentes moléculas, se obtiene una recta que puede utilizarse en la determinación de la masa molecular de una molécula desconocida (Roca *et al.*, 2003).

IV. JUSTIFICACIÓN

El agave es una planta de suma importancia para México y es aprovechado principalmente por la industria tequilera para la obtención de la bebida destilada representativa del país, el tequila. Por cada litro de tequila producido se generan aproximadamente 12 litros de desechos orgánicos como son aguas residuales y más de 300 Mton/año entre hojas de agave y bagazo (Sánchez, 2014), sumando además los residuos generados por las demás industrias, como la mezcalera, que aunque son en menor cantidad comparada con la tequilera, siguen siendo una fuente importante de estos desechos.

Estos residuos, y en particular, las hojas de agave, contienen una cantidad considerable de carbohidratos (Tablas 3 y 4), los cuales pueden aprovecharse para obtener productos de interés como jarabes de alta fructosa y

fructooligosacáridos a través de la hidrólisis de los carbohidratos presentes, o bien, enzimas que sean capaces de degradar dichos fructanos ramificados contenidos para la obtención de estos productos de valor agregado, por lo que es de suma importancia aprovechar esta valiosa fuente de inulina en procesos biotecnológicos.

Son diversos los estudios sobre la producción de inulinasas por *Kluyveromyces marxianus* en donde se han utilizado distintas fuentes de carbono como sacarosa, fructosa, extractos de plantas como alcachofa, yacón, inulina de achicoria y de otras fuentes de la misma, además se han analizado las condiciones de crecimiento del microorganismo en dichas fuentes de carbono para aumentar la producción de la enzima y su actividad, dando resultados distintos para cada cepa en estudio. Sin embargo, los estudios en donde se emplea inulina de agave como fuente de carbono son pocos, y es de gran interés ya que como se mencionó antes, hay una diferencia estructural en este tipo de fructano proveniente del agave debido a la presencia de ramificaciones, por lo que es importante encontrar las mejores condiciones para la producción de esta enzima capaz de hidrolizar a este fructano ramificado presente en *Agave tequilana Weber variedad azul*.

V. HIPÓTESIS

Al encontrar las mejores condiciones de crecimiento de la cepa en estudio, se aumentará la producción y actividad de la inulinasa ACH1 proveniente de *K. marxianus* AZ8.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Determinar las mejores condiciones de crecimiento de *K. marxianus* cepa AZ8 para la producción y purificación de la enzima de interés.

6.2. Objetivos particulares

- Identificar la fuente de carbono que favorezca el mayor crecimiento de la cepa AZ8 productora de inulinasas.
- Evaluar el efecto del pH inicial del medio de cultivo y la temperatura de incubación en la producción y actividad de la inulina ACH1.
- Valorar el efecto de la adición de metales en el medio de cultivo para la producción o actividad de la enzima de interés.
- Purificar a la inulina ACH1.
- Verificar la pureza de la enzima mediante técnicas electroforéticas.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Preparación de medios de cultivo

De acuerdo con el estudio a realizar, se prepararon medios de cultivo líquidos o sólidos, cuya composición se muestra en la Tabla 7. La formulación del medio fue estudiada en un trabajo previo (Robert, 2013).

Tabla 7. Composición del medio de cultivo.

Componente	Cantidad (% m/v)
Inulina de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul *	0.5
Extracto de levadura	0.2
Sulfato de amonio	0.1
Cloruro de potasio	0.05
Fosfato monobásico de sodio monohidratado	0.1
Agar bacteriológico **	1.5

*Únicamente se varió la fuente de carbono para ese estudio (glucosa, fructosa, sacarosa, inulina de *Agave salmiana*, inulina de achicoria); la proporción fue la misma.

**Únicamente para medio sólido en placa.

Los medios de cultivo preparados, se esterilizaron en autoclave (HA-300MW autoclave, HIRAYAMA) a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

Para el caso de los medios sólidos, se vertió el medio estéril bajo condiciones asépticas en cajas Petri de plástico estériles.

7.2. Aislamiento, verificación de pureza y conservación de la cepa AZ8.

Se prepararon 20 mL del medio de cultivo y se inoculó con una asada de la cepa proporcionada en crioconservación (ultracongelador REVCO, Value Chest Freezer Thermo Scientific), previamente aislada e identificada por el grupo de investigación del laboratorio como *Kluyveromyces marxianus* AZ8. Se incubó (incubadora Innova 4330, New Brunswick Scientific) a 30°C a 120 rpm durante 24 h.

El cultivo de 24 h, se inoculó por agotamiento en cajas Petri con la formulación anterior. Se incubó a 30° durante 24 h. Posteriormente, se seleccionó una colonia aislada y se realizó una tinción simple con safranina y se observó al microscopio (Olympus B201) con el objetivo 100X.

Al verificar la pureza microscópicamente de la colonia seleccionada, se inocularon 20 mL del medio de cultivo con una asada de la colonia pura. Se incubó a 30°C y 120 rpm durante 24 h.

Para la conservación de la cepa, se esterilizaron tubos de microfuga con 0.5 mL de glicerol como agente criogénico. Se añadió a cada tubo 0.5 mL del cultivo de 24 h a partir de la colonia pura. Se homogeneizó con un vórtex y se conservaron a -80°C.

7.3. Caracterización del crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* AZ8.

7.3.1. Efecto de la fuente de carbono

Para determinar la mejor fuente de carbono para el crecimiento microbiano y la producción de la enzima, se utilizó la formulación del medio de cultivo inicial, variando únicamente la fuente de carbono: glucosa, fructosa, sacarosa, inulina de achicoria, inulina de *Agave tequilana* Weber variedad azul e inulina de *Agave salmiana*.

Se inocularon 100 mL del medio de cultivo con 20 µL de la cepa en crioconservación. Se incubó a 30°C y 120 rpm durante 48 h. Se tomaron 1.5 mL

de muestra en condiciones asépticas cada 2 h, se colocaron en tubos de microfuga y se conservaron a -80°C para evitar el crecimiento microbiano. Para monitorear todas las fases de crecimiento se hizo un desfase en la metodología, de tal forma que los tiempos de muestreo pudieran ser monitoreados durante el día, a fin de tener muestras hasta las 48 h de incubación.

Una vez que se tuvieron todas las muestras, se descongelaron y se homogeneizaron en un vórtex. Se midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific) previamente calibrado, utilizando como blanco el medio de cultivo sin inocular. Se realizó una dilución 1:10 a las muestras de un tiempo de crecimiento mayor a 10 h para poder obtener lecturas aceptables en el espectrofotómetro. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (Microcentrifuga, Eppendorf) a 14000 rpm por 5 min. Se conservó el sobrenadante a -80°C para las determinaciones posteriores y se desechó el botón celular.

7.3.2. Efecto del pH inicial de medio de cultivo

Una vez que se eligió la fuente de carbono a emplear, se realizaron curvas de crecimiento variando el pH inicial del medio de cultivo. Los pH empleados fueron 3, 4, 5, 6 y 7, ajustando con NaOH o HCl 0.1 N antes de ser esterilizado, empleando un potenciómetro (Beckman), previamente calibrado con buffer pH 7. Se siguió la misma metodología de inoculación, muestreo y medición de densidad óptica empleada para la fuente de carbono.

7.3.3. Efecto de la temperatura de incubación

Para evaluar el efecto de la temperatura, se inocularon 100 mL de medio de cultivo con la mejor fuente de carbono y pH inicial del medio previamente ajustado, con 20 μL de la cepa conservada con glicerol a -80°C . Se incubó a las siguientes temperaturas: 30, 35, 40, 45 y 50°C . Se siguió la misma metodología de inoculación, muestreo y medición de densidad óptica empleada anteriormente.

7.3.4. Monitoreo del consumo de sustrato

El consumo de sustrato se monitoreo cuantificando el contenido de azúcares reductores en el sobrenadante con el método de DNS (Ghose, 1987), empleando 0.1 mL de muestra, 0.2 mL de agua destilada y 0.6 mL de DNS. Se calentó a 93°C durante 5 minutos en un baño de glicerina (RTC basic safety control, IKA; ETS-D4 fuzzy, IKA). Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento, se hizo un choque térmico con hielo para detener la reacción. Se agregaron 4 mL de agua destilada y se homogeneizo. Se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro frente a un blanco de reactivos. Se determinó la concentración de sustrato consumido en el sobrenadante con una curva patrón de fructosa previamente realizada. El método de DNS se puede emplear también para inulina, ya que ésta tiene un residuo de glucosa, sin embargo al estar en menor proporción la respuesta es menor, por lo que se realizó una curva patrón de inulina.

7.3.5. Ensayo de actividad enzimática

Para realizar el ensayo se seleccionaron muestras del medio de cultivo a las 36 h del crecimiento de *K. marxianus* AZ8 en las diferentes condiciones estudiadas.

El ensayo de actividad enzimática se realizó empleando una solución al 0.5 % de inulina de agave en amortiguador de acetatos 50 mM y pH 5. Se filtraron 500 µL de sobrenadante con un microdisco de 0.22 µm para eliminar cualquier resto celular, y se colocaron en un tubo de microfuga con 500 µL de la solución de inulina de agave. El control se realizó con 500 µL de la solución de inulina de agave y 500 µL de agua destilada. Se colocaron en una incubadora a 50°C y 120 rpm durante 24 h. La actividad enzimática de las muestras se determinó empleando el método de DNS para cuantificar el contenido de azúcares reductores presentes en el blanco y al final de la reacción enzimática.

Para determinar la actividad enzimática durante la purificación de la proteína, se realizaron diluciones del extracto proteico obtenido en cada paso del procedimiento; la concentración de la solución de inulina de agave azul empleada fue de 1%. Para el extracto crudo se respetó la misma proporción: 500 µL del extracto crudo (EC) y 500 µL de la solución de inulina de agave al 1% en

amortiguador de acetatos 50 mM pH=5. Para la muestra liofilizada y dializada se hizo una dilución 1:2, es decir, 250 μ L de la muestra dializada, 250 μ L de agua destilada y 500 μ L de solución de inulina de agave. Para la fracción pura (mezcla de las fracciones 11 y 12 obtenidas de la exclusión molecular) se realizó una dilución 1:4 de la siguiente manera: 125 μ L de la fracción pura, 375 μ L de agua destilada y 500 μ L de solución de inulina de agave azul. El blanco fue con 500 μ L de agua destilada y 500 μ L de solución de inulina de agave. Se colocaron en un termomixer (Eppendorf) a 50°C a 300 rpm durante 20 min para que se llevara a cabo la reacción enzimática. Una vez transcurridos los 20 min, se hizo un choque térmico con hielo para detener la reacción. A las muestras se les determinó la cantidad de fructosa producida, por medio del método de DNS descrito anteriormente, en el blanco y al final de la reacción enzimática.

7.3.6. Cuantificación de proteína

A las muestras seleccionadas del medio de cultivo a las 36 horas de crecimiento que se emplearon para el ensayo de actividad enzimática, se les cuantificó proteína total.

Para esta determinación, se empleó el método de Bradford (Sigma-Aldrich). Se hizo un microensayo donde se colocó en un tubo de ensayo 0.5 mL del sobrenadante (o de la dilución necesaria del mismo) y 0.5 mL del reactivo de Bradford, se homogeneizó en un vórtex y se dejó reposar por 5 min. Transcurridos los 5 min, el volumen total de la reacción se vertió en una celda de plástico y se leyó la absorbancia de la reacción colorimétrica a 595 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific).

Previamente se realizó una curva patrón empleando una solución de albúmina sérica bovina 10 μ g/mL como estándar.

7.4. Preparación de la muestra para la purificación

7.4.1. Concentración del extracto celular

El cultivo se centrifugó a 9500 rpm y 4° C durante 12 min (Centrifuga: Pro-Research, Centurion Scientific Lid). El botón celular se desechó y el sobrenadante se ultracongeló a -80° C. Posteriormente se liofilizó (liofilizadora FD1.0, Heto) todo el extracto celular. Las muestras ya liofilizadas se almacenaron a 4° C, teniendo precaución de que no volvieran a hidratarse.

7.4.2. Diálisis

Se hidrató la membrana de celulosa para diálisis con tamaño de poro de 12 kDa (Sigma-Aldrich) con agua corriente y se enjuagó con agua destilada. Se colocó en un vaso de precipitado con agua destilada para mantenerla hidratada mientras continuaba el proceso. Se colocaron las pinzas para cerrar el fondo de la bolsa y se vertió dentro la muestra liofilizada, previamente resuspendida en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.2, dentro de la membrana. Se cerró la membrana con otra pinza y se colocó en un vaso de precipitado con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.2. El vaso se colocó en un baño de hielo con agitación durante 18 h.

A las 5 h de iniciado el proceso, se realizó un cambio de amortiguador en las mismas condiciones, para favorecer el intercambio de iónico.

7.4.3. Elaboración de geles de poliacrilamida

Gel separador

En un vaso de precipitado se agregaron 6.0 mL de agua desionizada, 3.9 mL de amortiguador de separación (Tris- HCl) 0.125 M pH 8, 4.995 mL de solución de acrilamida- bisacrilamida al 30% y 0.015 mL de TEMED. Una vez que las placas de vidrio (Biorad) estuvieron montadas para hacer el gel, se agregaron 0.075 mL de persulfato de amonio al 10 % al vaso de precipitados con los reactivos anteriores. Con una micropipeta de 5 mL se colocó la solución en las placas de

vidrio hasta la marca indicada. Se agregó 1 mL de isopropanol para alinear el gel. Se dejó solidificar y se secó el isopropanol con papel filtro.

Gel concentrador

En un vaso de precipitados se colocaron 9.12 mL de agua desionizada, 3.75 mL de amortiguador de concentración (Tris-HCl) 0.5 M pH 6.8, 2.04 mL de solución de acrilamida-bisacrilamida al 30% y 0.015 mL de TEMED. Posteriormente se agregaron 0.075 mL de persulfato de amonio al 10% y se mezcló con los reactivos en el vaso de precipitado. Con una micropipeta de 5 ml se colocó la solución en las placas de vidrio hasta poco antes del límite de las mismas. En un solo movimiento se colocó el peine para formar los carriles, evitando que se formaran burbujas de aire. Se deja gelificar para su posterior uso o almacenamiento con amortiguador de corrida para evitar que se deshidrate.

7.4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Preparación de la muestra

La muestra previamente dializada y liofilizada se resuspendió en agua desionizada (de 30 a 60 μ L, de acuerdo con la cantidad de muestra). Posteriormente se agregó amortiguador de tratamiento (que contiene SDS, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol y glicerol) en la misma proporción de agua desionizada en la que se resuspendió la muestra. Se calentó a 95 °C durante 5 minutos para desnaturalizar la muestra en un termomixer (Eppendorf).

Corrida del gel

En los carriles previamente seleccionados se colocaron el marcador de peso molecular (Biorad) y las muestras previamente tratadas en los carriles seleccionados con la ayuda de una micropipeta de 10 μ L. Se montó el equipo (Cámara de electroforesis para proteínas, Biorad) y la electroforesis se corrió a 75 V (Fuente de poder, Major Science). Una vez que las proteínas pasaron al gel separador el voltaje se aumentó a 100 V.

Fijación del gel

Una vez que el frente de corrida llegó a 1 cm de la base del gel, este se retiró de la cámara para fijar las proteínas con una solución de metanol al 50% durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron dos enjuagues con agua desionizada (Purificador de agua MilliQ, Millipore) durante 5 min.

Tinción

El gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (2.5 g de Coomassie R, 450 mL de metanol y 100 mL de ácido acético glacial para 1 L de solución acuosa) durante toda la noche.

Enjuague

Una vez teñido el gel, este se sumergió en una solución 11:11:3 metanol, agua desionizada y ácido acético. Se realizaron cambios de la solución de enjuague hasta que el gel no tuviera fondo azul.

7.5. Purificación de la enzima.

7.5.1. Cromatografía por exclusión molecular

La cromatografía por exclusión molecular se llevó a cabo en un cromatógrafo de proteínas (AKTA Purifier, General Electric) y una columna Superdex 200 de 24 mL (Sigma-Aldrich). Las condiciones a las que se llevó a cabo la purificación fueron las siguientes: flujo de 0.5 mL/minuto, la fase móvil empleada fue amortiguador de fosfatos 50 mM + 500 mM de NaCl a pH 7.2 y una longitud de elución de columna de 2.0 para asegurar que toda la muestra saliera de la misma.

7.5.2. Monitoreo de purificación

Una vez que se recuperaron las fracciones, se realizaron ensayos de actividad enzimática para verificar que la muestra indicada por el sistema es la que tuviera mayor actividad inulinolítica. Las reacciones enzimáticas y la cuantificación de

fructosa mediante el método de DNS se llevaron a cabo como se menciona anteriormente.

También se realizó un SDS-PAGE para comprobar la pureza de las fracciones. Se siguió la metodología mencionada anteriormente.

7.5.3. Cromatografía en capa fina (TLC)

Para determinar si la enzima producida y purificada es de naturaleza endo o exoinulinolítica, se realizó una cromatografía en capa fina para observar los productos de la reacción hidrolítica de la inulina de *Agave tequila Weber* var. *azul*. Se usaron placas de silica en aluminio y se eluyó con una mezcla de butanol, metanol y agua (3:2:1). La placa se reveló con una solución de H₂SO₄ al 5% en etanol y orcinol a 10 mg/mL; dicha solución se dispersó por toda la placa y se calentó a 90°C hasta revelarse.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento y verificación de pureza

Se verificó la pureza de la cepa proporcionada, la cual se aisló y se identificó previamente como *Kluyveromyces marxianus* AZ8 por el grupo de investigación del laboratorio (Trapala, 2017). Como se puede observar en la Figura 6, se obtuvieron colonias aisladas por agotamiento en placas de agar con la misma formulación del medio de cultivo líquido. Se obtuvieron colonias de forma circular con borde entero y elevación convexa, color blanquecino y textura cremosa. Se puede observar que la cepa está pura ya que todas las colonias tienen las mismas características. La Figura 7 muestra la observación al microscopio de una tinción simple con safranina de una colonia aislada. Las células tienen forma ovalada, característica de las levaduras; se verificó que la cepa está pura al no haber células con otras características morfológicas.



Figura 7. Aislamiento de colonias de *K. marxianus* AZ8 por agotamiento.

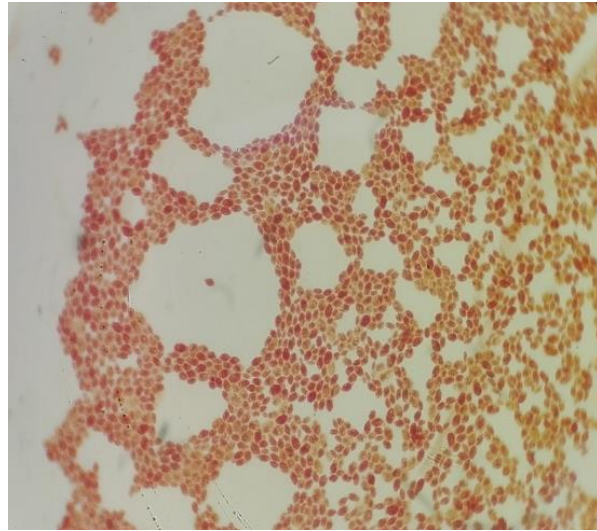


Figura 6. Observación al microscopio de una colonia aislada de *K. marxianus* AZ8. Tinción simple con safranina.

8.2. Caracterización del crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* cepa AZ8

8.2.1. Efecto de la fuente de carbono

Una vez que se verificó la pureza de la cepa, se realizaron las curvas de crecimiento microbiano variando la fuente de carbono, los sustratos empleados fueron: inulina de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, inulina de *Agave salmiana*, inulina de achicoria, sacarosa, fructosa y glucosa.

La densidad óptica es proporcional al número de células presentes en el medio, por lo que se emplea como método para seguir el crecimiento de cultivos microbianos (Madigan y Martinko, 2009). Según los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 8, podemos observar que las fuentes de carbono en donde hay un menor crecimiento son glucosa y fructosa. Ambas curvas muestran una tendencia similar, lo cual es de esperarse ya que estos carbohidratos son isómeros. También se observa que el crecimiento con sacarosa es muy similar, aunque llega a ser mayor, en comparación con fructosa y glucosa.

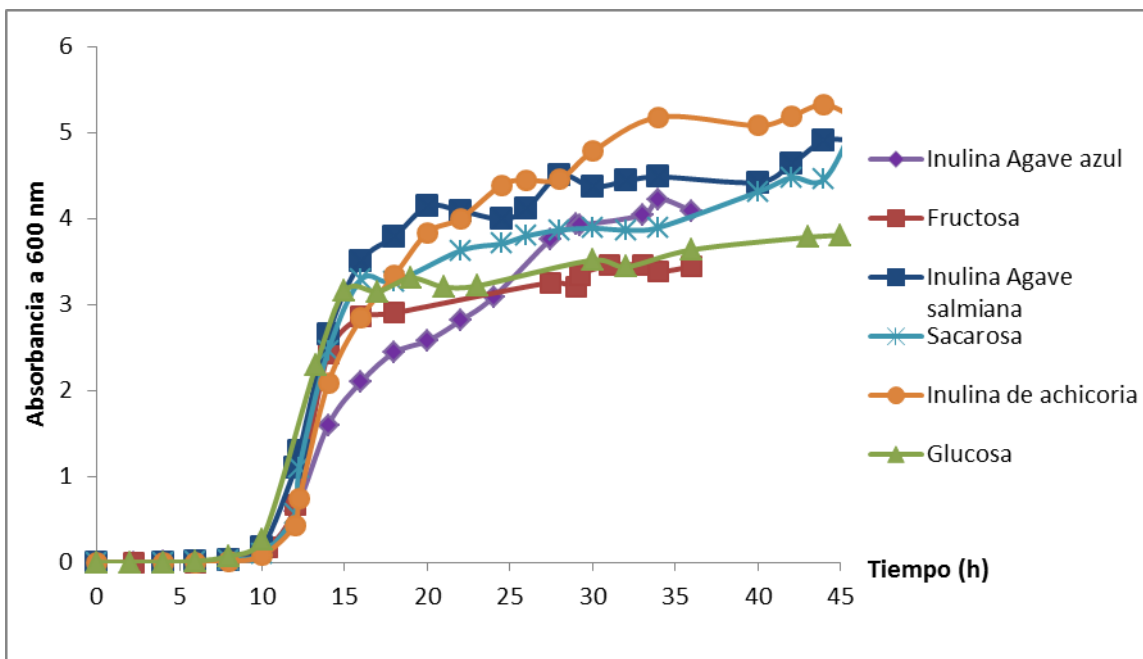


Figura 8. Curvas de crecimiento de *K. marxianus* con diferentes fuentes de carbono.

Para el caso de los polisacáridos se observa que la cepa tiene un mayor crecimiento. En la Figura 8 se observa que con inulina de achicoria hubo un mayor crecimiento, además se observa que el crecimiento es de tipo diaúxico. Este tipo de crecimiento tiene lugar cuando un microorganismo crece en un medio con dos fuentes de carbono, una de las cuales se usa con preferencia frente a la otra como consecuencia de la represión catabólica; esto ocurre porque el microorganismo crece primero empleando la fuente de carbono preferente y cuando la agota entra en fase estacionaria hasta que sintetiza enzimas para degradar la otra fuente de carbono para continuar con el crecimiento exponencial, aunque con una pendiente más suave (Martín, 2018). En este caso, probablemente inicia metabolizando algún residuo de fructosa u otro azúcar más simple que haya en el medio, lo cual permite que el microorganismo crezca y comience a producir inulinasas para hidrolizar a la inulina en FOS hasta llegar a fructosa y poder metabolizarla para continuar desarrollándose. Lo mismo ocurre en el caso de la inulina de *Agave salmiana*, sin embargo el crecimiento es menor que con inulina de achicoria.

Para el caso de inulina de *Agave azul* se observa que crece a una velocidad menor en la fase exponencial en comparación a la inulina de achicoria y de *Agave*

salmiana, lo cual probablemente se debe a que este tipo de inulinas consisten en cadenas lineales de fructosa con enlaces β -2,1, es decir, no hay ramificaciones como en el caso de la inulina de agave azul. Se observa también el comportamiento diaúxico. Cabe mencionar que este monitoreo sólo se hizo hasta las 36 h de crecimiento, por lo que es posible que el microorganismo siga creciendo después de este tiempo e incluso superara el crecimiento que alcanza con los demás polisacáridos, ya que se observa que a las 36 h *K. marxianus* AZ8 no ha llegado a la fase estacionaria.

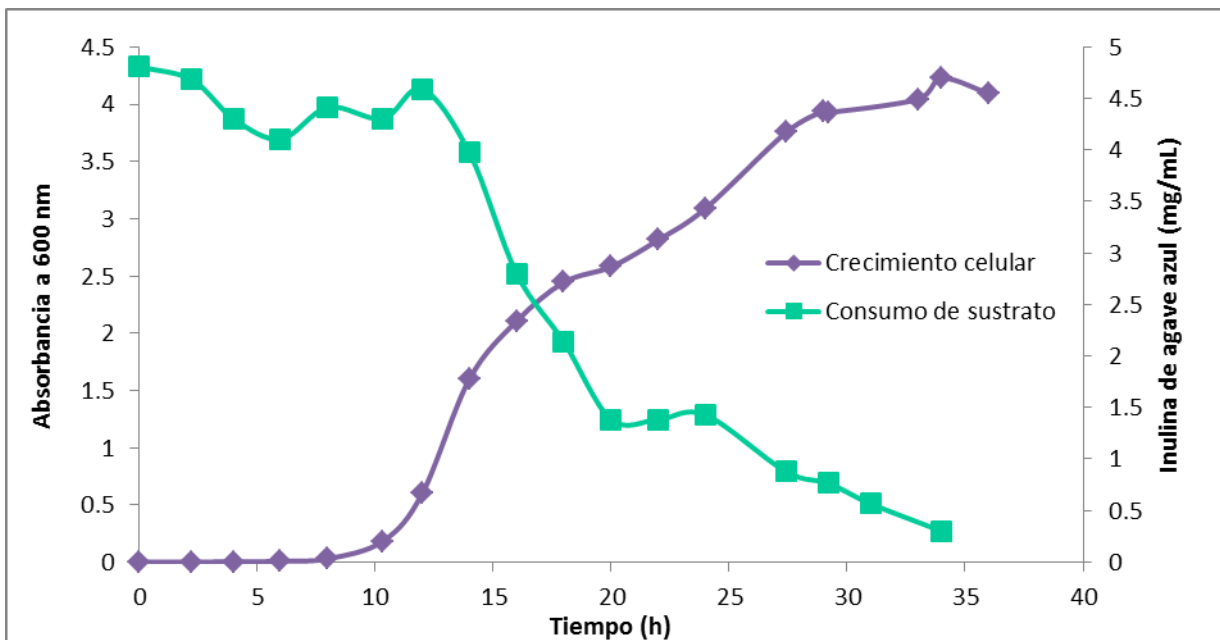


Figura 9. Curva de crecimiento de *K. marxianus* AZ8 con inulina de agave azul como fuente de carbono y consumo del sustrato como fuente de carbono.

En la Figura 9 se muestra la curva de crecimiento de *K. marxianus* con inulina de agave azul como fuente de carbono, además del consumo de sustrato durante el crecimiento. Se puede observar que en las primeras horas del crecimiento celular comienza a disminuir la concentración de inulina presente en el medio, esto es debido a que la enzima comienza a hidrolizar a la inulina a FOS y fructosa. Posteriormente, la concentración de azúcares comienza a disminuir e inicia el crecimiento exponencial de la levadura, probablemente con los azúcares producidos por la hidrólisis de inulina. Es importante mencionar que prácticamente

consume todo el sustrato, con una eficiencia de consumo de sustrato (EUS) de 93.7% a las 36 horas de crecimiento.

Para evaluar la producción de inulinasas se realizó un ensayo de actividad enzimática, monitoreando la producción de azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de la inulina, presumimos que es principalmente fructosa. Se utilizó el método de DNS para evaluar la acción de la inulina producida por la cepa AZ8. Como se mencionó anteriormente la respuesta colorimétrica de la inulina con el DNS es baja debido a que esta sólo tiene un residuo de glucosa en su estructura que posiblemente reaccione con el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Aunque la señal colorimétrica es muy baja, conforme la enzima hidroliza a la inulina, aumenta la concentración de azúcares reductores. Cabe mencionar que para esta primera etapa del estudio el objetivo fue determinar bajo qué condiciones se tenía una mayor producción de fructosa, por lo que el tiempo de reacción fue de 24 h, obteniendo solo un estimado de dicha actividad ya que se tiene un tiempo de reacción muy amplio. Para la purificación y caracterización de la enzima, el tiempo se disminuyó para tratar de determinar la actividad en velocidad inicial de la inulina ACH1.

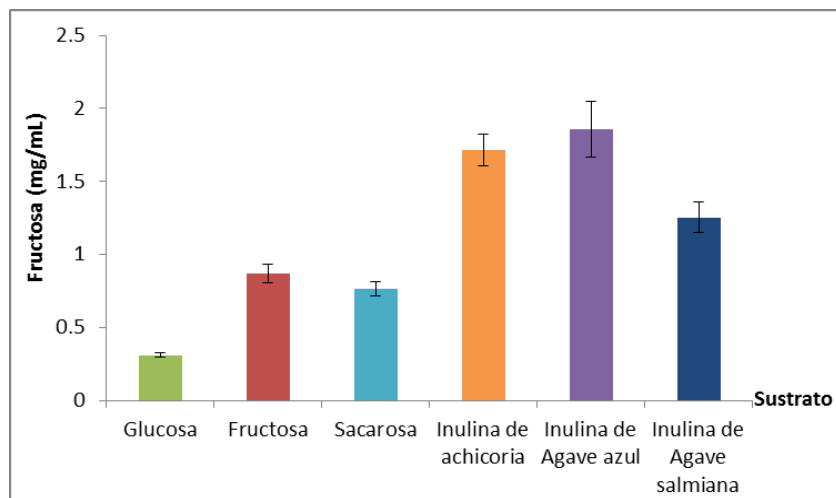


Figura 10. Actividad enzimática de la inulina producida por *K. marxianus* cepa AZ8 crecida en diferentes fuentes de carbono (los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave 0.5% m/v pH 5 a 50°C por 24 horas).

Es importante mencionar que las muestras del extracto celular para llevar a cabo las determinaciones de actividad enzimática y cuantificación de proteína

correspondían a un tiempo de crecimiento de 36 h, de forma general, a este tiempo *K. marxianus* AZ8 está en la fase de crecimiento exponencial, en la cual se produce la enzima ya que es un metabolito primario, además para el caso de fructosa e inulina de agave azul, era la última muestra con la que se contaba, por lo que se eligió este tiempo para estandarizar las determinaciones a realizar.

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos de dicho ensayo. El extracto celular que presenta una mayor actividad enzimática es aquel en que *K. marxianus* usó inulina de agave azul como fuente de carbono. Para el caso particular de glucosa, se ha reportado que existe una represión catabólica en presencia de este carbohidrato para la producción de inulinasas (Castillo y Chamy, 2010), por lo que resulta que en glucosa se tiene una menor actividad enzimática. En contraste con los azúcares más simples, los polisacáridos muestran un notable aumento en la actividad enzimática, ya que de esta forma se induce la producción de la enzima de nuestro interés.

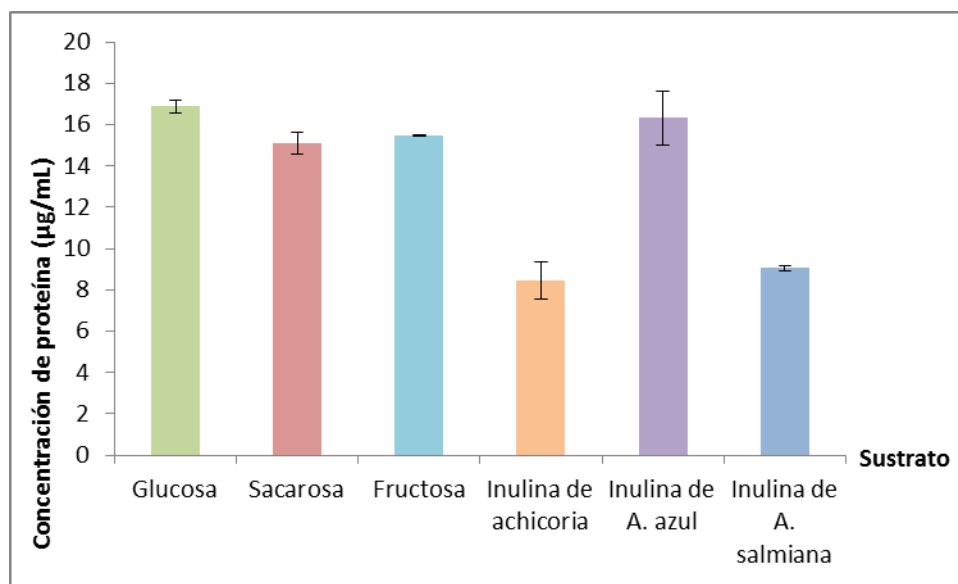


Figura 11. Concentración de proteína de 1 mL de cultivo a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 en diferentes fuentes de carbono.

Con la finalidad de determinar si la actividad enzimática estaba relacionada con la cantidad de proteína producida por el microorganismo, se determinó la

concentración de esta (Figura 11). Se puede observar que en la mayoría de los casos la concentración de proteína es muy similar, sin embargo, para los casos de glucosa, fructosa y sacarosa, en los cuales se detectó una escasa actividad inulinolítica, probablemente porque la cepa AZ8 crecida con estas fuentes de carbono produce otras enzimas para llevar a cabo su metabolismo. Para los polisacáridos, se observa que el sustrato en donde se produce una mayor cantidad de proteína es con la inulina de agave azul. Estas diferencias entre los distintos tipos de inulina se deben a la composición de la misma, ya que como se mencionó anteriormente, en cada fuente varía la cantidad y tipo de fructanos presentes.

Los resultados tanto del crecimiento celular, actividad enzimática y concentración de proteína, indican que la mejor fuente de carbono para la producción de inulinasa ACH1 por *K. marxianus* cepa AZ8 es la inulina de agave azul.

8.2.2. Efecto del pH inicial del medio de cultivo

Una vez que se eligió a la inulina de agave azul como la mejor fuente de carbono, se realizaron curvas de crecimiento ajustando el pH inicial del medio de cultivo para evaluar el efecto que ejerce éste en el crecimiento de la cepa AZ8, la producción de la enzima así como la actividad de la misma.

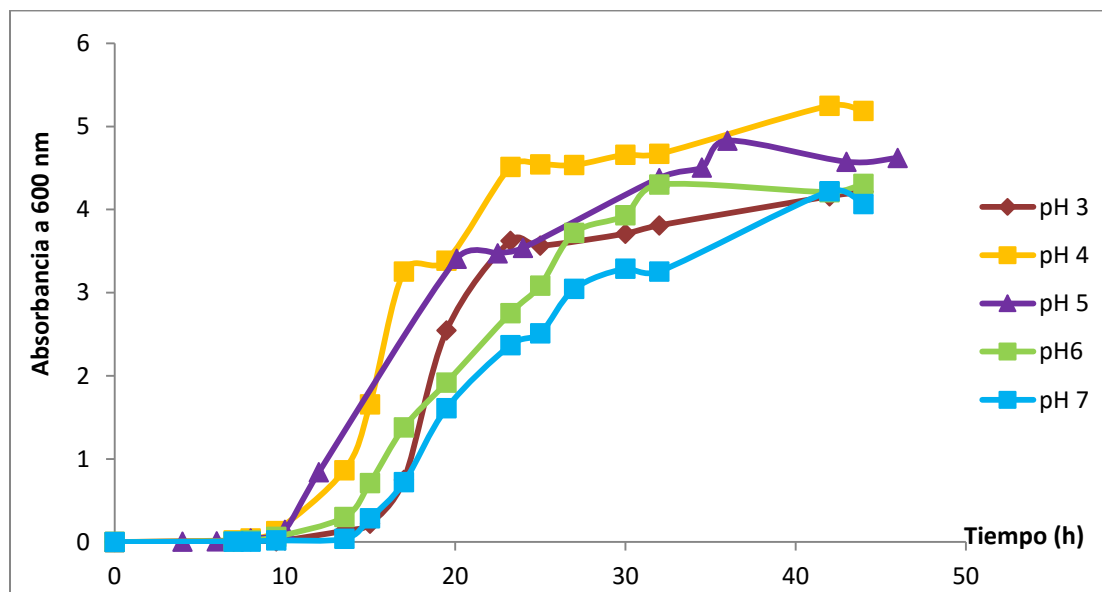


Figura 12. Crecimiento de *K. marxianus* AZ8 variando el pH inicial del medio de cultivo.

Como se observa en la Figura 12, el pH inicial del medio de cultivo en el que hay un mayor crecimiento celular es a pH 4, seguido de pH 5, además cabe mencionar que la fase de acondicionamiento o fase lag es más corta, lo cual indica que el microorganismo se adapta más rápido las condiciones del medio para poder desarrollarse, posiblemente debido a que, como se reporta en un estudio de optimización de la producción de inulinasas por *Saccharomyces sp.* a partir de *Agave tequilana Weber variedad azul* en donde se analizó el medio de cultivo (estéril) antes de las fermentaciones y se encontró que a pH 5.5 los polímeros de fructosa comienzan a hidrolizarse, haciéndolos más fáciles de asimilar (Corona *et. al*, 2005). También a estos valores de pH se observa que se tiene una pendiente mayor en la fase exponencial, es decir, la velocidad de crecimiento es mayor. Se observa que el microorganismo se adapta más lentamente al medio a pH 6 y 7, ya que la fase lag es más larga y la velocidad de crecimiento es menor en comparación con los antes mencionados. En el caso de pH 3 se observa que la fase lag también es más larga, sin embargo la velocidad de crecimiento en la fase exponencial es mayor, incluso que con los pHs en donde se tiene un mayor crecimiento celular.

En la Tabla 8 se muestran el cambio de pH en el medio de cultivo durante el crecimiento de la levadura. Se observa de manera general que la levadura crece en condiciones ácidas. El caso en el que hay una mayor variación de pH inicial del medio es a pH 7, lo cual podría deberse a que a estas condiciones de crecimiento probablemente produce algún metabolito, como un ácido orgánico para disminuir el pH y así favorecer su crecimiento. A pH inicial de 6, se comporta de manera similar que a 7, aunque la disminución de pH es menor. A pH 5 se mantiene, indicando que la levadura tiene un pH adecuado para su crecimiento y no requiere producir metabolitos para ajustar el pH del medio.

Tabla 8. Variación en el pH del medio de cultivo antes y después del crecimiento celular.

pH inicial	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00
pH final	2.95	3.85	5.05	5.60	6.1

Δ pH	0.05	0.15	0.05	0.4	0.9
-------------	------	------	------	-----	-----

Considerando lo anterior, se realizó un ensayo de actividad enzimática a diferentes pH's (Figura 13). Se observó que a pH 3 la actividad enzimática es baja, 90% menor con respecto a pH5, que fue donde se obtuvo una mayor actividad. Para pH 4 la actividad enzimática es 50% menor respecto al resultado a pH 5. El efecto a pH ácido en la actividad de la inulinasa se podría explicar por una inactivación de la enzima. Como se menciona anteriormente, se ha descrito que la glucosa o fructosa libres por lo general moderan la producción de inulinasas. En un estudio de optimización de la producción de inulinasas por *Saccharomyces sp.* a partir de *Agave tequilana Weber variedad azul*, se analizó el medio de cultivo (estéril) antes de las fermentaciones y se encontró que a pH 5.5 las polifruktosas son el sustrato principal, sin embargo, a pH 4 las polifruktosas son hidrolizadas completamente a fructosa y glucosa. De aquí que a valores de pH bajos exista represión catabólica por azúcares residuales. Las condiciones óptimas para producir inulinasas por *Saccharomyces sp.* son 30°C y un pH de 5.5 (Corona *et. al.*, 2005). Se observa que a pH mayores la actividad aumenta; en estudios anteriores, como el realizado por Cazetta *et al.* en 2010, se reporta que el pH inicial del medio no provoca una diferencia significativa en el crecimiento del microorganismo, sin embargo, hay una mayor actividad enzimática a pH 5, seguida de pH 6, mientras que a pH 3.5 la actividad enzimática disminuyó significativamente. Singh y colaboradores. (2007), en un estudio de optimización de medio y parámetros de proceso para la producción de inulinasa a partir de una nueva cepa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1, recomienda trabajar a un intervalo de pH inicial de 6.4 a 6.5 para una producción óptima de inulinasas con esta cepa. Con esto se puede decir que, para obtener una mayor actividad de inulinasa producida por *K. marxianus*, el pH inicial del medio de crecimiento debe estar alrededor de 5.0- 6.5. Esto coincide con los resultados obtenidos para la cepa *K. marxianus* AZ8, ya que el intervalo de pH inicial del medio de cultivo donde hay una mayor actividad enzimática es de 5 a 7. Para pH 3 y 4 se observa que disminuye considerablemente la actividad enzimática de la inulinasa ACH1,

coincidiendo también con los resultados reportados en estudios mencionados previamente.

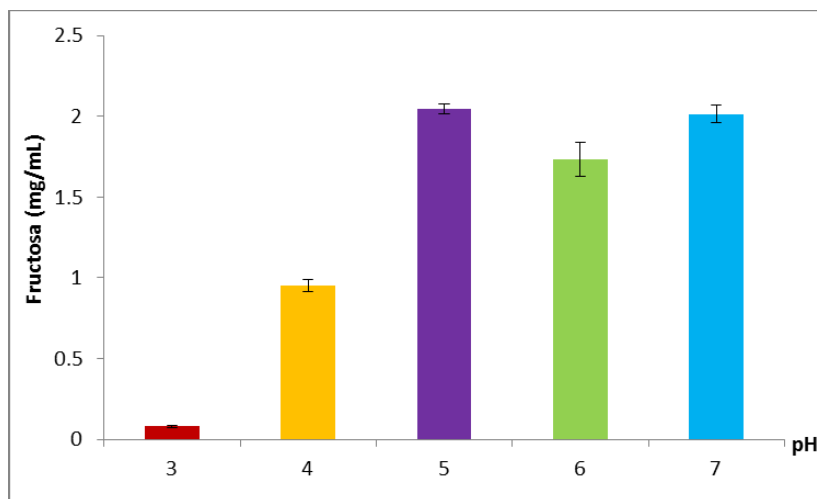


Figura 13. Actividad enzimática de la inulinasa ACH1 producida por la cepa AZ8 en distintos valores de pH inicial del medio de cultivo. (Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave 0.5% m/v pH 5 a 50°C por 24 h)

En la Figura 14 se muestra la concentración de proteína por mL de cultivo, y se puede observar que a pH inicial de 5 se produce una mayor cantidad de proteína. La enzima de interés tiene su mayor actividad a ese pH por lo que sí es probable que al tener más enzima activa a ese pH se refleje en mayor acumulación de proteína, ya que a este valor de pH también hay una mayor actividad enzimática.

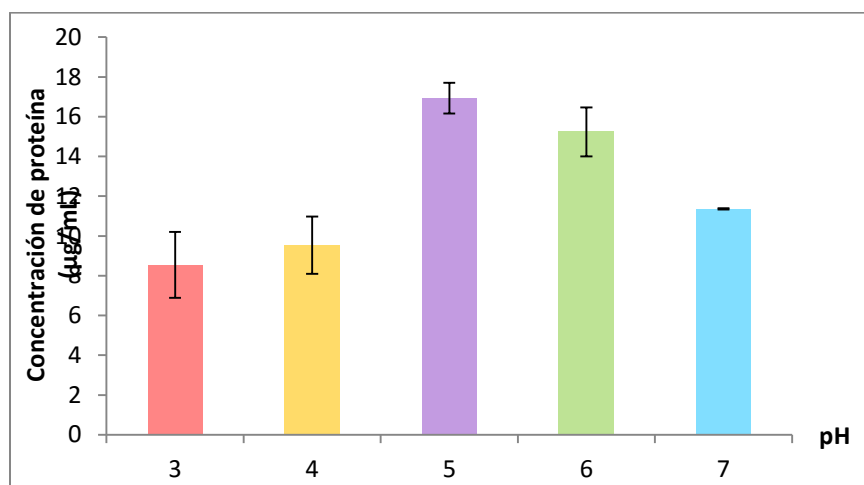


Figura 14. Contenido de proteína total a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 variando el pH inicial del medio de cultivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos del crecimiento celular, actividad enzimática y cuantificación de proteína total a las 36 horas del crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* AZ8, el mejor pH inicial del medio de cultivo para la producción y la actividad de la inulinasa ACH1 es 5. Cabe mencionar que el pH del medio original está alrededor de 5.1, por lo que el ajuste del mismo es mínimo, ofreciendo así una ventaja para el proceso de producción de inulinasas de la cepa AZ8.

8.2.3. Efecto de la temperatura de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* AZ8

Una vez que se determinó que la mejor fuente de carbono es la inulina de *Agave azul* y el mejor pH inicial del medio de cultivo es 5, se procedió a la selección de la mejor temperatura de crecimiento de *K. marxianus* AZ8 para la producción de la enzima de interés.

Las temperaturas de incubación estudiadas para *K. marxianus* AZ8 fueron 30, 35, 40, 45 y 50° C. Como se observa en la Figura 15, a 50°C no hubo crecimiento durante 48 h. A la temperatura de incubación de 45 °C hubo crecimiento, sin embargo tiene una fase estacionaria de 24 h y el crecimiento es menor en comparación a las demás temperaturas analizadas hasta las 48 h.

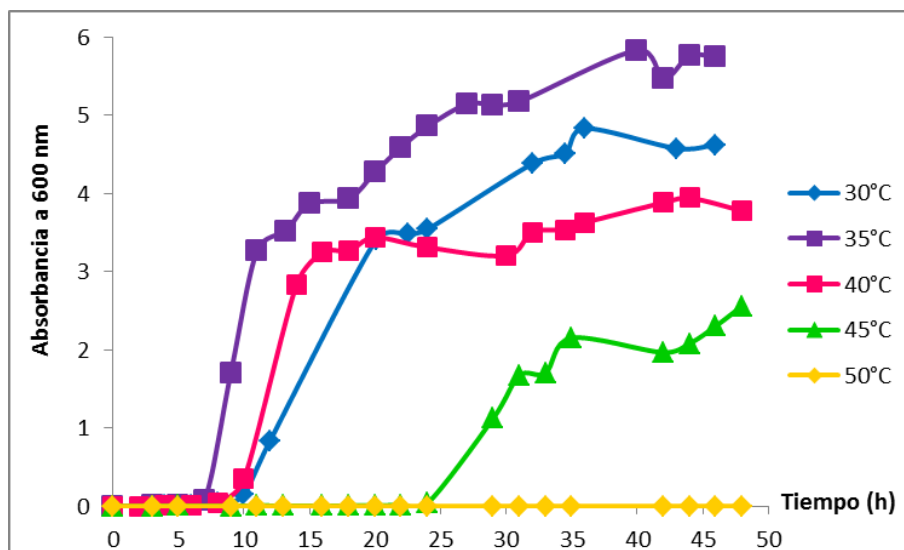


Figura 15. Crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 a diferentes temperaturas de incubación.

Se puede observar que a 30 y 40°C hay un buen crecimiento de la levadura, pero a 30°C la fase exponencial es más larga, ya que se observa que tiene una pendiente menor que a 40°C. Sin embargo, a 35 °C el crecimiento es mayor, además de que la fase estacionaria es menor que en los otros dos casos. La enzima de interés es un metabolito primario, es decir, se produce en la fase de crecimiento exponencial, por lo que resulta favorecedor que dicha fase inicie rápidamente.

Posteriormente, para determinar el efecto de la temperatura de cultivo en la producción de la inulinasa, se realizó el ensayo de actividad enzimática (Figura 16). La enzima tiene una mayor actividad en un intervalo de temperatura de crecimiento de *K. marxianus* de 35 a 40°C (2.5 mg/mL). Mientras que a 45°C se pierde alrededor del 60%. A pesar de que se tiene la misma actividad a 35 y 40°C, a 35° C se puede obtener la enzima más rápido ya que la fase estacionaria es más corta y hay un mayor crecimiento.

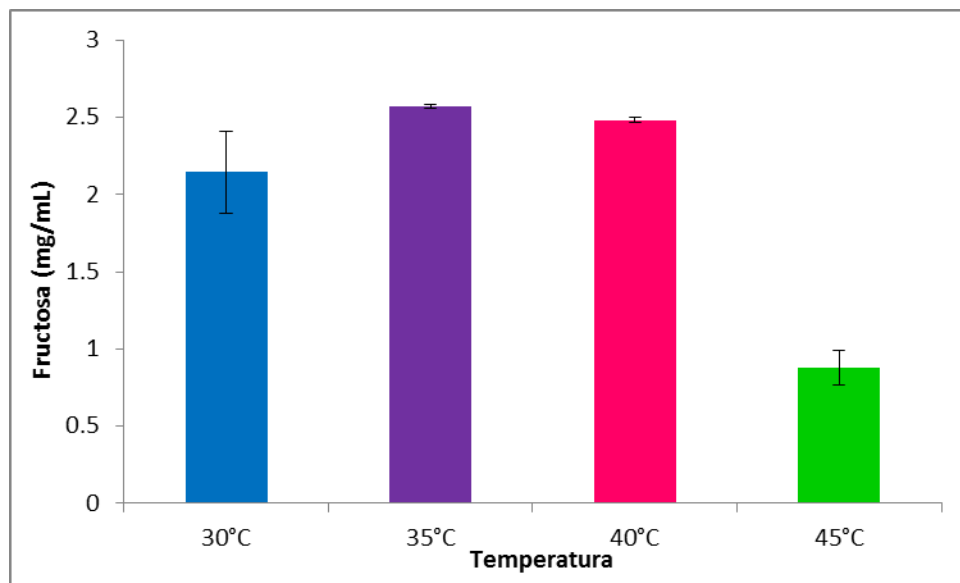


Figura 16. Actividad enzimática de la inulinasa ACH1 producida por *K. marxianus* AZ8 a diferentes temperaturas de crecimiento. (Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con inulina de agave 0.5% m/v pH 5 a 50°C por 24 h)

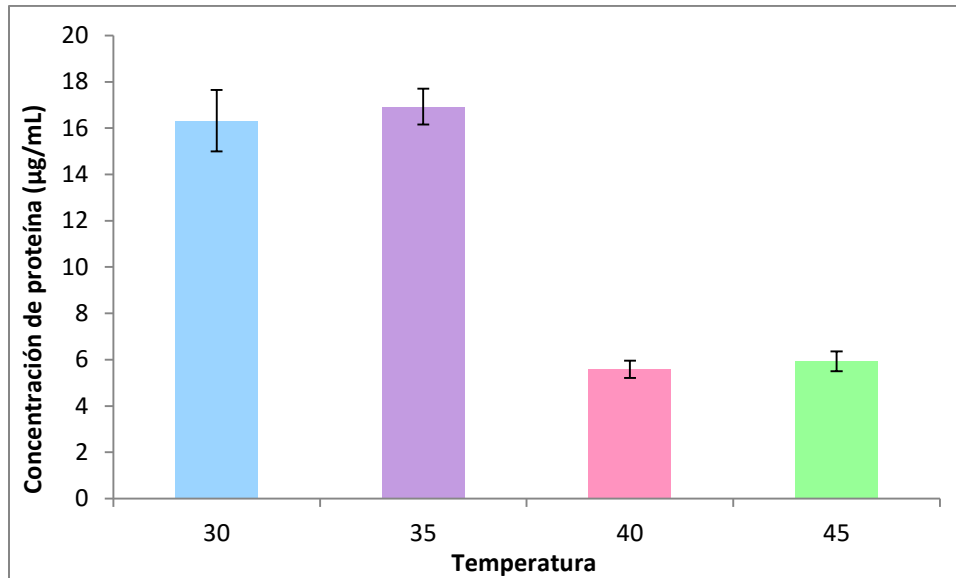


Figura 17. Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 a diferentes temperaturas.

En cuanto a la concentración de proteína total, cuyos resultados se muestran en la Figura 17, se observa que hay una menor cantidad de proteína a 40 y 45°C. Es interesante notar que a 40°C haya una menor cantidad de proteína y se tenga una de las mejores actividades enzimáticas. Sin embargo, el tiempo de reacción fue de 24 horas, el cual es un tiempo suficiente para que, aunque se tenga una poca cantidad de proteína con la misma actividad enzimática que las producidas a las demás temperaturas estudiadas, se alcancen los mismos niveles de hidrólisis. Nuevamente a 35°C se tiene el mejor resultado, ya que se produce una mayor cantidad de proteína, aunque no hay mucha diferencia con la cantidad de enzima producida a 30°C. Tomando en cuenta el crecimiento del microorganismo y la actividad de la inulinasa, ya que como se mencionó anteriormente, a 35 °C el microorganismo crece más rápido y llega a la fase exponencial, que es en la que se produce la enzima, en menor tiempo, 8 h aproximadamente, se elige 35°C como la mejor temperatura de incubación de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 para la producción de la inulinasa ACH1 utilizando inulina de agave azul como fuente de carbono y a un pH inicial del medio de cultivo de 5.

8.2.4. Efecto de la presencia de metales en el medio de cultivo para la producción y actividad de la inulinasa ACH1

Una vez que se determinaron las mejores condiciones para la producción de la inulinasa ACH1, las cuales son: Inulina de agave azul como fuente de carbono, pH inicial del medio de cultivo de 5 y 35°C como temperatura de incubación, se evaluó el efecto que ejerce la presencia de algunos metales en el medio de crecimiento de la levadura para la producción de la enzima y la actividad de esta última.

Se conoce que la actividad de la inulinasa producida por la cepa *K. marxianus* YS-1 aumenta significativamente a casi 110, 125 y 114 % con iones Co^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} , respectivamente, a una concentración de 2 mM en el medio de crecimiento (Singh y Bhermi, 2008).

Los metales empleados fueron: Fe^{3+} (FeCl_3), Cu^{2+} (CuSO_4), Mn^{2+} (MnSO_4), Ca^{2+} (CaSO_4), Mg^{2+} (MgSO_4) y Co^{2+} (CoCl_2). De cada metal, se estudiaron 5 concentraciones que van de 0.5 a 2.5 mM.

El Co^{2+} en el medio de cultivo inhibe el crecimiento del microorganismo, ya que a las 48 h de incubación no hubo desarrollo celular (datos no mostrados). Los resultados de las demás sales se muestran a continuación (Figuras 18 a 22).

En la Figura 18 se muestra el efecto que ejerce la presencia de Mg^{2+} en el medio de crecimiento de *K. marxianus* AZ8 sobre la actividad enzimática de la inulinasa producida (a), así como en la concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la levadura (b). Los resultados indican que no existe un aumento en la actividad de la enzima y en el contenido de proteína total. Sin embargo, para poder estimar la relación que existe entre la actividad enzimática (la cantidad de producto de reacción obtenido) y la concentración de proteína en la muestra, se hizo un índice, el cual se muestra en la Figura 18 (c), sin embargo, no se observa cambio, por lo que se descarta como componente del medio de cultivo para la producción de la inulinasa ACH1 por la cepa AZ8. Se confirma lo anterior con los resultados de la relatividad de dicho cociente con respecto al de la enzima producida sin metales en el medio que se muestran en la Tabla 9. Estos

resultados contrastan con un estudio realizado por R. Singh y H. Bhermi en 2008, ya que reportan que el Mg^{2+} en una concentración de 1.5 mM aumenta la actividad relativa de la inulinasa producida por la cepa YS-1 de *K. marxianus* en un 126%.

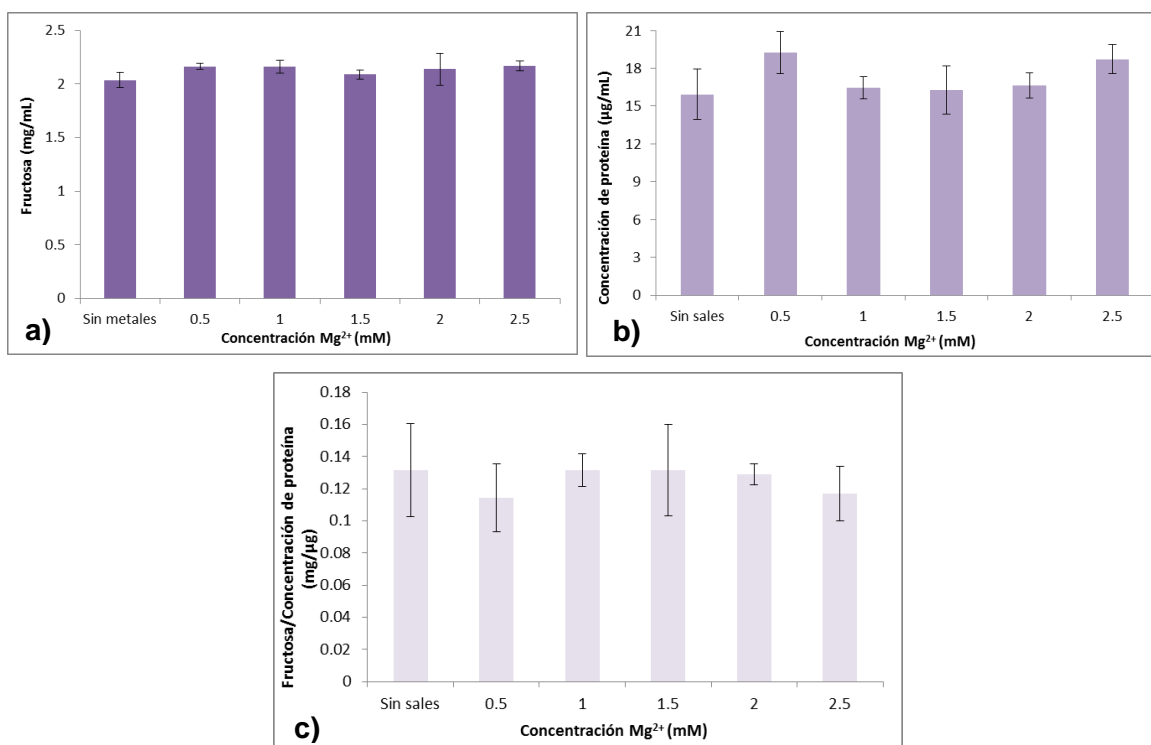


Figura 18. a) Actividad enzimática con Mg^{2+} adicionado al medio de cultivo de *K. marxianus* AZ8. b) Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Mg^{2+} adicionado al medio de cultivo. c) Relación del producto fructosa/ concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Mg^{2+} adicionado al medio de cultivo.

Para el caso del ion Ca^{2+} (Figura 19), se observa que también hay un ligero aumento en la actividad enzimática a una concentración de 1 y 2.5 mM, mientras que el contenido total de proteína a las 36 h de crecimiento de *K. marxianus* AZ8 no presenta cambio alguno, solo a la concentración de 2.5 mM. Sin embargo, la relación fructosa/concentración de proteína (Figura 19c) indica que se reduce la producción de fructosa a concentraciones entre 1.5 y 2.5 mM Ca^{2+} . En la Tabla 9 se muestra la relatividad que existe entre esta relación producto-proteína con respecto a la enzima producida sin los metales estudiados en el medio de crecimiento, la cual da como resultado 110.04%, sin embargo, este aumento no es

considerable, por lo que este metal se descarta como componente del medio para la producción de la enzima de interés. En otros estudios, el Ca^{2+} en una concentración 0.5 mM aumenta la actividad de la enzima producida por *K. marxianus* YS-1, sin embargo, no se reporta un aumento significativo (Singh y Bhermi, 2008). En contraste a esto, otro estudio reporta que sí hay un aumento de 35% en la actividad de la enzima producida por una cepa de *K. marxianus* en presencia de dicho ion metálico, en un rango de concentraciones de 0.5 a 2.0 mM, obteniendo la mayor actividad con una concentración de 0.5 mM (Singh *et al.*, 2007).

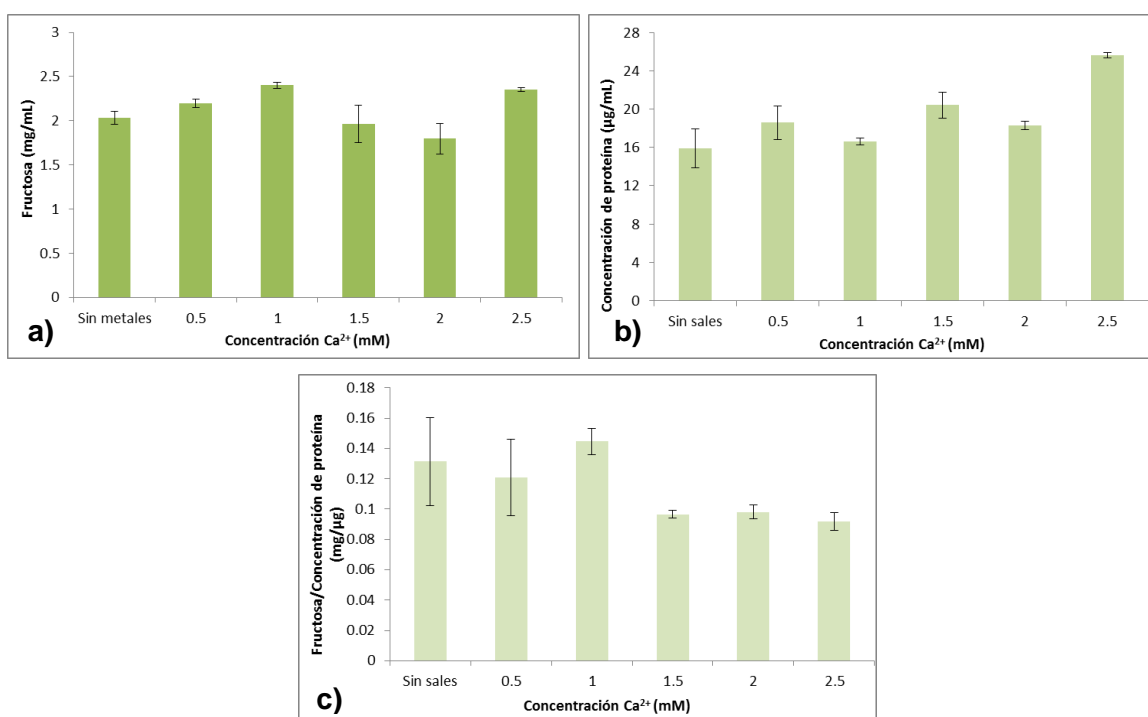


Figura 19. a) Actividad enzimática con Ca^{2+} adicionado al medio de cultivo de *K. marxianus* AZ8. **b)** Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Ca^{2+} adicionado al medio de cultivo. **c)** Relación del producto fructosa/ concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Ca^{2+} adicionado al medio de cultivo.

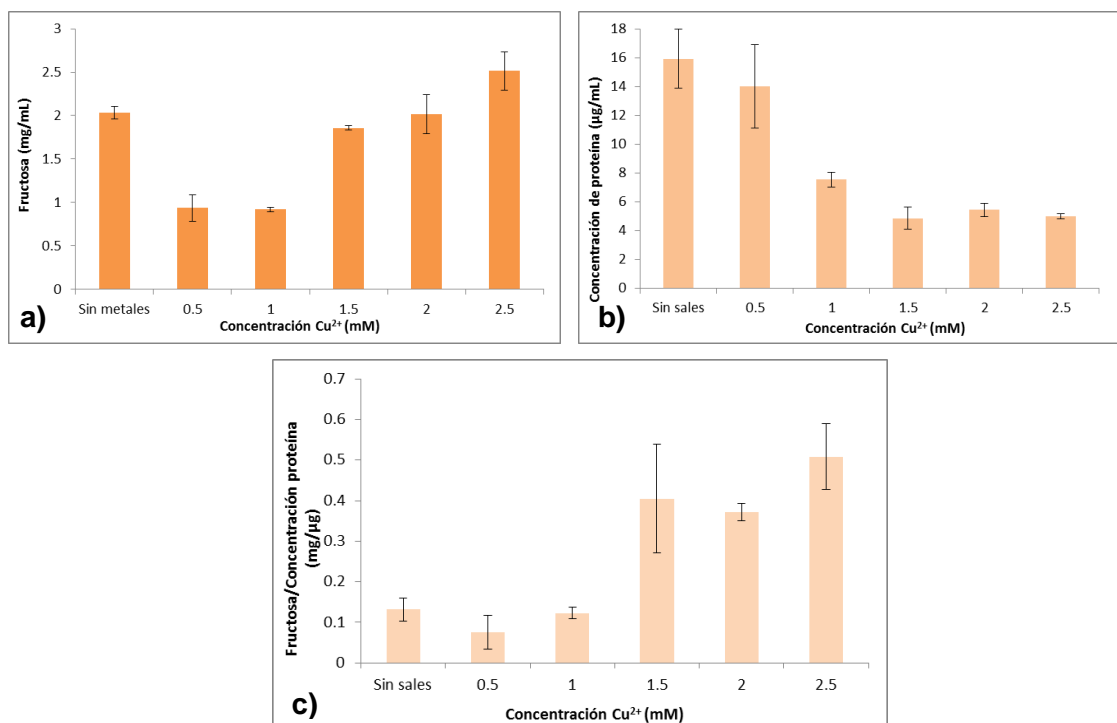


Figura 20. a) Actividad enzimática con Cu²⁺ adicionado al medio de cultivo de *K. marxianus* AZ8. **b)** Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Cu²⁺ adicionado al medio de cultivo. **c)** Relación del producto fructosa/concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Cu²⁺ adicionado al medio de cultivo.

En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos en este estudio para el ion Cu²⁺ y como se puede observar, hay un aumento en la producción de fructosa en la reacción enzimática conforme aumenta la concentración de CuSO₄ presente en el medio de crecimiento (a). De manera opuesta a la cantidad de proteína total en la muestra (b), produce un decremento en la producción de la proteína conforme aumenta la concentración de Cu²⁺ en el medio. Esto indicaría que hay un aumento en la actividad de la enzima ya que a menor cantidad de proteína se produce una mayor cantidad de fructosa en la reacción, sin embargo, se realizó una prueba para descartar un falso positivo generado por interferencia del ion en la reacción de DNS con la que se cuantifica el producto obtenido; los resultados de esta prueba (datos no mostrados) indican que sí hay un interferencia colorimétrica con el DNS, por lo que la señal aumenta y genera resultados alterados. Esto coincide con que a concentraciones bajas del metal, hay una menor actividad enzimática y menor producción de proteína y conforme aumenta dicha concentración de Cu²⁺

hay un decremento en la producción de la misma, por lo que se podría adjudicar este aumento en la señal de la actividad enzimática a la interferencia colorimétrica generada por el cobre. Debido a esto, se descarta el uso de este metal como parte del medio de cultivo para *K. marxianus* AZ8. Asimismo, esto coincide con los resultados ya reportados en otros estudios, en donde se encontró que el Cu^{2+} disminuye la actividad de la inulinasas producidas por esta levadura (Singh y Bhermi, 2008; Singh et al., 2007).

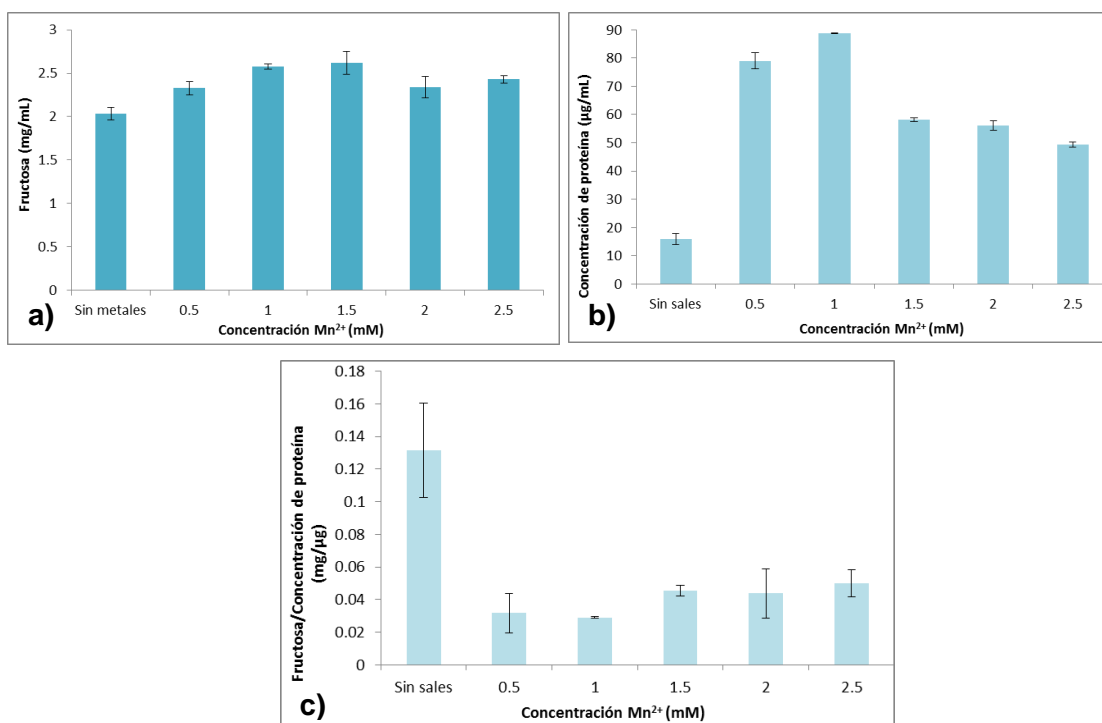


Figura 21. a) Actividad enzimática con Mn^{2+} adicionado al medio de cultivo de *K. marxianus* AZ8. **b)** Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Mn^{2+} adicionado al medio de cultivo. **c)** Relación del producto fructosa/ concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Mn^{2+} adicionado al medio de cultivo.

En la Figura 21 se muestran los resultados para el metal Mn^{2+} . El inciso a) nos indica que hay un pequeño aumento de actividad enzimática cuando el medio de cultivo tiene Mn^{2+} en él, Además hay un aumento considerable en la producción de proteína total en la muestra a las 36 h de crecimiento del microorganismo (Figura 21b). A consecuencia de esto, el índice fructosa/concentración de proteína se reduce, lo que nos indica entonces que las proteínas producidas por *K.*

marxianus AZ8 a las 36 h de crecimiento en presencia de Mn^{2+} no son inulinasas, Debido a esto, el $MnSO_4$ se descarta como componente del medio para la producción de la inulinasa ACH1.

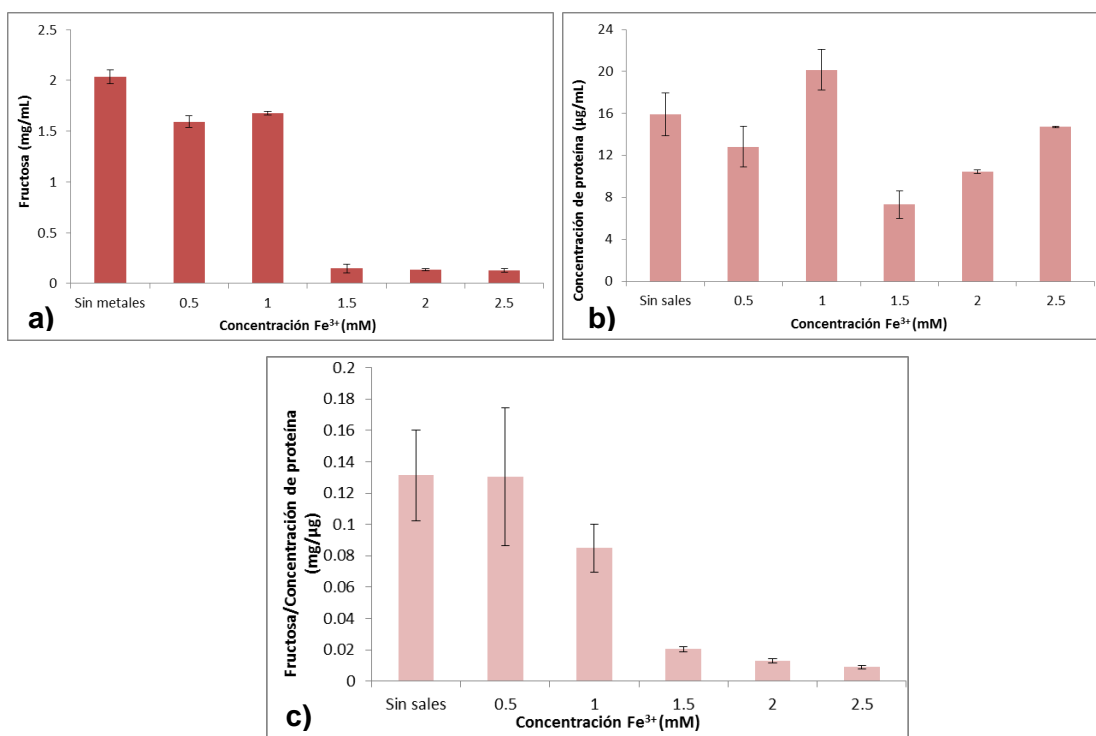


Figura 22. a) Actividad enzimática con Fe^{3+} adicionado al medio de cultivo de *K. marxianus* AZ8. **b)** Concentración de proteína a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Fe^{3+} adicionado al medio de cultivo. **c)** Relación del producto fructosa/concentración de proteína en la reacción enzimática de la muestra a las 36 h de crecimiento de la cepa AZ8 con Fe^{3+} adicionado al medio de cultivo.

Para el Fe^{3+} , cuyos resultados se muestran en la Figura 22, se observa que la presencia de este metal disminuye la actividad enzimática (incluso a concentraciones por arriba de 1.5 mM la actividad es cercana a cero (Tabla 9)), el contenido de proteína y por tanto, en la relación fructosa/concentración de proteína en la muestra. Debido a esto se descarta también como componente del medio de cultivo para la producción de la enzima de interés.

Tabla 9. Efecto de la presencia de metales en la producción y actividad de la inulinasa ACH1.

Concentración (mM)	Relatividad Fructosa producida/Proteína total en la reacción enzimática (%)				
	0.5	1	1.5	2	2.5
Mg²⁺	86.99	100.29	100.16	98.17	88.97
Ca²⁺	91.95	110.04	73.51	74.72	70.04
Cu²⁺	57.30	93.35	308.26	283.04	386.88
Mn²⁺	24.08	22.11	34.42	33.38	37.97
Fe³⁺	99.41	64.59	15.45	9.79	6.72

En general, se encontró que no hay un efecto positivo en la producción y actividad de la enzima en presencia de metales en el medio de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* AZ8.

8.3. Purificación de la enzima.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* cepa AZ8 para la producción de la inulinasa ACH1, las cuales son: inulina de *Agave tequilana* Weber variedad azul como fuente de carbono, pH inicial del medio de 5, 35°C de temperatura de incubación y sin la presencia de metales en el medio, ya que se no se observó efecto alguno para la producción de la enzima, se planteó la metodología para la purificación de la misma.

Primero, ya que se tuvo crecido el microorganismo, y dado que la inulinasa es una enzima extracelular, el medio se centrifugó para separar la biomasa y trabajar con el sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante se congeló a -80°C y se liofilizó para concentrarlo.

Una vez liofilizado, se dializó en buffer de fosfatos 20 mM pH 7.15 durante 24 h, favoreciendo el intercambio de sales mediante agitación y enfriando con un baño de hielo para evitar que la enzima se degradara. Transcurrido ese tiempo, la muestra se volvió a ultracongelar a -80°C y se liofilizó nuevamente para concentrarla.

Del extracto celular, dializado y liofilizado, se tomó una muestra para realizar un SDS-PAGE y así conocer la población proteica presente y estimar sus pesos moleculares para poder elegir el tipo de cromatografía a emplear para purificar la enzima de interés. En el SDS-PAGE se observaron únicamente dos bandas con distinto peso molecular, por lo que, al no tener una población de proteínas compleja, se decidió purificar mediante cromatografía de exclusión molecular.

Se usó una columna de exclusión molecular Superdex 200 de 24 mL de volumen para separar a la inulinasa ACH1 empleando las diferencias de peso molecular entre las proteínas en el extrato celular. Esta columna es capaz de separar proteínas que pueden ir de 10 hasta 600 kDa con una buena eficiencia. Se inyectaron 0.5 mL de muestra previamente filtrada, la fase móvil fue amortiguador de fosfatos 50 mM + 500mM de NaCl a pH 7.2. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 23, y se pueden observar dos picos que tienen proteína.

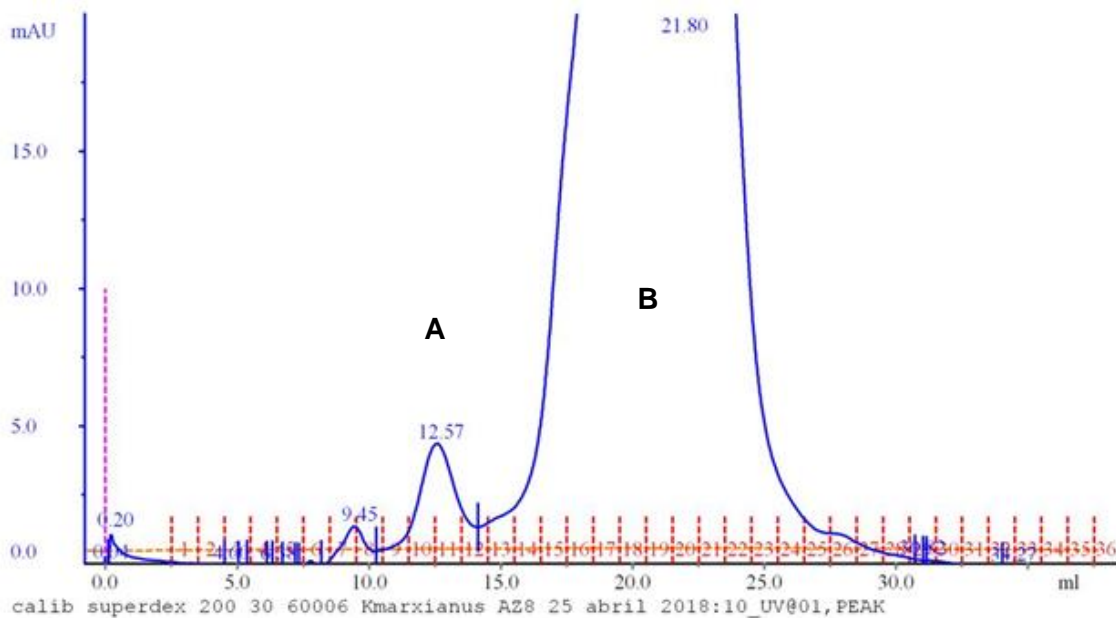


Figura 23. Cromatograma de exclusión molecular de la purificación de la inulinasa ACH1. NOTA: en el eje de las “y” se grafica la densidad óptica medida a 280 nm de longitud de onda.

Se recuperaron las fracciones A (10 y 11) y la fracción B (15-23). Se realizó el ensayo de actividad enzimática para identificar a la enzima de interés. La fracción

A tuvo una actividad de 203.1 U/mg de proteína, mientras que la fracción B no presentó actividad inulinolítica.

Para verificar la actividad enzimática de la fracción A y observar el producto de la reacción, y así conocer la naturaleza de la enzima en estudio, se realizó una cromatografía en capa fina. La cromatoplaqa se muestra en la Figura 24 y se puede observar que la concentración del producto de la reacción, que en este caso es fructosa, va en aumento, evidenciando con ello también la purificación. Al producir únicamente fructosa, indica que se trata de una exoinulinasa.

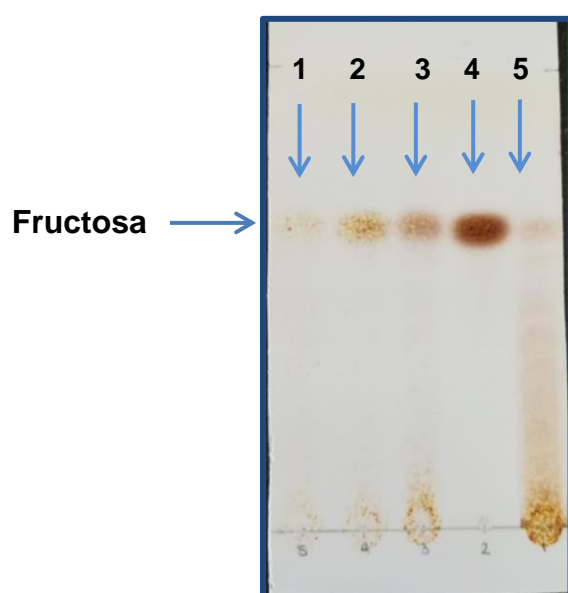


Figura 24. Cromatografía en capa fina de las reacciones de hidrólisis de inulina de *Agave azul* con inulinasa ACH1. 1) Extracto celular crudo. 2) Extracto celular liofilizado. 3) Enzima purificada por exclusión molecular. 4) Control de fructosa. 5) Control de inulina de *Agave tequilana Weber var. azul*.

Para verificar la pureza de la fracción obtenida de la cromatografía de exclusión molecular se realizó un SDS-PAGE, el cual se muestra en la Figura 25. La purificación de la inulinasa ACH1 fue exitosa, ya que se observa una sola banda, que corresponde al carril 3, indicando que solo hay una población proteica en las fracciones 10 y 11 recuperadas de la cromatografía llevada a cabo. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos del proceso de purificación. La inulinasa ACH1 tiene una actividad específica de 203.1 U/mg de proteína, y logró purificar

casi 11 veces a la enzima de interés con respecto al extracto celular crudo, teniendo un rendimiento cercano al 50%.

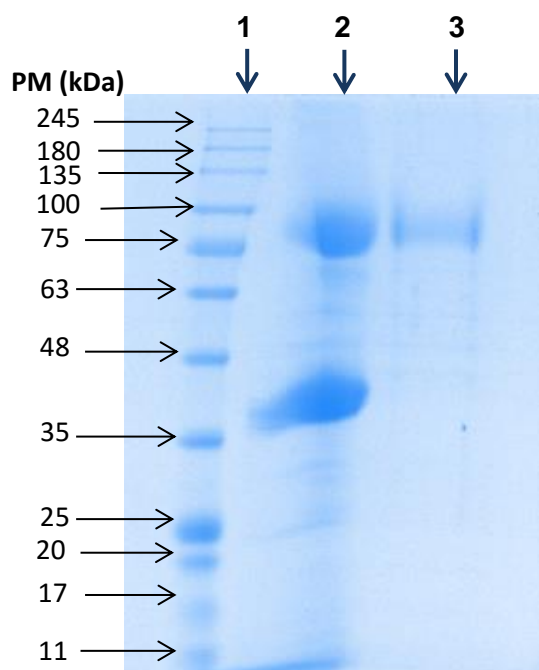


Figura 25. SDS-PAGE para la verificación y monitoreo de la purificación de la inulinasa ACH1. 1) Marcadores de peso molecular. 2) Extracto celular crudo. 3) Fracción A obtenida de la cromatografía de exclusión molecular.

Tabla 10. Tabla de purificación por cromatografía de exclusión molecular de la inulinasa ACH1 producida por *Kluyveromyces marxianus* AZ8.

Pasos de purificación	Volumen (mL)	Proteína (mg/mL)	U ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$)	Proteína total (mg)	U total ($\mu\text{mol/min}$)	U/mg de proteína	Rendimiento	Veces de purificación
Extracto crudo	92	0.00863	0.162	0.794	14.916	18.795	100.00	1.00
Exclusión molecular	16	0.00219	0.445	0.035	7.120	203.064	47.73	10.80

Para la determinación del peso molecular de la enzima se calibró la columna Superdex 200 empleando un kit de proteínas, las cuales se solubilizaron en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.2 para inyectarlas en el cromatógrafo. Para obtener el coeficiente de retención de la muestra en la columna (K_a) se utilizaron los volúmenes de elución y la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de retención (Ka)} = \frac{(\text{Volumen muestra} - \text{Volumen muerto})}{(\text{Volumen total} - \text{Volumen muerto})}$$

En donde el volumen muerto es el volumen de elución del azul de dextran y el volumen total es el volumen total de la columna que es 24 mL. En la Tabla 11 se muestran los volúmenes de elución de cada proteína empleada, así como el peso molecular de cada una.

Tabla 11. Valores de Ka y volúmenes de elución de los estándares empleados para la calibración de la columna Superdex 200.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Volumen de elución (mL)	Ka
Tiroglobulina (bovina)	670	10.33	0.25
gama-globulina (bovina)	158	13.53	0.42
Ovoalbúmina (gallina)	44	16.66	0.59
Mioglobina (caballo)	17	19.03	0.73
Vitamina B12	1.35	22.75	0.93
Azul de dextrana	2000	9.69	

Se realizó una regresión lineal de los datos obtenidos para poder determinar el peso molecular de la enzima de interés. El volumen de elución de la muestra es de 12.57 mL y un Ka de 0.2013, utilizando la ecuación de la recta se obtiene un peso molecular de 274.17 kDa. En contraste con el SDS-PAGE realizado, los datos indican que la enzima de interés tiene un peso molecular de aproximadamente 90 kDa, sin embargo, este peso es de la enzima desnaturalizada, lo que nos indicaría que la enzima nativa es un trímero.

El peso molecular obtenido de la inulinasa ACH1 es muy cercano al reportado en un trabajo anterior por Trapala en 2017, donde el peso molecular de la inulinasa producida por otra cepa de *K. marxianus* es de 256 kDa. Las ventajas que presenta la producción de la enzima por la cepa AZ8 son que se tiene un mayor rendimiento en la purificación y que se tiene la enzima en un tiempo de crecimiento menor que con la cepa ISO3.

IX. CONCLUSIONES

- Se encontró que la mejor fuente de carbono para la producción de la inulinasa ACH1 por la cepa de *K. marxianus* AZ8 es la inulina proveniente de *Agave tequilana* Weber variedad azul.
- Se determinó que el mejor pH inicial del medio de cultivo para la producción de la enzima de interés es 5 y la mejor temperatura de incubación para la obtención de la inulinasa ACH1 de la cepa AZ8 es a 35°C
- Se determinó que Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ y Fe³⁺ no mejoran la producción de la inulinasa ACH1 y su actividad.
- Se purificó exitosamente la enzima de interés 11 veces respecto al extracto celular con un rendimiento cercano al 50%. La actividad enzimática es de 203.1 U/mg de proteína.
- Se determinó que la inulinasa ACH1 tiene una naturaleza exoinulinolítica ya que se obtiene únicamente fructosa como producto de la reacción de hidrólisis de la agavina.
- El peso molecular de la inulinasa ACH1 es de 275 kDa, y posiblemente se trate de una proteína trímera.

X. PERSPECTIVAS

- Caracterizar cinéticamente a la inulinasa ACH1: Obtención de los parámetros cinéticos como K_m , $V_{máx}$, etc. Evaluar el efecto de la temperatura, pH, especificidad de sustrato.
- Caracterizar a la enzima: determinación de características como su punto isoeléctrico, posible estructura, etc.

- Evaluar si la enzima tiene actividad de transfructosilación para la obtención de FOS.
- Inmovilizado de la enzima para la obtención de fructosa y/o FOS.
- Identificar el gen codificante de la inulinasa en la cepa de *K. marxianus* para producir la proteína recombinante.

XI. ANEXOS

11.1. Curvas de crecimiento con barras de error

A continuación se muestran por separado las curvas de crecimiento de *K. marxianus* AZ8 en las distintas condiciones estudiadas, cada una con sus respectivas barras de error.

11.1.1. Fuente de carbono

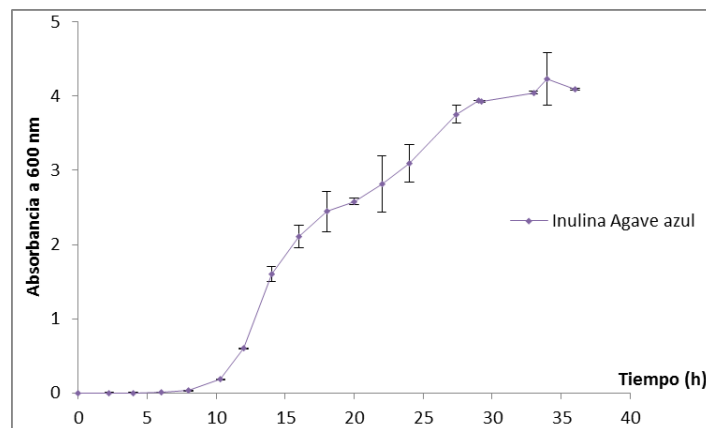


Figura 26. Curva de crecimiento con inulina de *Agave tequilana* Weber var. azul como fuente de carbono.

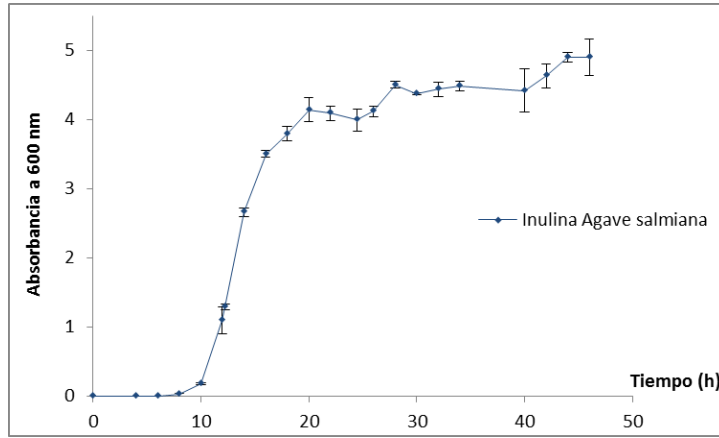


Figura 27. Curva de crecimiento con inulina de *Agave salmiana* como fuente de carbono.

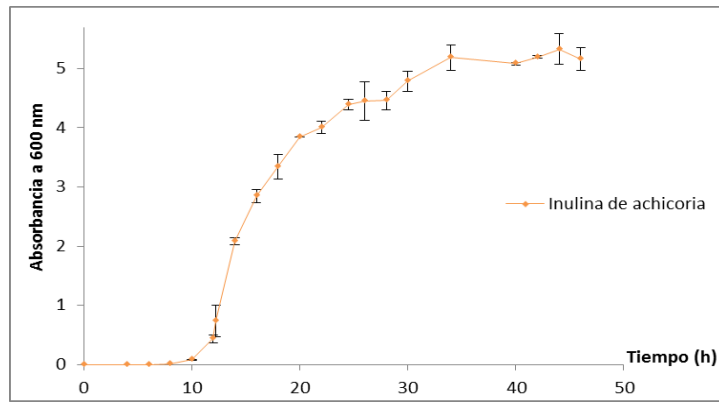


Figura 28. Curva de crecimiento con inulina de achicoria como fuente de carbono.

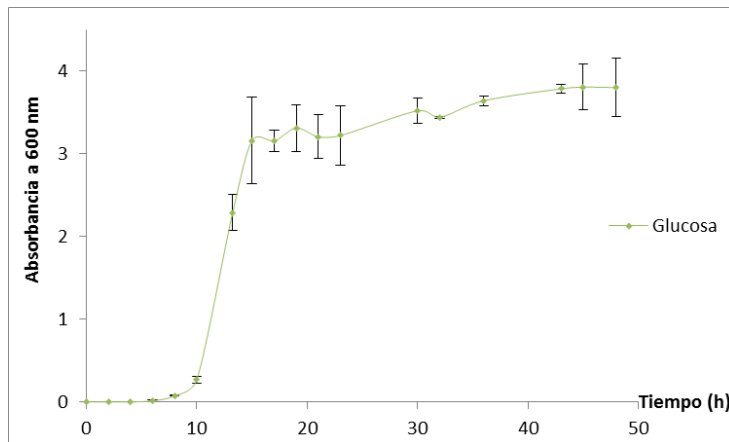


Figura 29. Curva de crecimiento con glucosa como fuente de carbono.

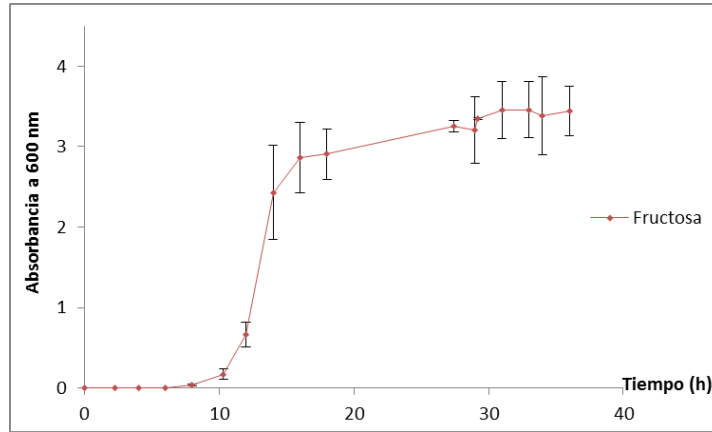


Figura 30. Curva de crecimiento con fructosa como fuente de carbono.

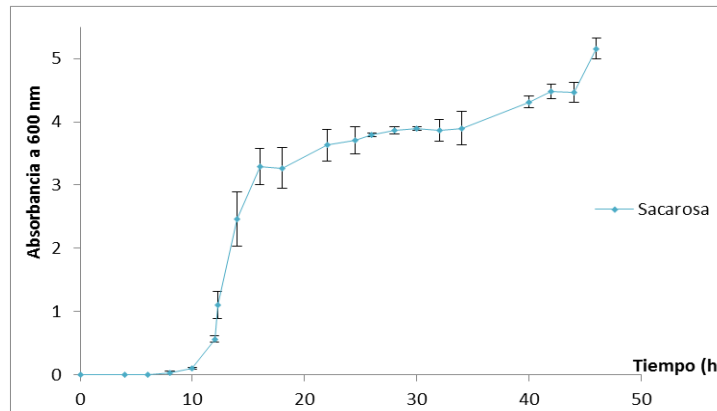


Figura 31. Curva de crecimiento con sacarosa como fuente de carbono.

11.1.2. pH

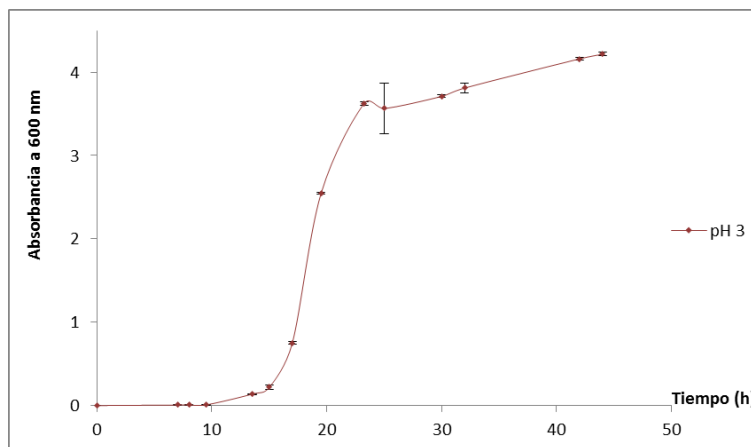


Figura 32. Curva de crecimiento con pH 3 inicial del medio.

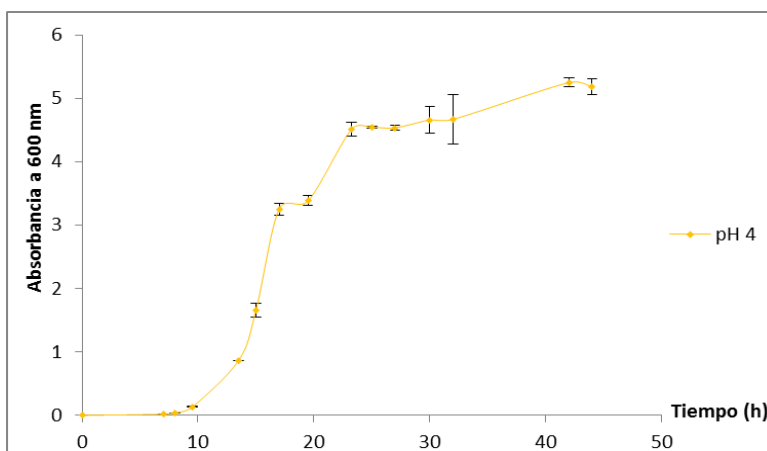


Figura 33. Curva de crecimiento con pH 4 inicial del medio.

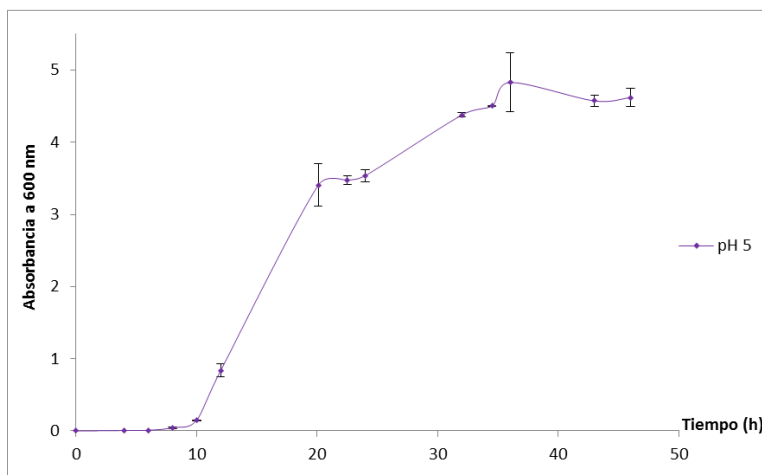


Figura 34. Curva de crecimiento con pH 5 inicial del medio.

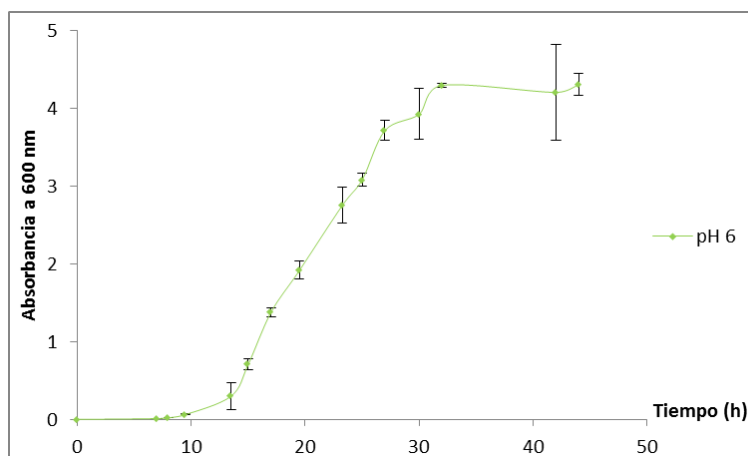


Figura 35. Curva de crecimiento con pH 6 inicial del medio.

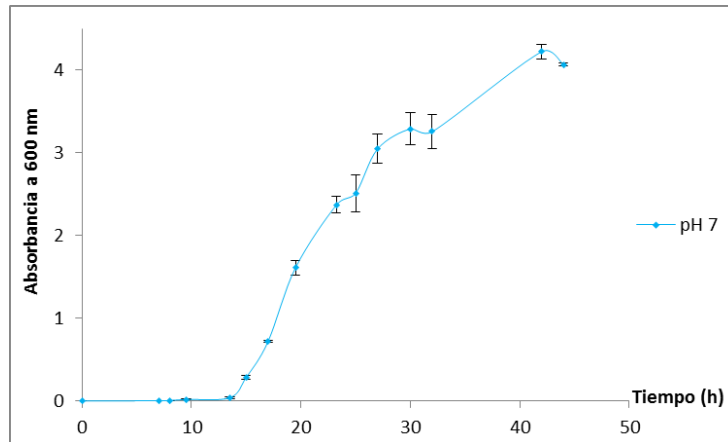


Figura 36. Curva de crecimiento con pH 7 inicial del medio.

11.1.3. Temperaturas

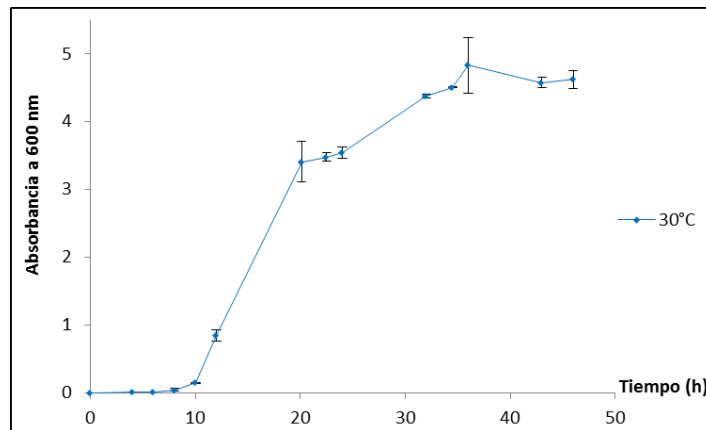


Figura 37. Curva de crecimiento a 30°C de temperatura de incubación.

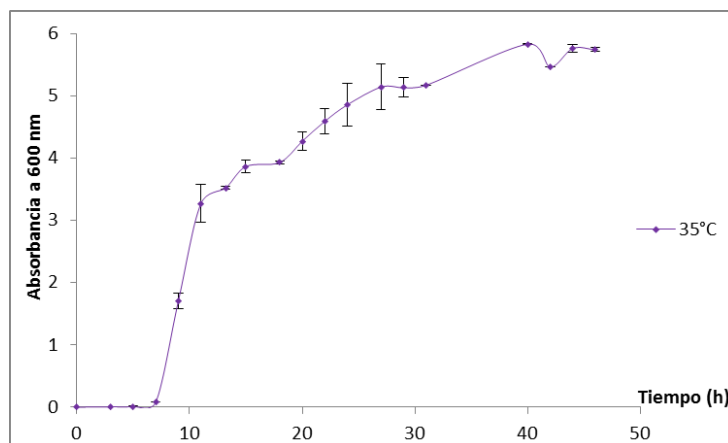


Figura 38. Curva de crecimiento a 35°C de temperatura de incubación.

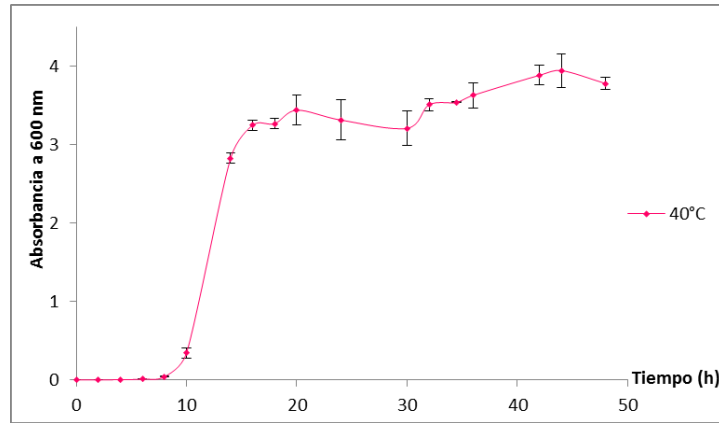


Figura 39. Curva de crecimiento a 40°C de temperatura de incubación.

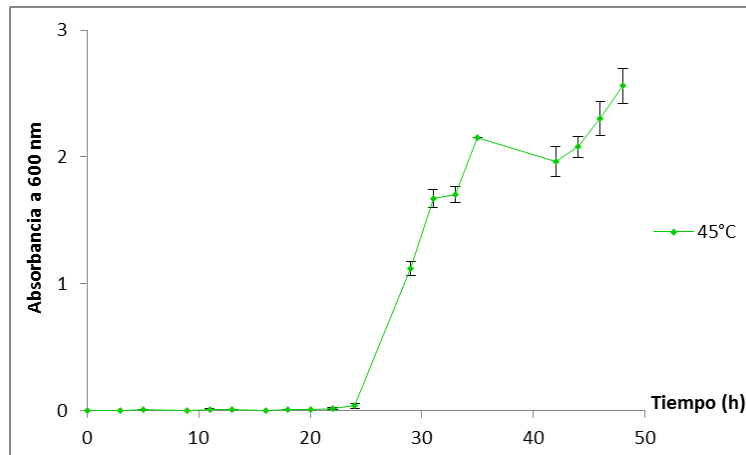


Figura 40. Curva de crecimiento a 45°C de temperatura de incubación.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Arrizón, J., Urias, J., Sandoval, G., Mancilla, A., Gschaedler, A., Morel, S. y Monsan, P., 2014. Production and Bioactivity of Fructan-Type Oligosaccharides. *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*, 1,184-199.

Ávila, Á., Galicia, N., Rodríguez, M., Olvera, C. y López, A., 2011. Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry*, 129, 380-386.

Castillo, A. y Chamy, R., 2010. Inulinase production by yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 1, 235-245.

Castillo, D., Villarreal, J. y Cano, A., 2007. El género *Agave* L. bajo cultivo: taxonomía, distribución y usos. *Ciencia Forestal en México*, 32 (101), 57-70.

Castro, A. y Guerrero, J., 2013. El agave y sus productos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7 (2), 53-61.

Cazetta, M., Martins, P., Monti, R. y Contiero, J., 2005. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. *Journal of Food Engineering*, 66: 301-305.

Cazetta, M., Monti, R. y Contiero, J., 2010. Effects of Culture Conditions on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 53 (3), 701-707.

Chi, M., Zhang, T., Cao, S., Liu, Y., Cui, W. y Zhao, H., 2011. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, 102, 4295-4303.

Conceição, A., Goulart de Lima, B., Esberard de Macêdo, N., Pessoa, A., Converti, A. y da Silva, J., 2013. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, 101, 368–378.

Consejo Regulador del Tequila, 2017. Información obtenida el 23 de noviembre de 2017. Disponible en <http://www.crt.org.mx/>

Corona, R., Pelayo, C., González, V. y Zuñiga, V., 2005. Optimización de la producción de inulinasas por *Saccharomyces sp.* a partir de Agave tequilana Weber variedad azul. *e-Gnosis*, 3 (8).

Fukuhara, H., 2006. *Kluyveromyces lactis*- a retrospective. *FEMS Yeast Res.*, 6, 323-324.

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, 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 No. 5*, 109-129.

Ghose, T. 1987. Measurement of cellulase activities. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. 59, 257-268.

Gibson, R., y Roberfroid, B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.

Golunski, S., Astolfi, V., Carniel, N., 2011. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*, 78, 261-265.

González, Y., González, O. y Nungaray, J., 2005. Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis*, 13 (14).

Illsley, C., 2004. Manual de manejo campesino de magueyes mezcaleros. Grupo de Estudios Ambientales A.C., CONABIO. Rainforest Alliance. Fundación Ford. SSS Sanzekan Tinemi.

Kango, N., Jain, S., 2011. Production and Properties of Microbial Inulinases: Recent Advances. *Food Biotechnology*, 25 (3), 165-212.

Kurtzman, P. y Robnett, J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.

Lachance, A., 1998. *Kluyveromyces van der Walt* emend. *van der Walt*. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds), *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier, 227-247.

Lane, M. y Morrissey, J., 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *British Mycological Society*, 24, 17-26.

Lehninger, A., Nelson, D. y Cox, M., 2009. *Principios de bioquímica*. 5ª edición. Barcelona: Ediciones Omega.

Llorente, B., Malpertuy, A., Blandin, G., Artiguenave, F., Wincker, P. y Dujon, B., 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*. *FEBS Lett.*, 487, 71-75.

López, M. y Mancilla, N., 2007. The nature of fructooligosaccharides in Agave plants. *Research Signpost*, 37 (2), 47-67.

Nieto, R., Vargas, J., Nieto, J., Rodríguez, A., Jiménez, V., Hernández, J. y Ortíz, M., 2016. *El Cultivo de maguey pulquero (Agave salmiana) en el Valle del Mezquital*. Primera edición. Hidalgo. Universidad Politécnica de Francisco I. Madero.

Madigan, M., Martinko, J., 2009. *Biología de los Microorganismos*. 12ª edición, Madrid: Editorial Pearson.

Madrigal, L. y Sangronis, E., 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57, 387-396.

Martín, I., 2018. Diversidad microbiana y taxonomía: Crecimiento diaúxico. Universidad de Granada. Información obtenida el 25 de abril de 2018. Disponible en

http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=471&Itemid=519

Molina, J., Botello, J., Estrada, A., Navarrete, J., Jiménez, H., Cárdenas, M. y Rico, R., 2007. Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41-50.

Morales, N. y Esparza, G., 2002. Plan Estratégico de Desarrollo para la Región agavera del Sureste de Zacatecas. Secretaría de Economía. Secretaría de Desarrollo Agropecuario de Zacatecas. Secretaría de Desarrollo Económico de Zacatecas. Centro Regional Universitario Norte de la Universidad autónoma de Chapingo.

Praznik, W., Cieslik, E., y López, M., 2002. Composition of nutritional components in *Agave tequilana Weber var. azul*. *Seminar on Inulin*, 9, 18-19.

Robert, J., 2013. Obtención de inulinasas. Identificación y caracterización de cepas que emplean inulina ramificada como única fuente de carbono. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Roca, P., Oliver, J. y Rodríguez, A., 2003. *Bioquímica. Técnicas y métodos*. Madrid: Editorial Hélice.

Salcedo, J., Montes, E. y Pajaro, J., 2009. Producción de jarabes de fructosa por medio de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca de las variedades *Corpoica M TAI-8* y *Corpoica orense*. *DYNA*, 76(160).

Sánchez, V., 2014. Desarrollan bioetanol con desechos de la industria tequilera. CONACyT, Agenda Informativa. Información obtenida el 23 de abril de 2018. Disponible en

<http://www.conacytprensa.mx/index.php/tecnologia/biotecnologia/270-bioetanol-tequila>

Schaffrath, R. y Breunig, D., 2000. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Fungal Genet. Biol., 30, 173-190.

SIAP, 2017. Anuario estadístico de la producción agrícola. Información obtenida el 18 de octubre de 2017. Disponible en <http://www.siap.gob.mx>

Singh, R. y Bhermi, H., 2008. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis*. Bioresource Technology, 99, 7418–7423.

Singh, R., Chauhan, K., Kennedy, J., 2017. A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. International Journal of Biological Macromolecules, 96, 312-322.

Singh, R., Singh, B. y Puri, M., 2007. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Bioresource Technology, 98, 2518-2525.

Servin, J., 2009. Puro corazón de maguey. El Universal. Información obtenida el 25 de noviembre de 2017. Disponible en <http://www.eluniversal.com.mx/articulos/56568.html>.

Trapala, J., 2017. Obtención y caracterización de inulinasas a partir de *Kluyveromyces sp.* en la hidrólisis de agavina. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.

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

Verdugo, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Ramírez, A., Gonzáles, A., Coria, R. y Gschaedler, A., 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentation from *Agave salmiana*. Antonie van Leeuwenhaek, 100(4), 497-506.

Voet, D. y Voet, J., 2006. Bioquímica. 3ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.