

1986 - 2

REG. No. 082198598

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



"HIDROLISIS ENZIMATICA DE FRUCTANA DE
Agave Tequilana Weber"

Martha Angélica Hermosillo Estrada

" HIDROLISIS ENZIMATICA DE FRUCTANA
DE AGAVE tequilana WEBER "

M. Angélica Hermosillo Estrada

DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. Rosa Ma. Domínguez A.

ASESORES DE TESIS

M.en C. Virgilio Zúñiga P.

Dr. Sergio Aguilar B.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios -
por haberme permitido
la conclusión de mis
estudios profesiona--
les,.....

A mis queridos padres, Dr. Salvador
Hermosillo Hdez. y Tana Estrada de
Hermosillo, con todo mi cariño les
dedico este trabajo, que es fruto -
de los esfuerzos realizados para -
llevarme adelante en el camino.

A los profesores Srita. Q.F.B.
Rosa Ma. Domfnguez A. y el Sr.
Dr. Sergio Aguilar B., con mi
gran admiración, cariño y res-
peto, quienes con su paciencia
y apoyo desinteresado, colabo-
raron en la realización de es-
te trabajo.

Agradezco al Instituto de Madera, Celulosa y Papel la oportunidad de realizar este trabajo.

Al M. en C. Virgilio Zúñiga P. quien me brindó todas las facilidades para la elaboración de este trabajo, así como por su asesoría y consejos.

A todo el personal del Departamento de Bioingeniería del IMCyP por su gran apoyo, ayuda y amistad.

Doy las más sinceras y fervientes palabras de agradecimiento a todos aquellos que hicieron posible la realización de esta meta. A aquellas personas que me hicieron comprender no únicamente la ciencia de la Biología, sino que me hicieron comprenderme más a mí misma.

Caríñosamente a mis maestros y amigos.

I N D I C E

	Pág.
1.- INTRODUCCION	1
2.- OBJETIVO	3
3.- GENERALIDADES	5
4.- MATERIAL Y METODOS	20
5.- RESULTADOS	70
6.- DISCUSION	90
7.- CONCLUSIONES	100
8.- BIBLIOGRAFIA	103
9.- APENDICE	108
10.- CARTA DE ACEPTACION DE TEMA	
11.- CARTA DEL VºBº DEL DIRECTOR DE TESIS	

INTRODUCCION

"HIDROLISIS ENZIMATICA DE FRUCTANA DE Agave tequilana Weber"

INTRODUCCION

El uso de la fructosa como un agente edulcorante - ha atraído una considerable atención (13,26). Las razones de este hecho se basan en que la D-fructosa tiene un mayor poder dulcificante con respecto a la sacarosa y D-glucosa; también tiene interesantes cualidades nutricionales, bajo cariogenicidad, independencia a la insulina, aceleración del metabolismo del etanol y ayuda en la absorción de fierro (12,14,25).

En la industria, los jarabes de fructosa son útiles, no sólo en la confitería, previniendo la desecación y cristalización del azúcar, sino también por sus propiedades antioxidantes y de retención del agua (13,19,25,26).

En realidad la fructosa aparece cada vez más, como un edulcorante de menores efectos que la sacarosa, el cual causa problemas relacionados a obesidad, cariogenicidad, atherosclerosis y diabetes. Además, la fructosa es más soluble que la sacarosa y puede enmascarar el sabor amargo residual de la sacarina (12,26).

La D-fructosa puede ser obtenida directamente a partir de frutas, o por la oxidación de D-manitol o D-glucitol (sorbitol). Una mezcla equimolar de D-fructosa y D-glucosa puede ser preparada por inversión de sacarosa o por isomerización de D-glucosa (5,12,13).

Uno de los métodos para la producción de D-fructosa el cual ha recibido una considerable atención, involu-

cra la utilización de las D-fructanas naturales. La D-fructana más comúnmente considerada es la inulina (2,1-B-D-fructana) (8,12,19,26).

La hidrólisis de inulina produce jarabes con más del 75% de fructosa (12,13,19,26).

Procesos químicos y enzimáticos han sido propuestos y algunos de ellos han sido probados en operaciones industriales. Los procesos de hidrólisis químicos han sido muy estudiados; sin embargo, ellos requieren de grandes cantidades de energía y están sujetos a numerosas reacciones secundarias (8,19,26).

Los procesos enzimáticos utilizando inulasas microbianas (2,1-B-D-fructanahidrolasa, EC .3.2.17.) ofrecen la formación de fructosa a partir de inulina a un sencillo paso de una reacción enzimática y con un rendimiento de fructosa hasta arriba del 95% (11,19,26). Las reacciones enzimáticas, por ser específicas no generan reacciones secundarias y su alta eficiencia redonda en un ahorro considerable de energía (11,26).

LOS OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO SON:

OBJETIVO PARTICULAR: 1.0. El desarrollo de un proceso enzimático responsable de la degradación de fructana para la obtención de fructosa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1.0.1.- Aislamiento y caracterización de una levadura productora de fructanas.

1.0.2.- El estudio del sistema enzimático_ responsable de la degradación de la fructana.

1.0.3.- Determinación de las condiciones - óptimas de reacción de la fructanasa sobre el jugo de A. tequilana.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

Agave tequilana Weber: Bull. Mus. His. Nat. 8:220 1902

El Agave de la especie A. tequilana es una planta que pertenece a la familia Agavaceae (Hutchinson, 26), género Agave.

Caulescente, hojas más o menos verdes azulosas y persistentemente glaucas, delgadas y casi planas, de 8-10 cm. de ancho, 1.25 m. de largo o más, con espina café rojiza o café púrpura de 3-4 cm. de ancho y 15-20 mm. de largo y dientes triangulares rojizos curvados hacia arriba, con 10-15 mm. de separación y 3-4 mm. de largo.

El ciclo vegetativo comprende de 8 a 10 años, llegando en algunos casos hasta 16 años. Es propio de lugares áridos.

Se cultiva en los siguientes Estados de la República Mexicana: Jalisco, Nayarit, Michoacán, Tamaulipas y Guanajuato (22).

El A. tequilana no sólo es útil para la elaboración de bebidas alcohólicas, sino también como fuente potencial en la obtención de fructanas; el contenido de fructanas de esta especie es extraordinaria del 15-25% y está considerada dentro de los Agaves con las más altas concentraciones de azúcares (22).

En esta especie los azúcares se encuentran como material de reserva en el tallo principalmente, en formas polimerizadas de fructanas, recomendándose la hidrólisis por vía ácida o enzimática para obtener del oligosacárido

predominante la fructosa acompañada de pequeñas cantidades de glucosa (22,23).

Se han reportado pocos estudios sobre la estructura de la fructana en A. tequilana, conociéndose más acerca de la estructura de la fructana de A. veracruz; Aspinall y Das Aupta (3) encontraron que en A. veracruz existen polifructosanas que constituyen la mayor fracción y, además, sacarosa, glucosa y fructosa como fracciones menores; asimismo que cada fructosana contiene como promedio un residuo de glucosa por molécula. La hidrólisis de la fructosana metilada dio: 2:3:4:6-tetra-0-metil-D-glucosa, y 1:3:4:6:tetra-3:4:6-3:4:6-tri-1:3:4:tri y 3:4-di-0-metil-D-metil-D-fructosa con un rango molar aproximado de 1:8:10:5:7. Se obtuvo evidencia para sacarosa derivada de la hidrólisis ácida parcial de la fructosana. La mayor parte del material posee, por lo tanto, una estructura molecular que incluye una cadena altamente ramificada de ca. 30 2:1 y residuos 2:6 enlazados B-D-fructofuranosa terminadas por un residuo D-glucopiranososa no-reductor como en la sacarosa (3,22,23).

La transfructosilasa, que se encuentra en el tallo, puede sintetizar glucosa y fructanas de bajo peso molecular a partir de la sacarosa (20,21,22,23).

Las ventajas del potencial selectivo de la posesión de un metabolismo de fructanas en diferentes especies son evaluadas con referencia a posibles papeles como crioprotectores, en control osmótico y como almacén de carbohidratos cuyo metabolismo puede continuar a bajas temperaturas (0 a 5°C). Se concluye que la complejidad y variedad de estructuras de fructanas y los sistemas en-

zimáticos asociados resultan todavía de un entendimiento_ incompleto de su fisiología y bioquímica (20,21).

FRUCTANAS

Las fructanas son homopolisacáridos compuestos de unidades de D-fructofuranosa (21,23).

Estos polímeros se encuentran como la única reserva de carbohidratos o junto con el almidón u otros polisacáridos (23,24), en las Angiospermas (Mono y Dicotiledóneas) (21,23).

Las fructanas se pueden encontrar en las siguientes familias:

Asteraceae: Jerusalem artichoke, Dahlia, Chicory

Liliaceae : Garlic

Agavaceae : Agave veracruz, Furcraea gigantia

Amaryllidaceae, Boraginaceae, Campanulaceae, Graminaceae, Dipsacaceae (17,23,26).

Inicialmente, las fructanas fueron reconocidas por su levorrotación y su alta solubilidad en agua (21,23,26). Subsecuentemente, éstas fueron mostrando que los polímeros eran no-reductores y débilmente digeridos por una invertasa microbiana (2,21), y la fructosa fue el principal azúcar liberado por hidrólisis con ácido débil (16,21). Los métodos de separación se basaron en la diferencia de solubilidad de las fructanas de diferentes tamaños en etanol, y esto demostró la dificultad de obtener preparaciones puras y fuera representativo el tamaño del polímero inicial (20, 21).

PROPIEDADES DE LAS FRUCTANAS

Son en general polvos higroscópicos blancos, insf-

pidos e inodoros, empezando hacerse gomosos al exponerse al aire. No tienen un punto de difusión definida (20,21,23).

Las fructanas son insolubles en etanol-acetona, pero solubles en agua (21,23).

Algunas (inulina) son poco solubles en agua fría; en cambio otras (fructanas de pasto) son sumamente solubles (21,23,26).

Son muy susceptibles a hidrólisis algunas de ellas hasta en agua hirviendo, o con una temperatura y ácido N/700 en 3 minutos o por calentamiento por 10 minutos con ácido N/10. También pueden ser hidrolizados por la invertasa e inulasa (21,23,26).

MÉTODOS DE AISLAMIENTO, DETECCIÓN Y ESTIMACION

Los oligosacáridos existen libres en las plantas y generalmente se obtienen a partir del jugo extraído por presión o haciendo un extracto con la planta pulverizada a un 70% de etanol.

El extracto alcohólico libre de agua se desioniza (en columnas de intercambio iónico) y después adsorbido en una columna de carbón-celite. Lavados sucesivos con agua o en etanol al 5% permiten separar monosacáridos y sacarosa (23).

INULINA

La fructana más interesante es la inulina; ésta -- consiste de cadenas de polifruetosa B(2-1) unidas lineal-

mente con una unidad de glucosa terminal (Fig. 1).

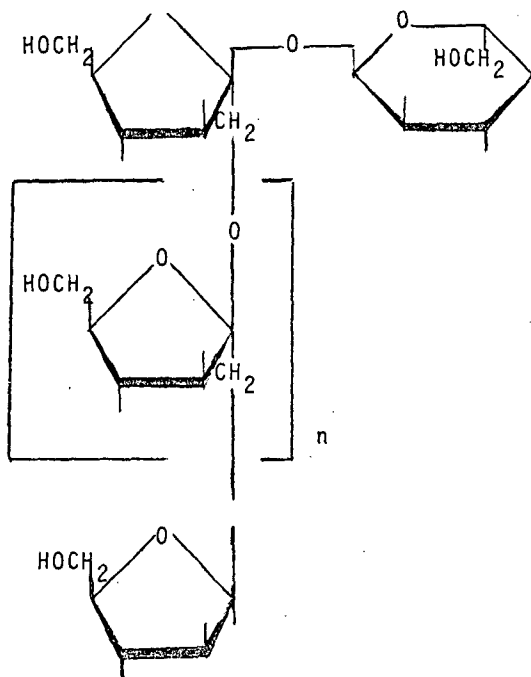


Fig. 1. Estructura esquemática del polímero inulina.

Alrededor de 30 unidades de fructosa como mínimo, - por ejemplo, el grado de polimerización (D.P.) debe de - ser de 30 o mayor. Esto corresponde a un peso molecular - de por lo menos 5,400. Prácticamente, mayores así como - menores grados de polimerización ocurren en la misma plan - ta. Debido a esta variación en lo largo de la cadena, el peso molecular de la inulina varía entre \pm 3500 a 5500 - (26).

PROPIEDADES DE LA INULINA

La inulina es insoluble en agua - - -

fría; aún en agua a 55°C, la inulina resulta ligeramente soluble 5%. Puede ser precipitada en mezclas de etanol--agua. Es hidrolizable en un medio ácido a una alta temperatura (70-80°C). Inulasas de plantas y de microorganismos hidrolizan la inulina en fructosa u otros oligosacáridos bajo condiciones de reacciones suaves (26).

LEVADURAS

Las levaduras son microorganismos, de origen vegetal que pertenecen a la subdivisión de las Talofitas, designada como Eumicetos u Hongos verdaderos.

Se caracterizan por carecer de clorofila y por lo consiguiente, no están capacitadas para elaborar hidratos de carbono y tienen que depender de las plantas superiores y de los animales, para obtener su energía, la cual pueden conseguir por desasimilación oxidante aeróbica o por fermentación anaerobia; siendo por tal motivo, algunas saprófitas y otras parásitas.

Estos hongos no poseen flagelos u órganos de locomoción; pueden vivir aislados o formando colonias, pero en estas últimas conservando siempre su individualidad como plantas unicelulares (1).

DELIMITACION DE LEVADURAS

Hay 4 grupos de levaduras (15) :

- 1.- Incluye a las levaduras ascospógenas pertenecientes a los Ascomycetos las cuales pueden formar ascas y ascosporas.

- 2.- Pertenece al orden de los Ustilaginales de los Basidiomycetes e incluye a dos géneros: Leucosporidium y Rhodosporidium (se incluyen en este grupo debido a sus ciclos de vida).
- 3.- Compromete a los organismos levaduriformes que se clasifican en la familia Sporobolomycetae. Esta familia se caracteriza por la formación de balistosporas y está muy relacionado o pertenece a los Basidiomycetes.
- 4.- En el cuarto grupo está incluido el grupo de Hongos Imperfectos en el que no hay formación de esporas sexuales o ciclos de vida sexuales no han sido observados.

Dentro del grupo de Hongos Imperfectos se encuentra la familia Cryptococcaceae la cual se describirá más adelante porque la levadura utilizada en este trabajo fue de esta familia perteneciente al género Candida (Ver cuadro 1).

Familia Cryptococcaceae

Siempre presentes levaduras gemantes; pseudomicelio, micelio verdadero y artrosporas pueden ser formados. Células hialinas, rojas, naranjadas o amarillas debido a pigmentos carotenoides, muy rara vez café o negras. Desasimilación estrictamente oxidativa u oxidativa y fermentativa (15).

Género Candida

Las células pueden ser globosas, ovoides, cilíndricas o elongadas; algunas veces de forma irregular. Repro

ducción normalmente por gemación multipolar; células con aparente gemación bipolar normalmente no geman sobre una base ancha. Formación de pseudomicelio por todas o la mayoría de cepas de todas las especies y variedades pueden ser formadas clamidosporas; micelio verdadero puede ser formado. La fermentación alcohólica ocurre en varias especies (15).

CLASIFICACION DE LEVADURAS

Reino	Myceteae ó Fungi		
Clase :	Ascomycetes	Basidiomycetes	Deuteromycetes
Subclase :	Hemiascomycetidae	Teliomycetidae	Blastomycetidae
Orden :	Endomycetales	Ustilaginales	Sporobolomycetales Cryptococcales
Familia :	Saccharomycetaceae		Cryptococcaceae
Género	1. <u>Saccharomyces</u> 2. <u>Pichia</u> 3. <u>Hansenula</u> 4. <u>Nadsonia</u> 5. <u>Wickerhamia</u>	1. <u>Leucosporidium</u> 2. <u>Rhodospodium</u> 3. <u>Aessesporon</u> 4. <u>Sporidiobolus</u> 5. <u>Filobasidium</u> *	1. <u>Sporobolomyces</u> 2. <u>Butlera</u> 1. <u>Candida</u> 2. <u>Torulopsis</u> 3. <u>Rhodolorula</u> 4. <u>Pityrosporom</u> 5. <u>Cryptococcus</u> 6. <u>Trichosporon</u> 7. <u>Kloeckera</u> 8. <u>Trigonopsis</u>

* Los géneros comprendidos en el orden Ustilaginales corresponden a los estados perfectos de algunas levaduras de la familia Cryptococcaceae

CUADRO 1

Clasificación de levaduras de acuerdo a Alexopoulos (1).

INULASAS

La razón principal del atractivo de los microorganismos como fuentes potenciales de enzima se debe al hecho de la facilidad con que los niveles enzimáticos pueden ser incrementados por manipulaciones ambientales y genéticos (26).

Hay enzimas microbianas que son capaces de hidrolizar polímeros a interesantes monómeros; como la enzima microbiana, inulasa hidroliza el polímero de plantas (inulina) a fructosa pura (26).

La mayoría de inulasas son de hecho B-fructosidasas y separa las moléculas de fructosa de la terminal no reductora de la molécula inulina o de ciertos azúcares, desplazando una unidad de fructosa en la posición terminal B-2-1: estas enzimas pueden ser designadas como 2,1-B-D-fructana-fructanahidrolasas (EC 3.2.17). Muy diferente a las invertasas, las cuales específicamente hidrolizan sucrosa a glucosa y fructosa, las cuales pueden ser clasificadas como B-D-fructo-furanoside-fructohidrolasas (EC 3.2.1.26).

Inulasas con actividad B-fructosidasa se encuentran en plantas y en microorganismos, incluyendo, hongos, levaduras y bacterias. Sin embargo, una consistente clasificación de los diversos tipos de inulasas hasta ahora descritos no han sido considerados (26).

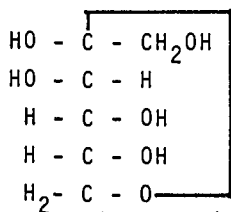
HIDROLISIS ACIDA VS. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA INULINA

Información reciente obtenida por Grootwassink y -

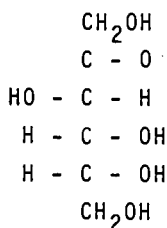
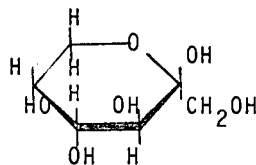
Fleming (1980) enfatizan que la hidrólisis enzimática de la inulina a fructosa es más favorable que la hidrólisis química. Ellos encontraron que 8 hrs. después de la hidrólisis ácida, el 83% del contenido total de azúcares reductores consistía de 58% de mono- y 25% de disacáridos; y con 6 hrs. de hidrólisis enzimática, el 82% de azúcares reductores totales consistía el 79% de monosacáridos y solamente el 3% de disacáridos. Estas observaciones favorecen claramente el proceso de hidrólisis enzimática: aún el 3% de disacáridos son posteriormente hidrolizados a monosacáridos por la actividad prolongada de la Inulina-sa. Aun más, la hidrólisis enzimática total dentro de 3 horas a 50°C no causó coloración no deseada; solamente después de 8 horas, se observó una ligera coloración. La hidrólisis ácida siempre produjo una indeseable coloración del hidrolizado de inulina. Los cambios en sabor y aroma son mínimos con hidrólisis enzimática. La hidrólisis ácida siempre produjo la formación de \pm 5% de difructosa anhídrida, la cual prácticamente carece de propiedades edulcorantes; es más, este compuesto no puede ser posteriormente hidrolizado enzimáticamente en fructosa y así como tampoco ser retirado del jarabe de fructosa (10,26).

EL PRODUCTO FINAL D-FRUCTOSA

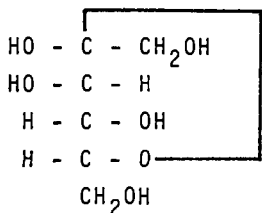
La acción de la inulasa sobre la inulina da como resultado una abundante formación de D-fructosa con algo de glucosa. Fructosa (Fig. 2) es el compuesto de azúcar natural más dulce de los conocidos (26).



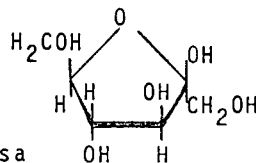
B-D-fructopiranososa



Keto-D-fructosa



Proyecciones FISCHER



B-D-fructofuranosa

Fórmulas HAWORTH

Fig. 2 Fórmulas Estructurales de Fructosa

La formación de fructosa a partir de inulina es un sencillo paso de una reacción enzimática y con un rendimiento de fructosa hasta arriba del 95% (26). Siendo que en otros países la producción convencional de fructosa se

lleva a cabo a partir del almidón requiriendo por lo menos tres pasos enzimáticos; la acción de α -amilasa, amiloglucosidasa y glucosa isomerasa, rindiendo aproximadamente soluciones de fructosa del 45% como máximo (13,26).

En nuestro medio es posible obtener jarabes con un contenido de fructosa arriba del 90% a partir de Jugo de Agave mediante un proceso más simple que el anteriormente señalado (22).

PROPIEDADES

- Al contrario del azúcar de mesa o sacarosa el consumo de fructosa no produce elevaciones o bajas extremas en los niveles de azúcar sanguíneo. En particular, muchos expertos consideran el alto nivel de azúcar en la sangre y los niveles de insulina, como factores de riesgo en el desarrollo de ciertas condiciones de enfermedad. Puesto que los niveles de azúcar en la sangre e insulina son mucho más bajos después de ingerir fructosa que después de comer azúcar ordinaria (14), la fructosa ofrece una clara alternativa a la gente en relación a su salud.

- La fructosa es tolerada por diabéticos, urémicos, cardíacos, hepáticos, convalecientes y enfermos en general, sin perder su valor nutritivo, pero sí reduciendo el número de calorías, de tal manera que es aconsejable, además, en los programas dietéticos tendientes a la reducción de peso (22).

- Tiene la propiedad de hacer resaltar el sabor y el aroma de diversos productos alimenticios, reduce apreciablemente el sabor amargo que dejan edulcorantes sintéticos.

como la sacarina, reforzando en cambio su poder dulcificante (12,19,26).

- En la industria tiene aplicación como edulcorante ino-
cuo y de algunas propiedades deseables como por ejemplo -
su hidrofilia permite conservar la "suavidad" de los pro-
ductos después de largos períodos de almacenamiento; su -
viscosidad propia confiere a los alimentos una consisten-
cia deseable; su alta solubilidad se manifiesta en que -
los jarabes, mermeladas, dulces, ates, cajetas, etc., que
se preparan a base de fructosa, no cristalizan, ni forman
granulaciones; su cualidad de "dar cuerpo" a algunas bebi-
das alcohólicas, refrescos, néctares (12,19,25,26).

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR DE DEXTROSA Y PAPA (BIOXON)

(grs/lt)

Infusión de papa	200.0
Dextrosa	20.0
Agar	15.0
pH final	5.6 \pm 0.2

PROCEDIMIENTO:

Se suspendió 39.0 grs. del polvo en un litro de agua destilada. Y se sometió a ebullición 1 minuto. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

CALDO DE DEXTROSA Y SABOURAUD (BIOXON)

Fórmula aproximada en grs.por lt.de agua destilada:

Peptona	10.0
Dextrosa	40.0
pH final	5.6 \pm 0.2

PROCEDIMIENTO:

Se suspendió 32.5 grs. del polvo de Agar de Saboraud y Dextrosa en un litro de agua destilada. Se mezcló bien hasta obtener una suspensión uniforme. Se calentó agitando frecuentemente y se hirvió durante 1 minuto. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

AGAR MYCOBIOTIC (DIFCO)

Ingredientes por litro:

Bacto-Soytone	10.0 grs.
Bacto-Dextrosa	10.0 grs.
Bacto-Agar	15.0 grs.
Actidiona	0.5 grs.
Cloromycetin	0.05 grs.
pH final	6.5 ± 0.2

PROCEDIMIENTO:

Para rehidratar se suspendió 35.6 grs. en un litro de agua destilada fría. Se calentó hasta ebullición para disolver el medio. Se distribuyó en 100 ml. o cantidades más pequeñas. Se esterilizó en la autoclave por 10 minutos a 121°C.

AGAR DE DEXTROSA Y SABOURAUD (BIOXON)

Fórmula aproximada en grs. por litro de agua destilada:

Dextrosa	40.0
Mezcla de peptonas	10.0
Agar	15.0
pH final	5.6 [±] 0.2

PROCEDIMIENTO:

Se suspendió 65 grs. del polvo en un litro de agua destilada. Mezclándose bien hasta que se obtuvo una suspensión uniforme. Se calentó agitando frecuentemente y se hirvió durante un minuto. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

CALDO DE GLUCOSA-EXTRACTO DE LEVADURA - PEPTONA

Ingredientes por litro:

Glucosa	20.0 grs.
Proteosa-peptona	10.0 grs.
Extracto de levadura	5.0 grs.
El pH no es ajustado	

PROCEDIMIENTO:

Se disolvieron los ingredientes en agua destilada, calentando y agitándose frecuentemente durante 1 minuto.- Se esterilizó por 15 minutos a 121°C.

AGAR DE GLUCOSA - EXTRACTO DE LEVADURA - PEPTONA

Ingredientes por litro:

Glucosa	20.0 grs.
Proteosa-peptona	10.0 grs.
Extracto de levadura	5.0 grs.
Agar	20.0 grs.
El pH no es ajustado	

PROCEDIMIENTO:

Se disolvió los ingredientes en agua destilada, calentando y agitando frecuentemente hasta que hirvió un mi nuto. Se esterilizó por 15 minutos a 121°C.

AGAR WORT

Fórmula aproximada en grs. por litro de agua destilada:

Extracto de malta	15.0
Proteosa-peptona	0.78
Maltosa	12.75
Dextrosa anhidra	2.75
Glycerol	2.35
Fosfato dipotásico	1.00
Cloruro de Amonio	1.00
Agar	15.00
Ajustando el pH a 4.8 con HC	1 M

PROCEDIMIENTO:

Se disolvieron los ingredientes en agua destilada, agitándose y se hirvió un minuto. Ajustando el pH. Se esterilizó por 15 minutos a 121°C.

AGAR GORODKOWA (Modificado)

Ingredientes por 100 ml.:

Glucosa	0.1 grs.
Peptona	1.0 grs.
Cloruro de Sodio	0.5 grs.
Agar	2.0 grs.
El pH no es ajustado	

PROCEDIMIENTO:

Se disolvieron los ingredientes en agua destilada y se agitó, calentándose en flujo de vapor. Se esterilizó 15 minutos a 121°C.

AGAR DE JUGO DE VEGETALES V-8 (WICKERHAM)

Jugo V-8 (Jugo de vegetales enlatado, conteniendo: tomate, zanahoria, apio, perejil, beta--bel, lechuga, espinaca)	350 ml.
Levadura comprimida	5 grs.
Agar	14 grs.
Agua destilada	350 ml.

PROCEDIMIENTO:

Los 14 grs. de agar se disolvieron en 340 ml. de agua destilada, en otro recipiente se colocaron 350 ml. de jugo V-8 y 5 grs. de levadura comprimida disuelta en 10 ml. de agua destilada. La suspensión se agitó. El pH se ajustó a 6.8 (NaOH 1N). Se calentó la suspensión durante 10 minutos en flujo de vapor. El pH se ajustó de nuevo hasta que el medio enfriado tenga un pH de 6.8. El medio caliente se vació a la solución caliente de agar -- agitándose. Se esterilizó durante 15 minutos a 121°C.

AGAR BIGGY (BIOXON)

Fórmula aproximada en gramos por un litro de agua:

Citrato de Amonio y Bismuto	5.0
Sulfito de Sodio	3.0
Dextrosa	10.0
Glicina	10.0
Extracto de levadura	1.0
Agar	16.0
pH final	6.8 ± 0.2

PROCEDIMIENTO:

Se suspendieron 45 grs. del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se remojó de 10-15 minutos. Calentando y agitando frecuentemente dejándose hervir durante 1 minuto. Se dejó enfriar a 45°-50°C.

Se agitó circularmente y se vació en placas de Petri estériles, utilizando aproximadamente 20 ml. para cada placa. No se esteriliza en autoclave.

BASE PARA FERMENTACION DE SUSTANCIAS HIDROCARBONADAS.

MEDIO DE WICKERHAM:

Extracto de levadura	4.5 grs.
Peptona	7.5 grs.
Agua destilada	1000 ml.
Ajustando pH a 7.0	

PROCEDIMIENTO:

Se añadió azul de bromotimol disuelto previamente en etanol, hasta que se obtuvo un color verde intenso. Colocándose 4.0 ml. de este medio a tubos de 13x100 y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Añadiéndose una vez fría la base 1.0 ml. de los azúcares al 6% esterilizados por filtro millipore (membrana de 0.45 um de diámetro de poro).

BASE PARA ASIMILACION DE SUSTANCIAS HIDROCARBONADAS

BASE NITROGENADA:

Sulfato de Amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5 grs.
--	----------

Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$)	1.5 grs.
Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4)	1.8 grs.
Agua destilada	1000 ml.

PROCEDIMIENTO:

Se repartieron 4.5 ml. de la base nitrogenada a tu bos de ensayo con tapón de rosca de 16x150, se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Se prepararon soluciones al 5% de los azúcares que se pro baron, filtrándose por membrana millipore (0.45 um de diá metro de poro), se agregaron 0.5 ml. a los tubos con la base nitrogenada frfa.

SOLUCIONES Y REACTIVOS

BUFFER DE CITRATOS (0.1M)

Citrato de Sodio	29.4 grs./lt.
Acido Cítrico	21.0 grs./lt.

BUFFER DE ACETATOS (0.1M)

Acetato de Sodio	8.203 grs./lt.
Acido Acético	5.600 grs./lt.

BUFFER DE FOSFATO

A.- SOLUCION MADRE

Fosfato monopotásico	34.0 g.
Agua destilada	500 ml.

Disolver y ajustar el pH a 7.2 con NaOH 0.1N y completar a 1 litro con agua destilada.

B.- SOLUCION DILUYENTE

Se diluyó 1.25 ml. de la solución madre en un litro de agua destilada. Esterilizándose 20 min. a 121°C.

REACTIVO DE ACIDO 3-5 Dinitrosalicílico (DNS)

Hidróxido de sodio (NaOH)	1%
Acido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)	1%
Sulfito de Sodio (Na_2SO_3)	0.05%
Fenol	0.2%

Se mezclaron uno por uno en el orden indicado y se aforó a 100 ml. con agua destilada.

SOLUCION DE TARTRATO DE SODIO Y POTASIO

Tartrato de sodio y potasio 40%

Se coloca en 50 ml. de agua destilada y se disuelve perfectamente aforándose a 100 ml.

SOLUCIONES EMPLEADAS EN EL CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS:

- 1) Buffer de Borato de Sodio con una molaridad de 0.4 y un pH de 9.17 (24.77 grs./lt.)

Se preparó suficiente solución Buffer de 3.5 ó 10 litros de una sola vez. Antes de ser utilizado el Buffer, éste se pasó a través de un filtro de porosidad fina, o a través de una membrana de filtración de porosidad de 0.2 micras. Se cuidó que la solución filtrada no contuviera ninguna partícula de polvo o de material fibroso.

- 2) Solución Colorante (Reactivo de Mopper-Gindler)
Se encuentra formado por dos soluciones:

Solución (A).- Se tomó 1.3 grs./lt. del ácido - 2,2 - biciconinato y se le añadió 62 grs. de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3). Disolviéndose por calentamiento y agitación, y una vez - frío se aforó a un litro.

Solución (B).- Consta de Acido Asparagífico - ($\text{C}_4\text{H}_7\text{Na}_4$) (2.5 grs./100 ml.), Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) (3.33 grs./100 ml.) y Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (1.33 grs./100 ml.). Se mezclaron las soluciones antes mencionadas bajo agitación y calentamiento; una vez que se enfrió, se aforó a 100 ml.

Un día antes de usarse se mezclan las soluciones -

A y B en una relación de 23 volúmenes de A por 1 de B.
Antes de usarse la solución colorante se filtró igual
como se mencionó anteriormente para el Buffer de -
Borato de Sodio.

COLORACION DE GRAM

CRISTAL VIOLETA

Cristal violeta	1.0 grs.
Agua destilada	100 ml.

IODO

Yoduro de potasio (KI)	2.0 grs.
Yodo (I)	1.0 grs.
Agua destilada	200 ml.

ALCOHOL-ACETONA

Acetona	50.0 ml.
Alcohol etílico 95%	50.0 ml.

SAFRANINA

Safranina	0.05 grs.
Agua destilada	100 ml.

SOLUCION SALINA

Cloruro de sodio NaCl	9.0 grs.
Agua destilada	1000 ml.

EXPERIMENTACION

EXTRACCION DEL JUGO DE Agave tequilana.

La extracción se basó en la técnica utilizada por Sánchez Marroquín modificada (22).

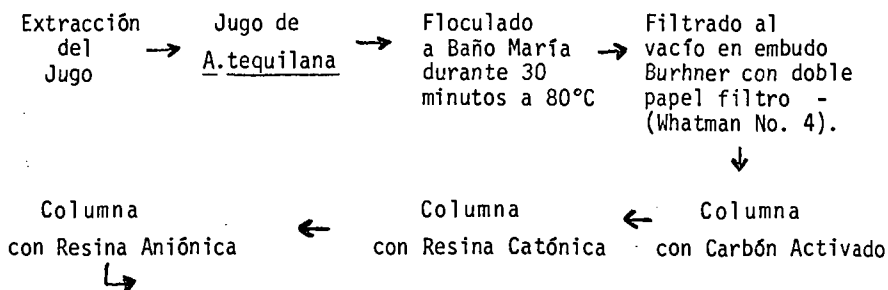
El tallo de A. tequilana se cortó en trozos pequeños mediante una hacha y luego se pasó a través de un molino con cuchillas, con el objeto de hacer que la materia prima se fragmentara en pedazos mucho más pequeños y éstos eran colocados en un refinador para hacer más fina la fibra agregándose agua (10% en peso) caliente para facilitar la extracción de azúcares.

Luego se centrifugaba, para separar el bagazo y extraer el jugo diluido.

Al bagazo se agregó agua caliente (5% en peso) para una segunda extracción de azúcares, se centrifugó por segunda vez, se recolectó en un recipiente el jugo diluido (pH -- 4.8), se almacenó en el congelador (-10°C).

AISLAMIENTO DE LA FRUCTANA

Esta se llevó a cabo siguiendo la metodología de - Satyanarayana (23) modificado.



Precipitado con Etanol al 95% ajustando la concentración al 75% → Centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos → Sobrenadante precipitado con Etanol al 95%, se ajustó la concentración al 50% →

Centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos → Sedimento= Fructana (Gel blanquecino - muy viscoso e insaboro)

Como el jugo contiene gran cantidad de impurezas - como gomas, pectinas, saponinas, etc., es preciso eliminarlas mediante el floculado, filtrado, paso de columna - de carbón activado, así como por columnas de resina catiónica y aniónica (22,23). Realizando dos precipitaciones alcohólicas, para una mejor extracción y lavado de la fructana a partir del jugo de A. tequilana.

Obteniéndose la fructana en forma de gel de un color blanco transparente, de una gran viscosidad e insípida.

Se almacenó en el refrigerador.

HIDROLISIS ACIDA

Se realizó para poder conocer la concentración de azúcares reductores de los substratos (fuera jugo de A. tequilana o fructana) se basó en la técnica desarrollada por Sánchez Marroquín (22).

Se llevó a cabo colocando en un matraz aforado de 10 ml. 1 ml de H_2SO_4 .36N se aforó con la muestra hasta -

10 ml. Agitando hasta homogenizar la mezcla.

Se incubó en baño de agua durante 1 hora a 80°C.

Después de este lapso se dejó enfriar y se filtró_ con papel filtro (Whatman No. 2) y se analizó en el Cromatógrafo de líquidos.

AISLAMIENTO DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE FRUCTANASAS

Se utilizaron como fuentes de obtención de levaduras, las siguientes frutas: melón, mandarina, manzana y - pulque.

Para el aislamiento de las levaduras con capacidad de degradar fructana se utilizó la técnica de cultivo enri quecido cuya fuente de carbono fue exclusivamente fructana extraída de jugo de A. tequilana.

El medio de cultivo empleado fue el desarrollado - por Thonart y Artois (25):

Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	1%
Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	1%
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.05%
Extracto de levadura	0.5 %

A este medio se adicionó:

Fructana 2% concentración: 1.1012 mg/ml
Tetraciclina 500 mg.

PROCEDIMIENTO:

Las sales minerales y el extracto de levadura se disolvían en agua destilada por medio de agitación. El medio era ajustado a un pH 5 con HCl 1N tomando la lectura con un potenciómetro. Una vez ajustado el pH a 5, se vació 45 ml. del medio de sales minerales y extracto de levadura por cada matraz Erlenmeyer bafleado de 500 ml con tapón de algodón y gasa. Se esterilizó durante 15 minutos a 121°C.

Una vez frío el medio, la fructana se agregó filtrándose por una membrana millipore estéril (0.45 μ m); la fructana había sido previamente disuelta en agua destilada, agitándose hasta obtener una mezcla homogénea. Quedando un volumen en cada matraz Erlenmeyer (500 ml.) de 50 ml.

Los 500 mg. de tetraciclina se disolvieron en 10 ml. de agua destilada estéril, agitándose mediante un vortex durante 30 segundos.

Se adicionó 1 ml. de la solución del antibiótico (50 mg.) con una pipeta limpia y estéril a cada matraz con el medio de cultivo.

Se inoculó con pedazos de fruta madura tal como se había adquirido (por tal motivo se agregó antibiótico para eliminar las bacterias), en el caso del pulque se tomó dos asadas con una asa de nicromo previamente flameada y enfriada.

Se colocó la muestra (frutas y pulque) en su respectivo matraz, se agitó manualmente durante 15 segundos. Se etiquetó adecuadamente (fecha, tipo de muestra, medio de cultivo).

Se incubó a 30°C en un agitador orbital durante 72 hrs. Anotando si hubo crecimiento y el tiempo en que tardó en presentarse.

METODO DE AISLAMIENTO. TECNICA: ESTRIA CRUZADA.

Una vez obtenido el crecimiento de levaduras, las cuales estaban contaminadas por bacterias, se procedió a

sembrarlos por estría cruzada en Agar de Papa Dextrosa -- con antibióticos.

Se preparó el medio base como se indica para el Agar de Papa Dextrosa, después (ya estéril el medio), se adicionó 2 ml. de la solución de antibióticos con una pipeta limpia y estéril por cada 100 ml. del medio base; se mezcló vigorosamente para conseguir una distribución homogénea.

La solución de antibióticos se preparó pesando 200 mg. de tetraciclina y 200 mg. de clorafenicol con 20 ml. de diluyente de fosfato estéril. Se agitó esta mezcla antes de ser adicionada al medio base.

Se vació 20 ml. de Agar Papa Dextrosa con antibióticos a cada caja Petri limpia, estéril y seca; se dejó en reposo hasta que solidificó el medio de cultivo.

Una vez solidificado se marcó las cajas de Petri -- (tipo de medio, clase de muestra, fecha).

Ya etiquetadas las cajas de Petri, se tomó una asa da de cultivo de un matraz con crecimiento y se descargó en la orilla de la caja haciendo una estría contfnea de dicha orilla al centro de la caja. Se flameó el asa y sin volver a tomar cultivo se efectuó otra estría contfnea procurando que la porción inicial de ésta toque la porción final de cada estría.

Se repitió lo anterior hasta casi llenar la caja de estrías, cuando quedaba una pequeña porción de la superficie de la caja se hizo una última estría abierta.

Por cada muestra se sembraron dos cajas con el medio.

Se incubó a temperatura ambiente y a 35°C durante 48 hrs.; se observaron las características macroscópicas y se hizo una preparación en fresco.

SELECCION DE LA CEPA.

Se seleccionó de acuerdo a la actividad enzimática presentada.

Para la selección de la cepa se utilizó fructana (2%) aislada de A. tequilana de una concentración de 1.1012 mg. de fructosa/ml. como única fuente de carbono ; el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los cultivos fue el utilizado por Thonart y Artois (25) mencionado anteriormente.

Las sales minerales y extracto de levadura se ajustaron a un pH 5 con HCl 1N. Una vez disuelto y ajustado el pH a 5 se colocó 100 ml. del medio de cultivo a frascos Erlenmeyer bafleados de 500 ml. con tapón de algodón y gasa. Se esterilizó a 121°C durante 30 minutos.

Se enfrió el medio, se agregó la fructana disuelta en agua destilada, se pasó a través de una membrana millipore estéril (0.45 μ m) en condiciones asépticas a los frascos con el medio de sales minerales y extracto de levadura.

Se eligieron para determinar actividad enzimática las levaduras aisladas de melón y pulque, las cuales habían presentado un mejor desarrollo utilizando fructana -

como única fuente de carbono.

Se tomó una colonia aislada (de las levaduras a -- probar) en medio de Agar de Papa Dextrosa con antibióti--cos con una asa de nicromo previamente flameada y enfria--da, y se inoculó un matraz con el medio de cultivo, eti--quetándose la fecha, tipo de levadura.

Se incubaron a 30°C en un agitador orbital durante 48 hrs.

Una vez desarrollado el cultivo se centrifugó para determinar actividad enzimática de las células intactas,-- así como también del sobrenadante o medio de cultivo; se probó por el método de Dinitrosalicílico (18) el cual se describe a continuación.

Se determinó la actividad enzimática cualitativa--mente.

ACTIVIDAD ENZIMATICA

La actividad de la fructanasa se determinó por el método de DNS el cual es una reacción de óxido-reducción_ cualitativa y cuantitativa de azúcares reductores.

Se utilizó como substrato fructana aislada de jugo de A. tequilana. Se pesó 1.0 gr. de fructana en gel y se disolvió en agua destilada, se llevó a 50 ml. en un ma--traz aforado. Se guardó muestra de la solución de fructa_ na para posteriormente analizarla en el cromatógrafo de _líquidos y saber la concentración de azúcares reductores_ (realizando una hidrólisis ácida de la solución de fructa_ na).

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo colocando en un tubo de ensayo de 16x150: 0.5 ml. de la suspensión de levaduras o fructanasa, 1 ml. de solución buffer de citratos 0.1M (pH 4.8) y 1 ml. de la solución de fructana. Los tubos se taparon con papel aluminio.

La preparación anterior se mezcló perfectamente y se incubó en baño de agua a 50°C durante 1 hora, después de lo cual se añadieron 3 ml. de reactivo de ácido 3-5 dinitrosalicílico; el tubo se llevó a un baño de agua en ebullición durante 5 minutos para desarrollar el color de la reacción entre DNS y los azúcares reductores producidos. La reacción era parada por la adición de 0.5 ml. de solución de Tartrato de sodio y potasio.

Se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 3000 rpm y se tomó lectura del sobrenadante; se leyó absorbencia a 550 nm en un espectrofotómetro ajustando a cero con un blanco procesado en forma idéntica sólo que antes se desnaturalizó la suspensión de levaduras o fructanasas, hirviéndola a ebullición durante 10 minutos.

Se cuantificó los miligramos de azúcares reductores producidos, utilizando una gráfica de calibración previamente construída.

CURVA DE CALIBRACION DE DNS

Se realizó una curva estándar con fructosa, cuya concentración fue 1.0 mg/ml.

La curva se elaboró de la siguiente manera:

No.	Solución de Fructosa (mg/ml)	Solución Buffer de Citratos (pH 4.8) 0.1M	DNS
0 (Bco)	0.0	1.0 ml.	3.0 ml.
1	0.2	0.8 ml.	3.0 ml.
2	0.4	0.6 ml.	3.0 ml.
3	0.6	0.4 ml.	3.0 ml.
4	0.8	0.2 ml.	3.0 ml.
5	1.0	0.0 ml.	3.0 ml.

Las muestras se pasaron por baño de agua a punto - de ebullición durante 5 minutos.

La lectura se tomó por espectro a 550 nm. y se grficó Densidad Optica vs. concentración de fructosa.

CONSERVACION DE LA CEPA

Para conservar las características de las colonias se sembró en Agar de Papa y Dextrosa en tubos de ensayo - de 16x150 con tapón de algodón y gasa.

Se preparó el medio de cultivo en un matraz Erlermeyer, y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Se vació 7 ml. del medio de Agar de Papa y Dextrosa ya estéril a cada uno de los tubos de ensayo limpios, estériles y secos colocándose sobre una superficie inclinada - hasta que solidificaron.

Una vez solidificado el medio se tomó con una asa de nicromo previamente flameada y fría una de las colo- - nias características y se prosiguió a sembrar por es- - - trías; tapándose bien.

Se incubó a 35°C durante 48 hrs., después de este lapso - se guardaron en el refrigerador (se usó un tubo para una sola colonia): se selló con parafilm los tapones de algodón y gasa.

CARACTERIZACION DE LA CEPA AISLADA DEL PULQUE

En la determinación e identificación de la cepa, - se tuvo que purificar para poder llevar a cabo la identificación de la cepa a nivel género y especie. Se realizó la caracterización de la levadura aislada del pulque (ya que ésta se utilizó como fuente de obtención de la fructa nasa)

AISLAMIENTO DE COLONIAS POR ESTRIA CRUZADA

A partir de un tubo con medio de Agar de Papa y -- Dextrosa inclinado se tomó cultivo de la levadura aislada del pulque con una asa de nicromo previamente flameada y enfriada en el medio de cultivo; se descargó en la orilla de una caja Petri con Agar de Papa y Dextrosa haciendo - una estria continua de dicha orilla al centro de la caja Petri.

Se flameó el asa y sin volver a tomar del cultivo se efectuó otra estria procurando que la porción inicial de ésta tocara la porción final de cada estria.

Lo anterior se repitió hasta casi llenar la caja Petri de estrías, cuando quedaba una pequeña porción de la superficie de la caja Petri se iniciaba una última estria abierta.

Se incubó el material sembrado a 35°C durante 48 hrs. Se anotó características macroscópicas y microscópicas. Se realizó preparación en fresco y tinción de Gram.

PREPARACION EN FRESCO Y FROTE A PARTIR DE CULTIVOS EN MEDIO SOLIDO

Se marcó un extremo de un portaobjetos con lápiz - graso. Ya hecho esto con una asa de nicromo (previamente flameada), se colocó una gota pequeña de solución salina al 0.9% en el centro del portaobjetos.

Se volvió a flamear el asa, se tocó una de las colonias por observar. Se llevó el asa al portaobjetos y se juntó con la solución salina hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. Se colocó sobre la preparación un cubreobjeto, evitando formar burbujas de aire.

Se observó al microscopio a seco débil y seco fuerte. Para aplicar la tinción de Gram, la mezcla homogénea de solución salina y levaduras se dejó secar al aire y se fijó calentando la parte posterior del portaobjetos en la flama del mechero.

PREPARACION EN FRESCO Y FROTE A PARTIR DE CULTIVOS EN MEDIO LIQUIDO

Con un lápiz graso se marcó los portaobjetos a utilizar. Con el asa de nicromo estéril, se tomó una gota de cultivo y se colocó en el centro del portaobjetos (se extendió un poco para formar una película delgada y uniforme), se colocó sobre la preparación un cubreobjetos, -

evitando formar burbujas de aire.

Se observó al microscopio a seco débil y seco fuerte.

Para aplicar la tinción de Gram la muestra se dejó secar al aire y se fijó calentando la parte posterior del portaobjetos en la flama del mechero.

TINCION DE GRAM

Una vez realizados los frotis, se procedió a efectuar los siguientes pasos:

- 1.- Cubrir el portaobjetos con cristal violeta por 1 min.
- 2.- Lavar con agua corriente.
- 3.- Cubrir la preparación con lugol (yoduro de K) por 1 minuto.
- 4.- Lavar con agua corriente.
- 5.- Decolorar con solución alcohol-acetona.
- 6.- Lavar con agua corriente.
- 7.- Contrastar con safranina por 30 segundos.
- 8.- Lavar con agua corriente y dejar secar.
- 9.- Agregar 1 gota de aceite de inmersión.
- 10.- Examinar al microscopio con objetivo de inmersión.

PURIFICACION DE LA LEVADURA (6).

Debido a que la levadura estaba contaminada por una bacteria fue necesario su purificación.

Realizando el siguiente procedimiento:

En 5 tubos de ensayo de 16x150 se vació 5 ml. de caldo Sabouraud Dextrosa sin esterilizar previamente preparado en un matraz Erlenmeyer; se colocó los tubos en una gradilla con su respectivo tapón de algodón y gasa, se esterilizaron por 15 minutos a 121°C.

Una vez enfriado el medio se agregó con una pipeta estéril HCl IN en la siguiente proporción: 1 gota al primer tubo, 2 gotas al segundo y así sucesivamente hasta llegar a 5 gotas en el quinto tubo. Cada uno de ellos etiquetados.

Se inocularó los 5 tubos a partir de una colonia de levadura aislada por estría cruzada, la cual se tomó con una asa de nicromo flameada y enfriada y se resuspendió en un tubo de ensayo con 2 ml. de solución salina estéril; se colocó a cada tubo 2 asadas de la suspensión.

Se incubó a 35°C por 48 hrs. Se anotaron las características de crecimiento. Se observó al microscopio en fresco y se hizo tinción de Gram del cultivo.

Del último de la serie se presentó crecimiento, se tomó inóculo con una asa de nicromo flameada y enfriada, se sembró por estría cruzada en cajas Petri, con medio de Agar Mycobiotic previamente preparado en un matraz Erlenmeyer, con su tapón de algodón y gasa, se esterilizó por 10 minutos a 121°C; se vació a las cajas Petri el Agar Mycobiotic fundido de 15 a 20 ml. a cada placa dejando solidificar en una superficie plana.

Se incubó a 35°C y a temperatura ambiente durante 48 hrs. Se hizo preparación en fresco y tinción de Gram

del cultivo desarrollado, se observó en seco fuerte y de inmersión respectivamente.

El cultivo de dos días se resembró en cajas Petri con medio de Agar Mycobiótico por estría cruzada tocando con una asa de nicromo flameada y enfriada, el centro de una colonia aislada.

Se incubó a 35°C durante 48 hrs. Después de este lapso de tiempo se hizo preparación en fresco y frote de Gram.

De una colonia del cultivo anterior se inoculó tubos de ensayo de 16x150 conteniendo 5 ml. de Penicilina - g Sal Sódica diluída en agua destilada estéril, probando las siguientes concentraciones: 25,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1'000,000 de unidades; el inóculo se tomó con una asa de nicromo flameada y enfriada, cogiendo sólo una colonia y se resuspendió en un tubo de ensayo con solución salina al 0.9% estéril agitando para homogenizar la suspensión; se colocó tres asadas de ésta a cada uno de los tubos con el antibiótico, se agitó manualmente durante 15 segundos y se incubó a 35°C durante 48 hrs.

Se observó a los dos días en fresco y con tinción de Gram.

CONSERVACION DE LA LEVADURA AISLADA DEL PULQUE PURIFICADA

Para conservar ya la colonia libre de bacterias, se sembró en medio de Agar Sabouraud Dextrosa en cajas Petri y tubos de ensayo.

En el caso de los tubos de ensayo se realizó una -

preparación del medio de Agar Sabouraud Dextrosa en un matraz Erlenmeyer y sin esterilizar se colocó 7 ml a un tubo limpio y seco, el cual se tapó y se pasó a la autoclave a esterilizar por 15 minutos a 121°C.

Ya estéril y aún calientes los tubos de ensayo con el medio se colocó sobre una superficie inclinada hasta que solidificó.

En el caso de las cajas de Petri, se preparó el medio de Agar Dextrosa y Sabouraud en un matraz Erlenmeyer, el cual se tapó con algodón y gasa, y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Aún caliente se pasó de 15 a 20 ml. de medio líquido en cada caja Petri (limpia, seca y estéril); se dejó solidificar sobre una superficie plana.

Una vez preparados estos medios se tomó un asa de nicromo previamente flameada y fría una de las colonias aisladas y se prosiguió a sembrar por estrías, se incubó a 35°C durante 48 hrs; desarrollado el cultivo se guardó en el refrigerador.

IDENTIFICACION DE LA CEPA

Una vez pura la cepa de levadura se siguió la siguiente metodología para la clasificación de la cepa a nivel género y especie, según Lodder (15).

1.- Examen del tipo de morfología celular, reproducción vegetativa, formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero.

2.- Determinación de la presencia o ausencia de -
formación de ascosporas usando medios de esporulación.

3.- Pruebas de Fermentación (Zimograma) de gluco-
sa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y raffinosa.

4.- Pruebas de Asimilación (Auxanograma) de gluco-
sa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y raffinosa.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

a) OBSERVACION DE LAS CARACTERISTICAS DE LA CELULA
VEGETATIVA Y SU REPRODUCCION.

Para determinar la forma de la célula así como el
método de reproducción de la cepa se observó en medio lí-
quido y sólido desarrollado por Lodder. (15).

MEDIO LIQUIDO

A un frasco Erlenmeyer con capacidad aproximada de
500 ml. se le agregó 100 ml. de caldo de Glucosa-Extracto
de Levadura-Peptona previamente preparado, se cerró per-
fectamente con tapón de algodón y gasa, se etiquetó y se
esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Una vez esterilizado, se dejó enfriar completamen-
te y con una asa de nicromo previamente flameada y fría -
se tomó una colonia joven (3 días) a partir de un cultivo
en caja Petri con medio Agar Sabraud Dextrosa, inoculan-
do así el medio líquido. Se agitó manualmente durante 15
segundos y se etiquetó adecuadamente.

Se incubó a 28°C durante 72 hrs. en un agitador -- orbital. Al cabo de este tiempo se observó micro y macroscópicamente.

MEDIO SOLIDO

Se preparó medio de Agar de Extracto de Levadura - Glucosa - Peptona en un matraz Erlenmeyer el cual se tapó con algodón y gasa, y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Aún caliente se pasó de 15-20 ml. de medio líquido en cada caja Petri (limpia, seca y estéril), se dejó solidificar sobre una superficie plana.

Una vez solidificado y enfriado el medio se tomó una asada de las levaduras desarrolladas 72 hrs. en el medio líquido Caldo de Glucosa - Extracto de Levadura - Peptona con una asa de nicromo flameado y fría, sembrando por estría cruzada.

Se incubó a 28°C durante 72 hrs.

Se observó micro y macroscópicamente.

b) DETERMINACION DE LA FORMACION DE PSEUDOMICELIO O MICELIO VERDADERO.

Para el estudio de la formación de pseudomicelio y/o micelio se utilizó el Agar Wort (medio recomendado por el Manual Difco).

PROCEDIMIENTO:

En una caja Petri, estéril, se vació 25 ml. de medio Agar Wort, se dejó solidificar y secar durante 1 día

a temperatura ambiente.

Se sembró por estría cruzada con inóculo de un cultivo en tubo con medio inclinado de Agar de Dextrosa y Sabouraud

La caja Petri se selló con cinta autoadherente dejándose a temperatura ambiente durante 1 mes.

Después de este lapso se tomó las características morfológicas observando micro y macroscópicamente.

CARACTERISTICAS SEXUALES

a) DETERMINACION DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE FORMACION DE ASCOSPORAS USANDO MEDIOS DE ESPORULACION.

Entre los medios especiales para la esporulación que favorecen la actividad merótica se incluyen: Agar -- Gorodkowa y Agar de Jugo de Vegetales V-8 siendo desarrollados por Lodder (15). Por lo cual se utilizó los anteriores medios para la determinación de la presencia o ausencia de ascosporas.

AGAR GORODKOWA (Modificado)

Se preparó el medio Agar Gorodkowa sin ajustar el pH y se repartió 7 ml. en tubos de ensayo de 16 x 150 con tapón de algodón y gasa y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, ya estériles y aún calientes los tubos con el medio de cultivo se colocaron sobre una superficie inclinada hasta que solidificaron.

Ya solidificado el medio se sembró por estría; ino

culando con colonias aisladas de cultivos de 3 días (proveniente de una caja de Petri con Agar de Dextrosa y Sabouraud).

Se incubó a temperatura ambiente durante 10 días ; después de este lapso de tiempo se hicieron preparaciones en fresco. Se observó al microscopio con seco fuerte.

AGAR DE JUGO DE VEGETALES V-8

Se preparó el medio de Agar V-8 ajustando el pH a 6.8 con NaOH 1N y se vació 7 ml. del medio a tubos de ensayo de 16x150 con tapón de algodón y gasa, se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Se siguió el mismo procedimiento que en Agar Gorodkova.

b) PRUEBA DE FILAMENTACION

Obtenidas ya ciertas características morfológicas de las pruebas anteriores, se dedujo que la cepa perteneciera posiblemente al género Candida; por lo tanto se hizo la prueba de tubo germinativo en suero, ya que realizando este ensayo y según el resultado, daba la pauta para hacer o no la determinación de producción de clamidosporas.

PROCEDIMIENTO:

En un tubo de ensayo con tapón de rosca de 13 x 100 se colocó 0.5 ml. de suero, se inoculó con una pequeña cantidad de levaduras, tomadas con una asa de nicromo flameada y fría de un cultivo con medio de Agar de Dextrosa y Sabouraud.

Se incubó a 37°C en condiciones estacionarias durante 24 hrs.

Montándose entre porta y cubreobjetos unas gotas de la suspensión. Se observó al microscopio con seco débil y seco fuerte.

c) PRUEBA PRESUNTIVA DE CANDIDA POR MEDIO DE LA REACCION SULFURO

Ya que el Agar Biggy es útil para aislar algunas especies del género Candida y para la diferenciación de éstas se utilizó como una prueba más.

PROCEDIMIENTO:

Se preparó el medio (el cual no se esteriliza en autoclave) en un frasco Erlenmeyer, dejándose enfriar a 45°C, agitando circularmente se vació en cajas Petri estériles, se utilizó 20 ml. para cada caja.

Una vez solidificado se sembró por estría cruzada con una asa de nicromo flameada y fría, se inoculó a partir de una colonia aislada de la cepa cultivada en medio de Agar de Sabouraud y Dextrosa.

Se incubó a temperatura ambiente por 72 hrs., se observó morfología colonial característica.

CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS

PREPARACION DEL INOCULO

De la cepa problema se tomó una colonia joven de -

un cultivo con medio de Agar de Dextrosa y Sabouroud con una asa de nicromo flameada y fría, se suspendió en un tubo de ensayo de 13x100 teniendo 2 ml. de solución salina estéril al 0.9%, haciendo con ésta la siembra en medios para fermentación y asimilación de carbohidratos.

ZIMOGRAMA (Prueba de Fermentación)

Los carbohidratos empleados en la prueba de fermentación incluyeron: Glucosa, Galactosa, Sacarosa, Maltosa, Lactosa y Raffinosa, siendo éstos de grado cromatográfico.

Se llevó a cabo la prueba de cada carbohidrato con la cepa problema por duplicado, se utilizó dos tipos de testigos:

- a) Un testigo negativo.- Conteniendo la base de fermentación de Wickerham pero sin el carbohidrato se colocó en su lugar 1 ml. de agua destilada, más la cepa problema.
- b) Un testigo positivo.- Con una cepa ya conocida en este caso se utilizó Candida albicans.

PROCEDIMIENTO:

En tubos de ensayo con tapón de rosca de 13x100 se colocó 40 ml. del medio base de Wickerham; cada tubo con su respectiva campana de Durham (indicador en la producción de gas), se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Enfriado el medio de cultivo se colocó de manera aséptica 1 ml. de la solución de carbohidrato a probar al 6%, excepto en el caso de la raffinosa se preparó una so-

lución al 12%, esterilizados por filtración a través de -
membranas millipore estériles.

Se etiquetaron los tubos (fecha, carbohidratos, ce-
pa).

Se inculó cada uno de los tubos con dos asadas de
la suspensión.

Se incubó a temperatura ambiente durante 72 hrs. -
en condiciones estacionarias.

Se hicieron lecturas de producción de ácido y gas.

Para determinar la fermentación de los azúcares se
consideró la presencia de gas habiendo formación de burbu-
jas de gas y la acidez por el cambio del color indicador
(de verde intenso a amarillo dorado).

AUXANOGRAMA (Prueba de Asimilación)

Los carbohidratos empleados en la prueba de asimi-
lación incluyeron: Glucosa, Galactosa, Sacarosa, Maltosa,
Lactosa y Raffinosa, siendo éstos de grado cromotográfico.

La asimilación se llevó a cabo por duplicado por -
cada uno de los carbohidratos.

Se utilizó un testigo negativo ^{con}conteniendo la base
nitrogenada pero sin el carbohidrato, colocando en su lu-
gar 0.5 ml. de agua destilada, más la cepa problema.

PROCEDIMIENTO:

En tubos de ensayo con tapón de rosca de 16x150 se

se repartió 4.5 ml. de la base nitrogenada y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Se preparó soluciones al 5% de los carbohidratos - que se probaron excepto en el caso de la raffinosa, se -- preparó una solución al 10%, enfriado el medio base, se - colocó de manera aséptica 0.5 ml. esterilizados por fil-- tración a través de membranas millipore estériles.

Se etiquetaron los tubos (fecha, tipo de cepa, me-- dio).

Se inculó cada uno de los tubos con dos asadas de la suspensión.

Se incubó a temperatura ambiente, en condiciones - estacionarias.

Se observó el crecimiento por 15 días.

El grado en que los compuestos de carbono fueron - utilizados se determinó por la técnica de Lodder (15), - los tubos de ensayo problema fueron agitados vigorosamente para dispersar el crecimiento de levaduras, se coloca-- ron los tubos contra una tarjeta blanca conteniendo lí-- neas de aproximadamente 3/4 mm. de ancho, dibujadas con - tinta india negra. Si las levaduras del tubo de ensayo - obstruían completamente las líneas, se registró como - -- (3+); si las líneas aparecían como bandas difusas se re-- registró como (2+); si las bandas se distinguían como tales pero teniendo bordes borrosos se registró como (1+). Mien-- tras que la ausencia de crecimiento (-). Una reacción -- (3+) ó (2+) dentro de 4 semanas se consideró como positi-- va y una reacción (1+) se consideró muy débil o negativa.

MEDIO DE CRECIMIENTO DE Candida pseudotropicalis -
PARA LA PRODUCCION DE FRUCTANASAS

MEDIO DE DESARROLLO:

Fuente de carbono: Jugo de A. tequilana 30% (con
centración de 150 mg/ml. de -
carbohidratos totales).

Sales minerales: Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%
Fosfato de potasio K_2HPO_4 1%
Sulfato de magnesio MgSO_4 0.05%

Fuente de nitrógeno: Extracto de levadura 0.10%
Proteosa peptona 0.10%

PROCEDIMIENTO:

Los cultivos fueron ejecutados en Batch en un fermentador de 600 ml. aproximadamente.

Las sales minerales, extracto de levadura, proteosa-peptona, se disolvieron en agua destilada por agitación, se agregó después el jugo de A. tequilana y 1 ml. de antiespumante (solución a base de silicón), se agitó hasta quedar una mezcla homogénea, el pH se ajustó a 5 con HCl 1N, tomando la lectura con un potenciómetro.

Se vació 500 ml. del medio de cultivo al fermentador, se cerró perfectamente y se esterilizó durante 15 minutos a 121°C, se dejó enfriar el medio (35°C).

Se inoculó con dos tubos conteniendo el cultivo en medio inclinado de Agar de Papa y Dextrosa, a los que se les agregó 5 ml. de agua estéril a cada uno y se despen

dió suavemente las colonias con una asa flameada y enfriada.

CONDICIONES DE OPERACION:

pH.- Este se mantuvo entre los rangos de 4.0 a 5.0. Se llevó a cabo esto mediante un controlador de pH automático; su electrodo calibrado, limpiado y enjuagado con agua destilada estéril, se introdujo de manera aséptica al fermentador con el medio de cultivo ya inoculado. Con lo cual daba la lectura de la concentración de iones hidrógeno del cultivo; como los productos finales de la degradación de los carbohidratos con frecuencia ácidos orgánicos, bajan el pH marcadamente y para evitar las rápidas e inhibitorias fluctuaciones del pH, se usó para ajustar el pH Hidróxido de amonio (NH_4OH) al 20% estéril, con éste se mantuvo los valores óptimos de pH indicados anteriormente.

El NH_4OH se colocó en una pera de 500 ml. conectada por una serie de mangueras (limpias y estériles) a una bomba a la vez que ésta dependía del controlador de pH y a una manguera (estéril) con una aguja flameada introducida dentro del fermentador asépticamente, cuando el cultivo llegaba a un pH de 4.0 automáticamente era bombeado el NH_4OH al cultivo hasta elevar el pH a 5.0. Esto se repitió cada vez que el pH bajaba a 4.0.

Temperatura: Se controló a 35°C con un aparato electrotérmico enlazado al fermentador.

Agitación y Aireación.- La agitación se realizó con un aparato electromagnético el cual hacía girar una aspa metálica colocada dentro

del fermentador, agitándose de 200 - - rpm, aumentando conforme iba desarro-- llándose el cultivo.

La aireación se mantuvo constante, y - se aumentó al ir creciendo la masa ce- lular; el flujo de aire se filtró a - través de una membrana (estéril) y con- ducido por medio de una manguera (seca y estéril) conectada al fermentador.

Tiempo.- La fermentación se dejó de 20 a 22 hrs.

CINETICA DE LA FERMENTACION EN BATCH DE JUGO DE -
A. tequilana CON Candida pseudotropicalis.

MEDIO DE FERMENTACION:

Sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$	1%
Fosfato de potasio K_2HPO_4	1%
Sulfato de magnesio $MgSO_4$	0.05%
Extracto de levadura	0.10%
Proteosa peptona	0.10%

Antiespumante 1 ml. Jugo de Agave tequilana... 120 ml.

Salas minerales + Agua ... 280 ml.

CONDICIONES DE OPERACION: Inóculo 200 ml.

35°C

Volumen Total 600 ml.

pH 4.5 a 5.0

Tiempo 24 hrs.

PROCEDIMIENTO:

La preparación del medio y las condiciones de operación fueron iguales a las descritas anteriormente. La única variante fue que se preparó un preinóculo de 200 ml. en matraces Erlenmeyer de 500 ml. bafleados conteniendo cada uno 100 ml. de medio, se preparó igual que para la propagación. Se inoculó con colonias cultivadas en medio inclinado de Agar de Papa y Dextrosa.

Se incubó a 35°C durante 18 horas en un agitador orbital.

Se inoculó después de este lapso de tiempo la fermentación. Se determinó la cinética microbiana.

CINETICA MICROBIANA

Para determinar la cinética microbiana se hizo varios muestreos a diferentes tiempos desde el inicio hasta el final de la fermentación tomando 10 ml. aproximadamente del cultivo.

CURVA DE LA MASA MICROBIANA

De cada una de las muestras tomadas se filtró al vacío 5 ml. del cultivo a través de una membrana millipore de 0.45 μm , la cual previamente fue secada en una estufa a 80°C durante 15 minutos y tarada en una balanza analítica; el filtrado se recolectó y se guardó en el congelador, para posteriormente determinar los azúcares reductores.

La membrana millipore junto con las levaduras se enjuagó con 10 ml. de agua destilada para eliminar impurezas, a continuación se colocó en la estufa a 100°C durante 2 horas, ya seca se depositó en una campana de desecación, hasta que se enfrió y después se taró en la balanza analítica.

Se determinó la biomasa por diferencia de peso en seco.

Se realizó la curva del crecimiento microbiano en relación de Biomasa (mg/ml) vs. tiempo de la fermentación (hrs.).

CURVA DEL SUBSTRATO CONSUMIDO

Del filtrado de cada una de las muestras obtenidas, se determinó la concentración de azúcares reductores

por cromatografía líquida.

Se determinó la concentración inicial de azúcares reductores en la fermentación así como también de las muestras tomadas durante el desarrollo de la levadura. Se realizó hidrólisis ácida para conocer la concentración real de azúcares reductores. La hidrólisis ácida se llevó a cabo como anteriormente se explica.

Se elaboró la curva de concentración de azúcares reductores (mg/ml) vs. tiempo de la fermentación (hrs) y otra con concentración real de azúcares reductores (mg/ml) hidrólisis ácida vs. tiempo de fermentación.

ACTIVIDAD ESPECIFICA

La actividad específica se determinó mediante la actividad enzimática presentada por la biomasa recolectada en el muestreo durante el transcurso de la fermentación.

Las muestras se centrifugaron (3500 rpm durante 10 minutos) para concentrar las levaduras. Se lavó 1 vez con agua desionizada y otra vez con Buffer de Acetatos (0.1M) pH 5. Cada muestra de levaduras perteneciente a la fermentación, se lavó y se precipitó por separado, se suspendió en 2.5 ml. de agua desionizada (las levaduras) en 22.5 ml. de Etanol al 95% durante 30 minutos.

Después de esto se centrifugó, se eliminó el sobrenadante, las levaduras se lavaron 2 veces con Buffer de Acetatos (0.1M) pH 5.

Se resuspendió la levadura en 5 ml. de agua desti-

lada.

Se determinó la actividad enzimática (ya descrita anteriormente) con 1 ml. de la suspensión de levadura.

Se elaboró la curva de actividad específica graficando la actividad enzimática en mg/ml. de fructosa vs. tiempo en hrs. de fermentación.

ESTUDIO DEL SISTEMA ENZIMATICO RESPONSABLE DE LA - DEGRADACION DE LA FRUCTANA.

PREPARACION DEL BIOCATALIZADOR NO-VIABLE.

El uso de un biocatalizador no-viable ofrece numerosas ventajas (9, 19):

- a) La no extracción o purificación de la fructanasa.
- b) Mayor estabilidad en el reactor.
- c) Se facilita la transferencia del sustrato hacia y a partir de la ubicación de la enzima debido a las células muertas suavemente rotas o permeabilizadas. y
- d) El sustrato no usado puede ser reciclado.

PROCEDIMIENTO:

Un cultivo de Candida pseudotropicalis fue desarrollado en un fermentador de 600 ml. conteniendo 500 ml. -- del medio para el crecimiento (ya descrito anteriormente).

Las células fueron cosechadas a las 20 horas, por centrifugación, lavadas con Buffer de Acetatos (0.1M) pH 5, y concentradas por centrifugación a 3000 rpm por 10 -- minutos.

Las levaduras fueron suspendidas en 50 ml. de agua destilada.

Estudios preliminares indicaron que las células -- suspendidas en etanol al 95% eran muertas y retenían un -- 75% de la actividad enzimática original (9, 19).

Como el reporte no indicaba el tiempo de suspensión

en etanol al 95% se hizo una prueba para ver en qué tiempo se obtenfa la mayor retención de actividad enzimática.

Por lo que se probó en los tiempos de 5,10,15,20,-25,30,35 y 40 y 45 minutos.

La suspensión de levaduras (50 ml.) fue suspendida en 450 ml. de Etanol al 95%, sacando en los diferentes intervalos de tiempo, 5 ml. del precipitado o muestra.

Cada muestra fue centrifugada para concentrar de nuevo las levaduras y eliminar el sobrenadante (etanol).

Las levaduras se lavaron 2 veces con Buffer de Acetatos (0.1M) pH5, se centrifugó y se eliminó el Buffer y cada muestra fue suspendida en 5 ml. de agua destilada.

Se procedió a determinar la actividad enzimática - (siguiendo la misma metodología descrita anteriormente).

Se grafico asi, los resultados.

INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Se ensayó diferentes rangos de pH para determinar cuál brindaba el más óptimo en las condiciones de operación de la fractanasa.

Se probó desde un pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 con Buffer de Citratos (0.1M) y los pH 6.0, 6.5 y 7.0 con un Buffer de Fosfatos (0.1M).

PROCEDIMIENTO:

Se colocó 1 ml. de la suspensión de levaduras tratadas 30' con Etanol al 95% (suspendidas en 50 ml. de agua destilada) en un matraz aforado de 50 ml. para quedar una dilución de 1:50 aforándose con agua destilada.

Esta dilución fue realizada para que las lecturas cayeran dentro de la curva de calibración del DNS.

Se determinó la actividad enzimática de la siguiente manera:

MUESTRA No.	SUSPENSION DE LA FRUCTA NASA (CELS. ENTERAS) 23.0 mg/ml. de levadura peso en seco	SOLUCION DE FRUCTANA 1.58 mg. de fructosa/ml.	BUFFER (1 ml.)	INCUBACION	DNS (BAÑO MARIA A EBULLICION (5 min))	SOLUCION DE TARTRATO DE NayK
1	0.5 ml.	1 ml.	CITRATOS pH 3.0	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.
2	0.5 ml.	1 ml.	CITRATOS pH 3.5	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.
3	0.5 ml.	1 ml.	CITRATOS pH 4.0	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.
4	0.5 ml.	1 ml.	CITRATOS pH 4.5	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.
5	0.5 ml.	1 ml.	CITRATOS pH 5.0	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.
6	0.5 ml.	1 ml.	CITRATOS pH 5.5	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.
7	0.5 ml.	1 ml.	FOSFATOS pH 6.0	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.
8	0.5 ml.	1 ml.	FOSFATOS pH 6.5	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.
9	0.5 ml.	1 ml.	FOSFATOS pH 7.0	1 Hr. 50°C	3 ml.	0.5 ml.

De cada muestra se hizo su blanco, desnaturalizando la suspensión de fructanasa, calentando a ebullición - por 10 minutos; una vez fría la suspensión siguió el mismo tratamiento que la muestra problema, se realizó al mismo tiempo.

Procesada la muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se tomó la lectura del sobrenadante (libre de partículas) en el espectrofotómetro a 550 nm. (leyendo absorbencia).

Se realizó una curva graficando la actividad enzimática en mg/ml. de fructosa vs. el pH.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Se probó diferentes valores de temperaturas comprendidas entre los 10,20,30,35,40,45,50,55,60 y 70°C para conocer la óptima para las condiciones de operación de la fructanasa.

PROCEDIMIENTO:

Se realizó con la misma suspensión de levaduras -- utilizadas para determinar el pH óptimo (para que las condiciones de tratamiento y la fuente de enzima fueran -- iguales).

La actividad enzimática se desarrolló de la siguiente manera:

MUESTRA No.	SUSPENSIÓN DE LA FRUCTA NASA (CELS. EN TERAS) 23.0 mg/ml de levadura peso en seco	SOLUCIÓN DE FRUC- TANA 1.58 mg. de fruc- tosa/ml.	BUFFER DE CITRATOS (0.1M) pH5	INCUBACION 1 HORA a	DNS (BARO MARIA A EBU LLI-- CION 5 MI- NUTOS)	SOLUCIÓN DE TAR- TRATO DE NayK
1	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	10°C	3 ml.	0.5 ml.
2	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	20°C	3 ml.	0.5 ml.
3	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	30°C	3 ml.	0.5 ml.
4	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	35°C	3 ml.	0.5 ml.
5	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	40°C	3 ml.	0.5 ml.
6	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	45°C	3 ml.	0.5 ml.
7	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	50°C	3 ml.	0.5 ml.
8	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	55°C	3 ml.	0.5 ml.
9	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	60°C	3 ml.	0.5 ml.
10	0.5 ml.	1 ml.	1 ml.	70°C	3 ml.	0.5 ml.

Se hizo los blancos de la misma forma que se describió anteriormente para el pH óptimo.

Procesadas las muestras se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se tomó la lectura del sobrenadante (libre de partículas) en el espectrofotómetro a 500 nm.

Se elaboró una curva graficando la actividad enzimática en mg/ml. de fructosa vs. temperatura.

HIDROLISIS ENZIMATICA

Una vez que se determinó el pH y temperatura óptima para la operación de la fructanasa, se realizó la hidrólisis enzimática de la fructana en el jugo de A. tequilana.

PROCEDIMIENTO:

Las hidrólisis enzimáticas se realizó en Batch en un reactor de 50 ml. de capacidad. Las células de Candida pseudotropicalis se trataron para utilizarlas como un biocatalizador no-viable (metodología ya descrita).

Se llevó a cabo las hidrólisis enzimáticas en las siguientes condiciones:

- 20 ml. de jugo de A. tequilana
- 5 ml. de Buffer de Citratos (0.1M) pH5
- 25 ml. la suspensión de enzima

A una temperatura de 50°C y a una agitación muy lenta (150 rpm aprox.) y a un pH de 5.

Se hizo un muestreo a las 0,1,2,4,6,8,10,12 y 24 hrs. tomando una alícuota de 2 ml. del hidrolizado en cada intervalo de tiempo.

Unas pruebas se realizaron con la fructanasa tratada durante 5' y otras 30' con Etanol al 95%.

Las muestras recolectadas se filtraron por membrana (0.45 μ m), se analizaron los azúcares reductores resultado de la hidrólisis enzimática de la fructana de Jugo de A. tequilana en el cromatógrafo de líquidos.

Se determinó la concentración del jugo de A. tequilana mediante la hidrólisis ácida.

Una hidrólisis enzimática se llevó a cabo en un reactor de 500 ml. bajo las siguientes condiciones:

490 ml. de jugo de A. tequilana

50 ml. de suspensión de fructanasa (tratada 30' con Etanol al 95%)

PROCEDIMIENTO:

Se vació el jugo de A. tequilana (el cual había sido centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos para eliminar los sólidos) al reactor de 500 ml. el cual se conectó a un aparato electrotérmico para conservar la temperatura a 50°C, se agregó (se tomó antes la muestra inicial a un tiempo 0) la suspensión de fructanasas, se hizo una serie de muestreos a las 1,2,4,5,6,y 7 hrs., se tomó una alícuota de 5 ml. del hidrolizado en cada intervalo de tiempo.

La hidrólisis enzimática se mantuvo en agitación (150 rpm); esto con la ayuda de un aparato electromagnético, el cual hacía girar una barra magnética colocada dentro del reactor.

El pH se mantuvo a 4.8 (pH del jugo) se colocó un potenciómetro dentro del reactor para mantener el pH óptimo.

Se hicieron los análisis igual como se expuso anteriormente.

Se elaboraron curvas de los diversos ensayos graficando el porcentaje de fructana hidrolizada vs. tiempo.

ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS AZÚCARES REDUCTORES

El análisis cualitativo y cuantitativo de los carbohidratos se efectuó por Cromatografía líquida de alta presión. Se utilizó un equipo cromatográfico armado en el Instituto de Madera, Celulosa y Papel de la U. de G. que no requirió preparativos complicados de las muestras (desionización, etc.) simplemente inyectarlas en soluciones acuosas (7).

El aparato trabaja según el principio de la cromatografía de intercambio iónico a base de complejos de borato de los azúcares. Los azúcares forman mediante los iones de borato, complejos con carga negativa, cuya estructura química aún no ha sido completamente aclarada (7).

Al bombearse una mezcla de complejos de borato de azúcares en medio acuoso a través de una columna con un intercambiador de iones alcalino, existe una permanencia diferente para cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes que salen de la columna pueden detectarse y medirse por medio de métodos físicos o mediante la combinación de métodos químicos y físicos.

Este cromatógrafo trabaja semiautomáticamente, ya que permite el análisis de mezclas de azúcares en un tiempo que va de 15 a 90 minutos dependiendo de las condiciones de operación, las cantidades de azúcar pueden ser de 2 a 3 gamas (una gama es la millonésima parte de un gramo) con lo que se obtienen desviaciones promedios de 0.5% en una serie de inyecciones de 5 a 20 microlitros (7).

El aparato consta de una columna de intercambio -

iónico, un capturador de burbujas, dos bombas de pistón - con flujo continuo de 0.75 ml/min. que impulsan la solución buffer y al colorante a través de la columna separadora. Además posee tres manómetros para registrar las presiones de las bombas, un termostato que mantiene la temperatura a 60°C en la columna; el buffer y los azúcares se mantienen a 90°C. Consta también de un colorímetro de flujo continuo para la detección de la intensidad de coloración y un graficador que recibe los impulsos eléctricos provenientes del colorímetro para registrar las concentraciones de los azúcares en cromatogramas en forma de picos.

La determinación cuantitativa se efectuó utilizando una gráfica de calibración de altura de pico vs. cantidad de azúcares en microlitros.

RESULTADOS

RESULTADOS

CUADRO 2.- CRECIMIENTO DE LEVADURAS EN UN MEDIO DE CULTIVO UTILIZANDO FRUCTANA EXTRAIDA DE JUGO DE A. tequilana.

FUENTE	24 Hrs.	48 Hrs.	72 Hrs.	LEVADURAS	BACTERIAS	HONGOS FILAMENTOSOS
MELON	-	+	+	+	+	-
MANDARINA	-	+	+	+	+	<u>+</u>
MANZANA	-	-	+	-	+	-
PULQUE	+	+	+	+	+	-

+ CRECIMIENTO

+ CRECIMIENTO DEBIL

- NULO CRECIMIENTO

CUADRO 3.- CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS OBSERVADAS EN - AGAR DE PAPA Y DEXTROSA CON ANTIBIOTICOS A TEMPERATURA AMBIENTE

FUENTE	CONSISTENCIA	BORDES	ALTURA	FORMA	COLOR	TAMAÑO
MELON	Cremosa	Contfnuos	Elevada	Redonda	Bco. Brillante	Colonias Pequeñas
MANDARINA	Mucosa	Discontfnuos	Aplanada	Redonda	Crema Brillante	Colonias Grandes
PULQUE	Cremosa	Contfnuos	Elevada	Redonda	Bco. Brillante	Colonias Pequeñas

CUADRO 4. CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS OBSERVADAS EN -
 AGAR DE PAPA Y DEXTROSA CON ANTIBIOTICOS A 35°C

FUENTE	CONSIS- TENCIA	BORDES	ALTURA	FORMA	COLOR	TAMAÑO
MELON	CREMOSA	CONTINUOS	ELEVADA	REDONDA	BCO. BRILLANTE	COLONIAS PEQUEÑAS
MANDARINA	MUCOSA	DISCONTI- NUOS	APLANADA	REDONDA	CREMA BRILLANTE	COLONIAS PEQUEÑAS
PULQUE	CREMOSA	CONTINUOS	ELEVADA	REDONDA	BCO. BRILLANTE	COLONIAS PEQUEÑAS

CUADRO 5. DETERMINACION CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZI-
 Matica DE FRUCTANASA EN LAS LEVADURAS AISLADAS.

LEVADURAS AISLADAS DE	SOBRENADANTE	CELULAS ENTERAS
MELON	-	+
MANDARINA	-	-
PULQUE	-	+

+ Si hubo actividad enzimática

- No hubo actividad enzimática

CUADRO 6.- MORFOLOGIA MACROSCOPICA Y MICROSCOPICA DE LA CEPA AISLADA DEL PULQUE EN AGAR DE PAPA Y - DEXTROSA INCUBADAS A 35°C DURANTE 48 HRS.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS		CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	
COLOR	BLANCO BRILLANTE	FORMA DE LA CELULA	OVOIDE
FORMA	REDONDA	REPRODUC- CION ASEXUAL	GEMACION
ALTURA	ELEVADA		
SUPERFICIE	LISA	GEMACION	MULTILATE RAL
ASPECTO	CREMOSO		
BORDES	CONTINUOS	TINCION DE GRAM	PRESENCIA DE BACTE- RIAS GRAM NEGATIVAS
CONSISTENCIA	SUAVE		
TAMAÑO	COLONIAS PEQUEÑAS		

CUADRO 7.- CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS OBSERVADAS EN CALDO DE DEXTROSA Y SABOURAUD DE LA CEPA - AISLADA DEL PULQUE INCUBADA A 35°C DURANTE 48 HRS.

FORMACION DE BURBUJAS EN LA SUPER FICIE	NEGATIVO
AUSENCIA DE CRECIMIENTO EN LA SUPER FICIE	POSITIVO
FORMACION DE PELICULA O VELO	NEGATIVO
FORMACION DE SEDIMENTO	POSITIVO
FORMACION DE ANILLO	POSITIVO

CUADRO 8. - PURIFICACION DE LA CEPA
INCUBADOS A 35°C DURAN-
TE 48 HRS.

MEDIOS DE CULTIVO	FROTIS TENIDOS POR GRAM
CALDO DE DEXTROSA Y SABOURAUD + HCl 1N	BACTERIA PRESENTE
SIEMBRA EN AGAR MYCOBIOTIC	BACTERIA PRESENTE
RESIEMBRA EN AGAR MYCOBIOTIC	BACTERIA PRESENTE
PENICILINA G SODICA 25,000 u	BACTERIA PRESENTE
PENICILINA G SODICA 50,000 u	BACTERIA PRESENTE
PENICILINA G SODICA 100,000 u	BACTERIA PRESENTE
PENICILINA G SODICA 500,000 u	BACTERIA AUSENTE
PENICILINA A SODICA 1'000,000 u	BACTERIA AUSENTE

I) CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

CUADRO 9. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS EN CALDO DE GLUCOSA - EXTRACTO DE LEVADURA - PEPTONA INCUBADAS A 28°C DURANTE 48 HRS.

MACROSCOPICAMENTE		MICROSCOPICAMENTE	
FORMACION DE SEDIMENTO	POSITIVO	FORMA DE LA CELULA	OVOIDE
FORMACION DE ANILLO	POSITIVO	REPRODUCCION ASEXUAL	GEMACION
FORMACION DE PELICULA O VELO	NEGATIVO	GEMACION	MULTILATERAL

CUADRO 10.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA CEPA AISLADA DEL PULQUE EN AGAR DE GLUCOSA -- EXTRACTO DE LEVADURA-PEPTONA INCUBADO A 28°C DURANTE 72 HRS.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS		CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	
COLOR	BLANCO BRILLANTE	FORMA DE LA CELULA	OVOIDE
FORMA	REDONDA	REPRODUCCION ASEXUAL	GEMACION
ALTURA	ELEVADA	GEMACION	MULTILATERAL
SUPERFICIE	LISA	PSEUDOMICELIO	AUSENTE
ASPECTO	CREMOSO		
BORDES	CONTINUOS		
CONSISTENCIA	SUAVE		
TAMAÑO	COLONIAS PEQUEÑAS		

CUADRO 11.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA CEPA AISLADA DEL PULQUE EN AGAR WORT INCUBADO A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 30 DIAS

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS		CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	
COLOR	AMARILLO OPACO	FORMA DE LA CELULA	OVOIDE
FORMA	REDONDA	GEMACION	MULTILATERAL
ALTURA	ELEVADA	PSEUDOMICELIO	PRESENTE
SUPERFICIE	LISA	MICELIO	AUSENTE
ASPECTO	SECO		
BORDES	CONTINUOS		
CONSISTENCIA	COHERENTE		
TAMAÑO	COLONIAS PEQUEÑAS		

II) CARACTERISTICAS SEXUALES

CUADRO 12.- CARACTERISTICAS SEXUALES OBSERVADAS EN AGAR GORODKOWA DE LA CEPA AISLADA DEL PULQUE INCUBADA A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 15 DIAS.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS		CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	
COLOR	BLANCO BRILLANTE	FORMA DE LA CELULA	OVOIDE
FORMA	REDONDA	GEMACION	MULTILATERAL
ALTURA	APLANADA	ASCOPORAS	AUSENTES
SUPERFICIE	LISA	ENDOSPORAS	AUSENTES
ASPECTO	CREMOSO	CONIDIAS	AUSENTES
BORDES	CONTINUOS	CLAMIDOSPORAS	AUSENTES
CONSISTENCIA	SUAVE	PSEUDOMICELIO	PRESENTE
TAMAÑO	COLONIAS MEDIANAS	MICELIO	AUSENTE

CUADRO 13.- CARACTERISTICAS SEXUALES OBSERVADAS EN AGAR DE JUGO DE VEGETALES V-8 DE LA CEPA AISLADA DEL PULQUE INCUBADA A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 15 DIAS.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS		CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	
COLOR	AMARILLO OPACO	FORMA DE LA CELULA	OVOIDE
FORMA	REDONDA	GEMACION	MULTILATERAL
ALTURA	ELEVADA	ASCOSPORAS	AUSENTES
SUPERFICIE	LISA	ENDOSPORAS	AUSENTES
ASPECTO	SECO	CONIDIAS	AUSENTES
BORDES	CONTINUOS	CLAMIDOSPORAS	AUSENTES
CONSISTENCIA	CONSISTENTE	PSEUDOMICELIO	PRESENTE
TAMAÑO	COLONIAS PEQUEÑAS	MICELIO	AUSENTE

CUADRO 14.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS OBSERVADAS EN AGAR BIGGY DE LA CEPA AISLADA DEL PULQUE INCUBADA A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 72 HRS.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS		CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	
COLOR	CAFE CLARO BRILLANTE CON BORDES BLANCOS	FORMA DE LA CELULA	OVOIDE
FORMA	REDONDA	GEMACION	MULTILATERAL
ALTURA	ELEVADA		
SUPERFICIE	LISA	ESPORAS	AUSENTES
ASPECTO	CREMOSO	SEXUALES	
BORDES	CONTINUOS	PSEUDOMI	AUSENTE
CONSISTENCIA	SUAVE	CELIO	
TAMAÑO	COLONIA PEQUEÑA		

b) PRUEBA DE FILAMENTACION EN SUERO A 37°C DURANTE 24 HRS.

NEGATIVA

III) CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS

CUADRO 15.- RESULTADOS OBSERVADOS POR LA CEPA AISLADA DEL PULQUE A TEMPERATURA AMBIENTE

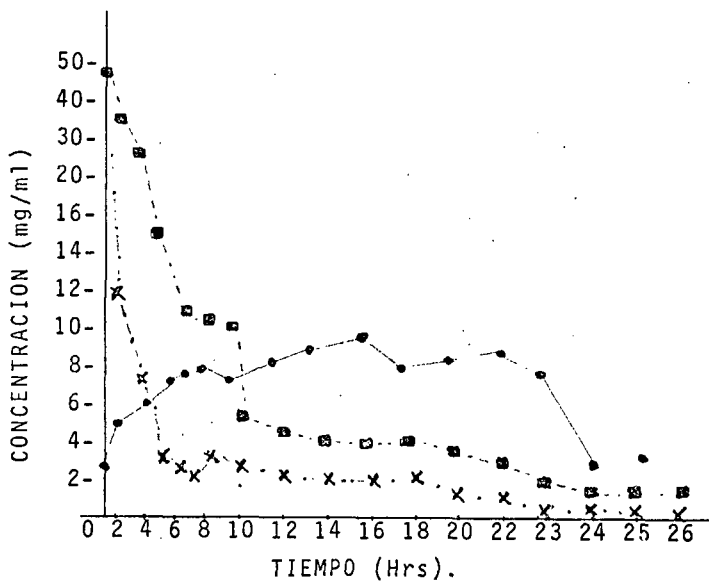
ZIMOGRAMA (72 HRS.)		AUXANOGRAMA (15 DIAS)
DEXTROSA	ACIDO Y GAS	POSITIVA
GALACTOSA	ACIDO Y GAS	POSITIVA
LACTOSA	ACIDO Y GAS	POSITIVA
MALTOSA	NO ACIDEZ NO PRODUCCION DE GAS	NEGATIVA
SACAROSA	ACIDO Y GAS	POSITIVA
RAFINOSA	ACIDO Y GAS	POSITIVA

CUADRO 16.- CINETICA DE LA FERMENTACION EN BATCH DE JUGO DE A. tequilana con Candida pseudotropicalis.

MUESTRAS No.	FRUCTOSA (mg/ml)	GLUCOSA (mg/ml)	CARBOHIDRATOS TOTALES (mg/ml)	FRUCTOSA (mg/ml) HIDROLISIS ACIDA DE LAS MUESTRAS	BIOMASA (mg/ml)	TIEMPO (Hrs.)
HIDROLISIS ACIDA DEL JUGO DE A. tequilana	1142.47	10.22	152.69	-	-	-
CARBOHIDRATOS libres en la Fermentación (Hid. Acida)	45.16	2.95	48.11	-	2.80	0
1	11.20	1.05	12.25	35.75	5.08	2
2	7.30	0.25	7.55	26.40	6.18	4
3	3.26	-	-	14.10	6.96	5
4	2.52	-	-	10.8	7.18	6
5	2.17	-	-	10.4	7.96	7
6	3.46	-	-	9.3	8.06	8
7	2.86	-	-	4.8	7.48	10
8	2.40	-	-	4.1	8.08	12
9	2.08	-	-	3.5	8.36	14
10	1.60	-	-	3.7	8.74	16
11	1.80	-	-	3.9	7.86	18
12	1.12	-	-	3.4	8.28	20
13	1.30	-	-	1.9	8.50	22
14	0.08	-	-	1.6	7.72	23
15	0.47	-	-	1.0	3.52	24
16	0.30	-	-	1.0	3.80	25
17	0.40	-	-	0.9	-	26

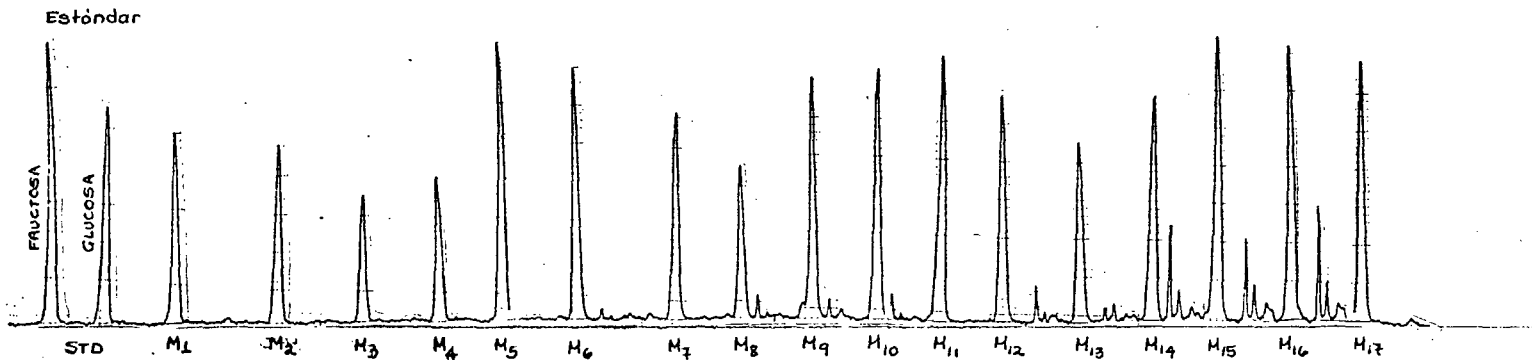
GRAFICA No. 1

CINETICA DE LA FERMENTACION BATCH DE JUGO
DE A. tequilana CON C. pseudotropicalis.

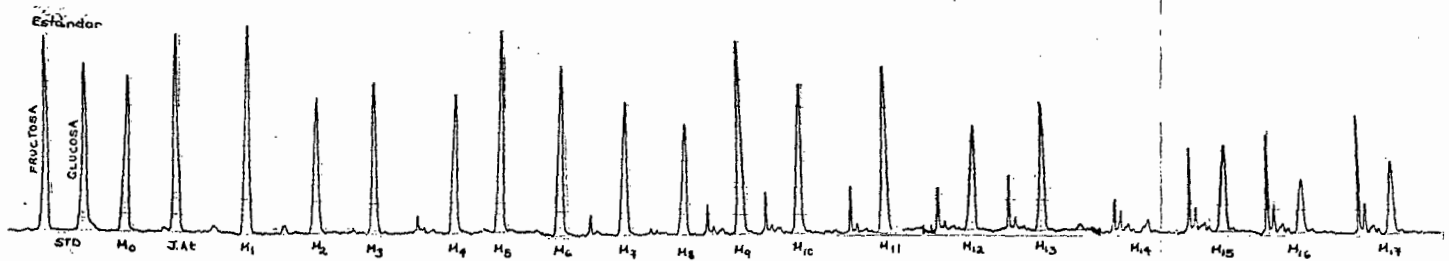


- BIOMASA (mg/ml peso en seco)
- - X - - FRUCTOSA LIBRE
- - □ - - FRUCTOSA (Hidrolisis Acida)

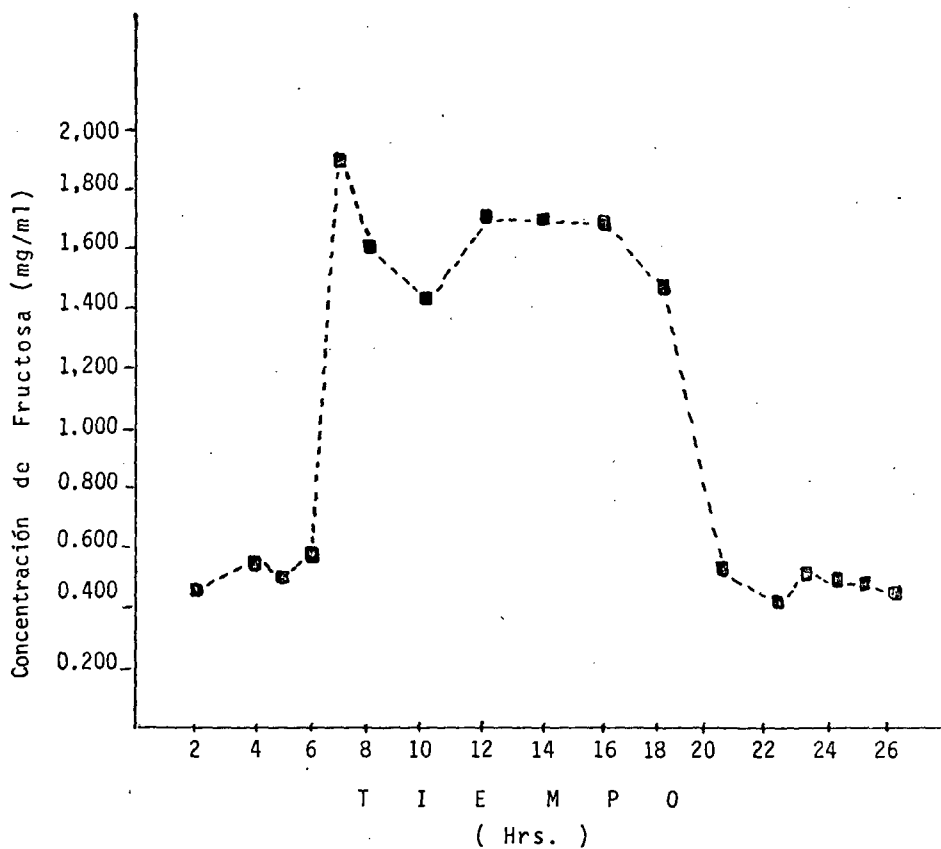
Δ CROMATOGRAMA DEL JUGO DE A. tequilana DE LA FERMENTACION EN BATCH CON C. pseudotropicalis



B. CROMATOGRAMA DE LA HIDROLISIS ACIDA DEL JUGO DE A. tequilana DE LA
FERMENTACION EN BATCH CON C. pseudotropicalis



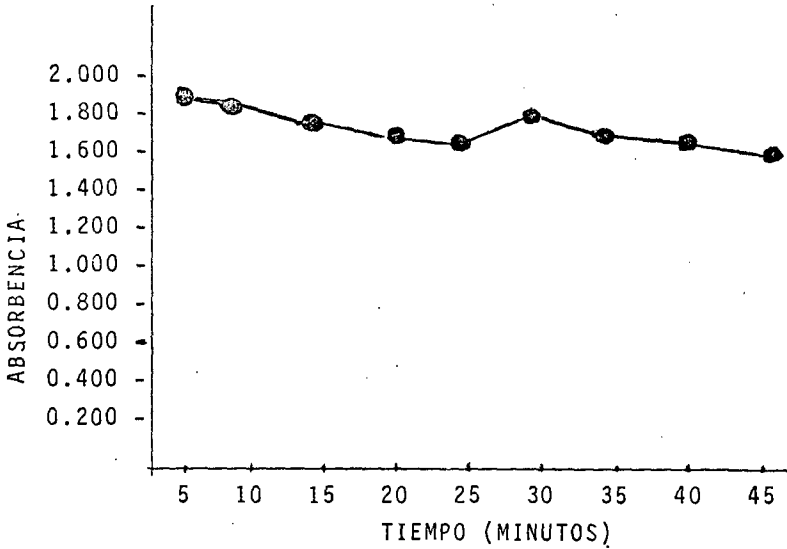
GRAFICA 2.- DINAMICA DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA PRESENTADA POR Candida pseudotropicalis EN LA FERMENTACION BATCH DE JUGO DE Agave tequilana



La actividad enzimática es expresada en mg/ml.

GRAFICA No.3

INFLUENCIA DE LA PRECIPITACION DE C. pseudotropicalis CON ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.



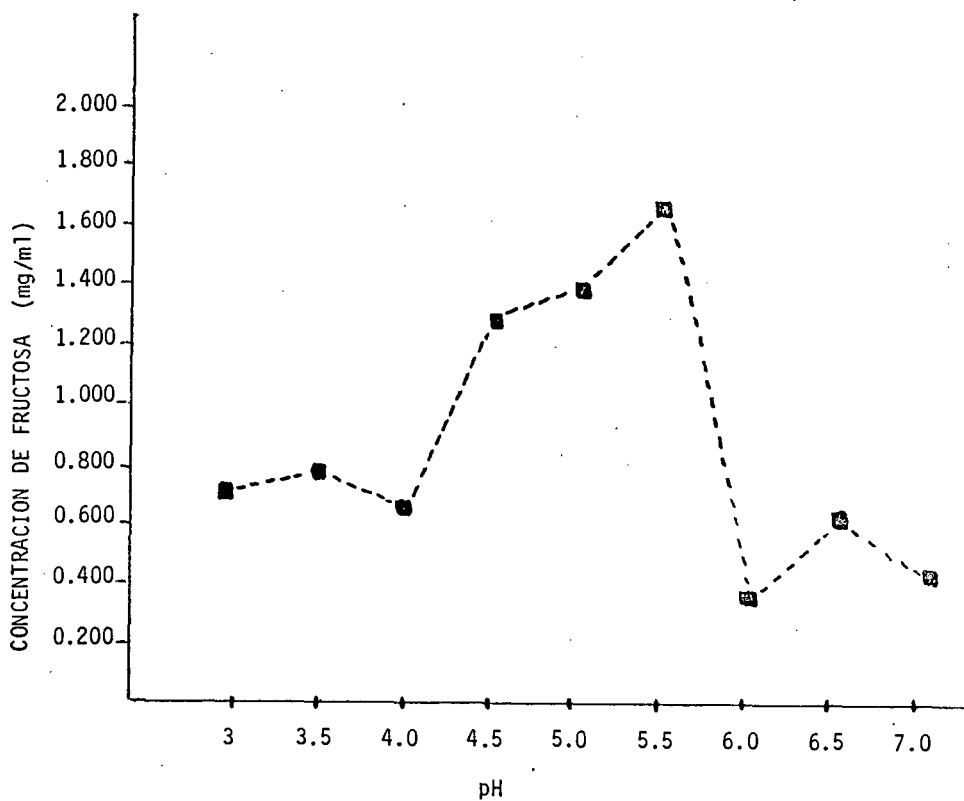
CONDICIONES: 0.2014g/5ml de Levadura peso en seco.

Fructana: 1.58 mg de Fructosa/ml

T = 50°C

pH = 5.0

GRAFICA 4.- INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FRUCTANASA DE C. pseudotropicalis



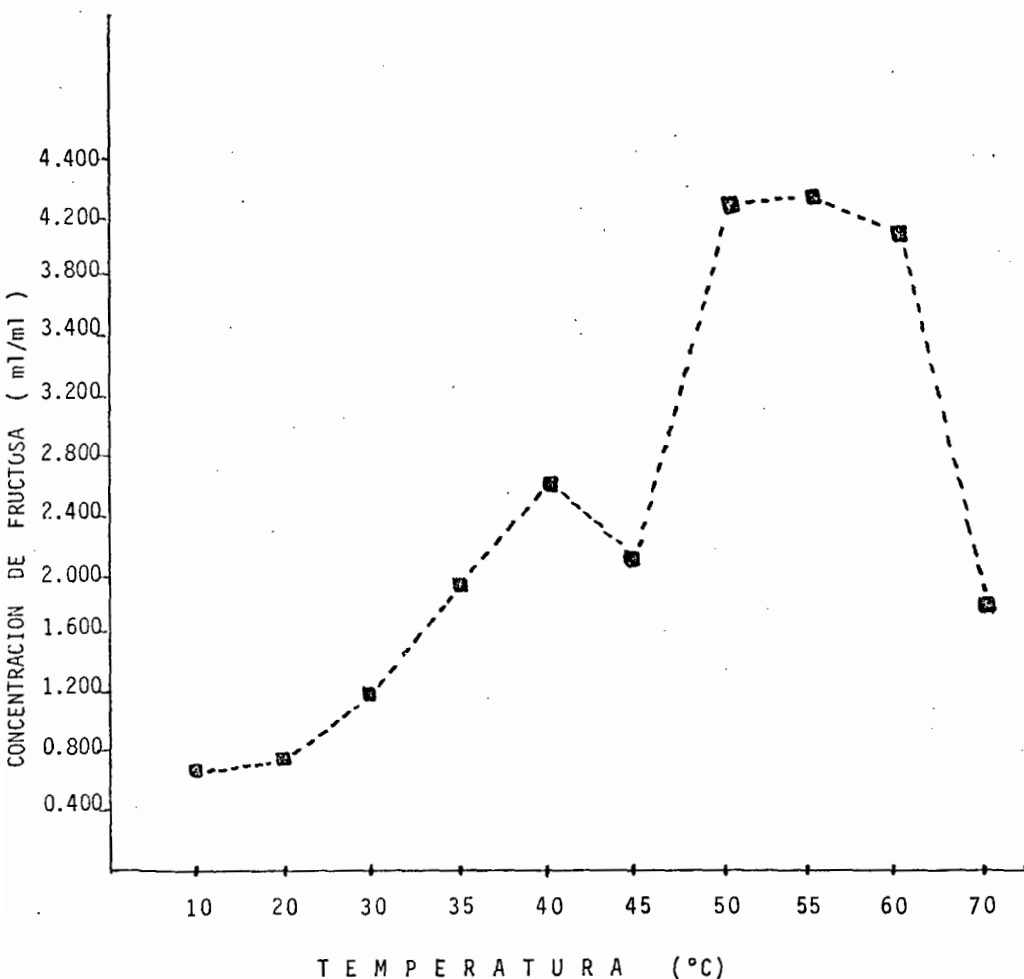
CONDICIONES:

50°C

Fructanasa (23.0 mg/ml de levadura en peso seco).

Concentración de fructana: 1.58 mg. de fructosa/ml.

GRAFICA 5.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD --
ENZIMATICA DE LA FRUCTANASA DE C. pseudotropicalis



CONDICIONES:

pH 5.0

Fructanasa (23.0 mg./ml. de levadura peso en seco)

Concentración de fructana: 1.58 mg. de fructosa/ml.

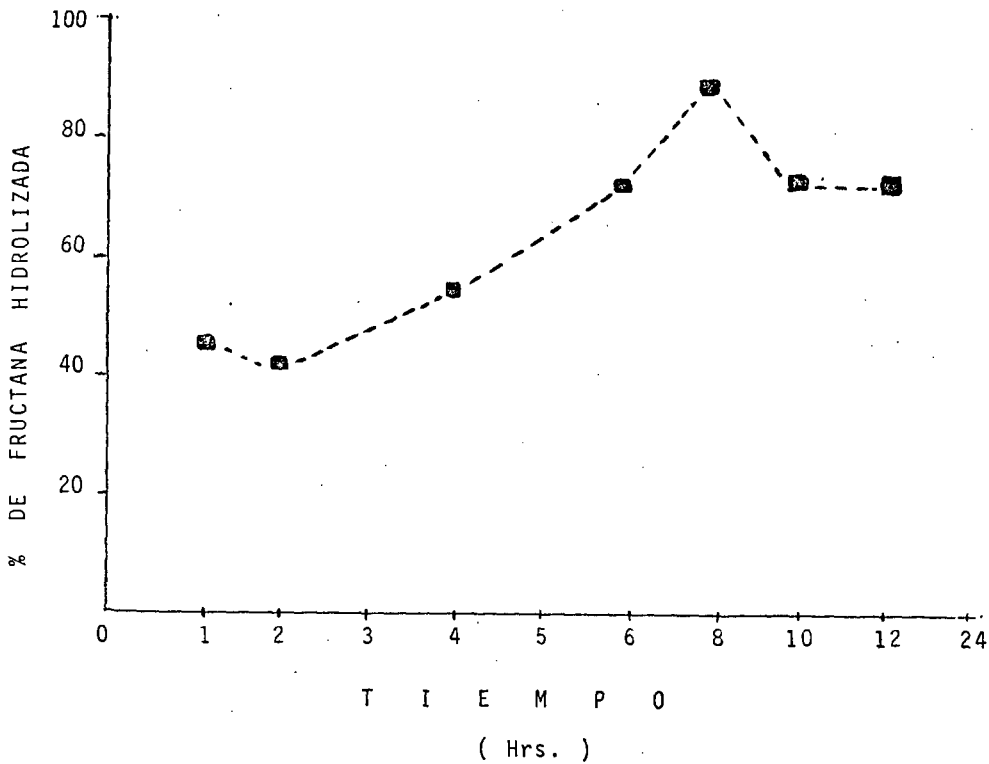
CUADRO I HIDROLISIS ENZIMATICA EN BATCH DE FRUCTANA DE A. tequilana

MUESTRAS	TIEMPO (Hrs)	FRUCTOSA (mg/ml)	GLUCOSA (mg/ml)	CARBOHIDRATOS TOTALES (mg/ml)
Carbohidratos libres en el jugo de <u>A. tequilana</u>	-	11.67	2.83	14.50
Hidrólisis ácida del Jugo de <u>A. tequilana</u>	-	120.00	3.75	123.75
M ₁	1	26.82	2.55	39.37
M ₂	2	39.77	3.40	43.17
M ₃	4	43.75	2.07	45.82
M ₄	6	56.13	3.50	59.63
M ₅	8	57.73	4.25	61.98
M ₆	10	60.81	4.25	65.06
M ₇	12	68.13	5.10	73.23
M ₈	24	48.00	-	-

CONDICIONES:

Se realizó en un reactor de 50 ml. 50°C y pH= 5
 20 ml. de jugo de A. tequilana
 5 ml. de Buffer de Citratos (0.1M) pH5
 25 ml. de suspensión de fructanasa (0.500 gr. de levadura) tratada con Etanol al 95% durante 30 minutos.

GRAFICA I.- HIDROLISIS ENZIMATICA EN BATCH CON FRUCTANA DE A. tequilana CON FRUCTANASA TRATADA DURANTE 30 MINUTOS CON ETANOL AL 95%.



CONDICIONES:

0.500 gr. de levadura

50°C

pH 5.0

ENSAYO II

CUADRO II. HIDROLISIS ENZIMATICA EN BATCH DE FRUCTANA DE A. tequilana

MUESTRAS	TIEMPO (Hrs)	FRUCTOSA (mg/ml)	GLUCOSA (mg/ml)	CARBOHIDRATOS TOTALES (mg/ml)
Carbohidratos libres en el jugo de <u>A. tequilana</u>	-	7.50	1.35	8.85
M ₁	1	55.50	3.32	58.82
M ₂	2	55.00	-	-
M ₃	4	65.00	4.14	69.14
M ₄	6	87.50	4.14	91.64
M ₅	8	105.00	5.66	110.66
M ₆	10	88.75	2.83	91.58
M ₇	12	85.62	4.25	89.87
M ₇ Hidrólisis Ácida	12	120.93	6.38	127.31

CONDICIONES:

Se realizó en el reactor de 50 ml.

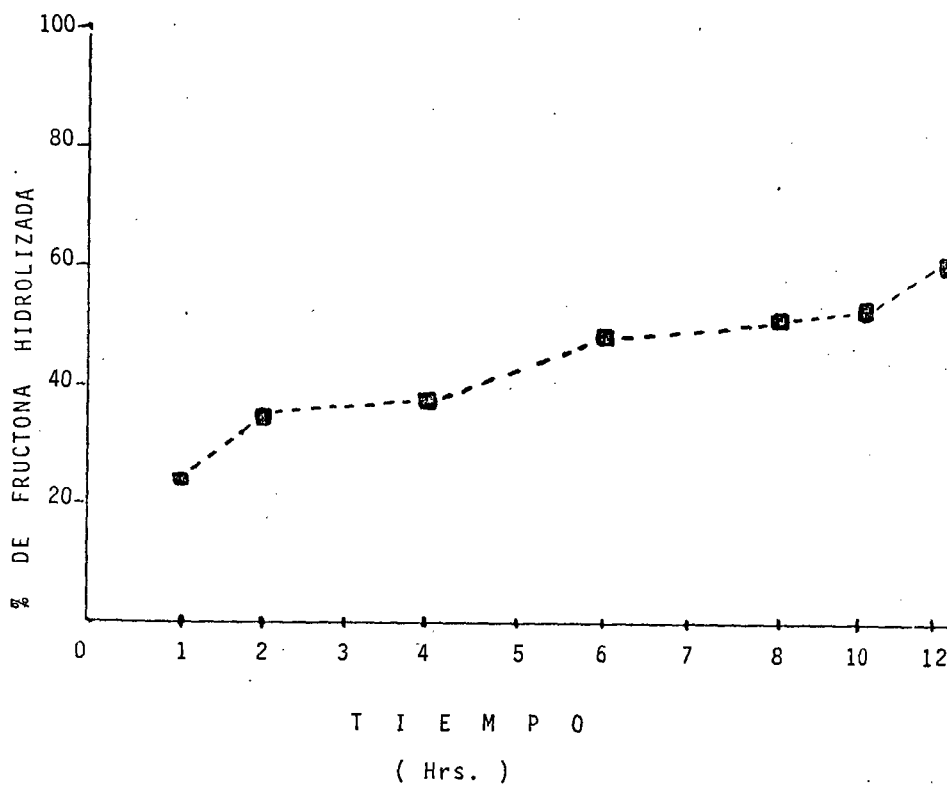
20 ml. de jugo de A. tequilana

5 ml. de Buffer de Citratos (0.1M) pH5

25 ml. de suspensión de fructanasa (1.547 gr. de levadura) tratada con Etanol al 95% durante 5 minutos.

50°C y pH = 5

GRAFICA II HIDROLISIS ENZIMATICA EN BATCH DE FRUCTANA DE A. tequilana CON FRUCTANASA TRATADA DURANTE 5 MIN. CON ETANOL AL 95%



CONDICIONES:

1.547 gr. de levadura peso en seco

50°C

pH 5.0

ENSAYO III

CUADRO III HIDROLISIS ENZIMATICA EN BATCH DE FRUCTANA DE A. tequilana.

MUESTRAS	TIEMPO (Hrs)	FRUCTOSA (mg/ml)	GLUCOSA (mg/ml)	CARBOHIDRATOS TOTALES (mg/ml)
Carbohidratos libres en el jugo de <u>A. tequilana</u>	-	3.28	1.56	4.84
Hidrólisis ácida del jugo de <u>A. tequilana</u>	-	80.00	4.40	84.40
M ₁	1	38.14	2.27	40.41
M ₂	2	53.55	3.40	56.95
M ₃	4	71.73	3.40	75.13
M ₄	6	72.24	3.40	75.64
M ₅	8	66.18	3.40	69.58
M ₆	10	71.20	3.20	74.40
M ₇	12	62.40	3.20	65.60
M ₈	24	81.33	4.54	85.87
Hidrólisis Ácida de M ₈	24	79.56	4.25	83.81

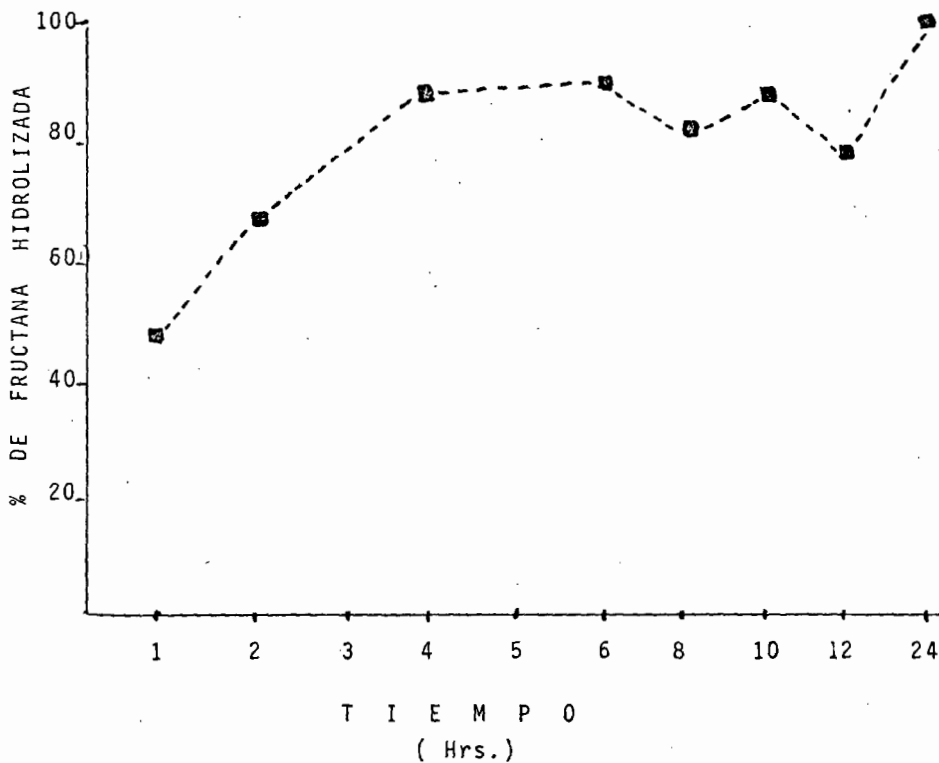
CONDICIONES: Se realizó en un reactor de 50 ml. 50°C y pH 5.0

20 ml. de jugo de A. tequilana

5 ml. de Buffer de Citratos (0.1M) pH 5

25 ml. de suspensión de fructanasa (1.0478 gr. de levadura) tratada con Etanol al 95% durante 30 minutos.

GRAFICA III HIDROLISIS ENZIMATICA EN BATCH DE FRUCTANA
DE A. tequilana TRATADA DURANTE 30 MINUTOS
CON ETANOL AL 95%



CONDICIONES:

1.0478 gr. de levadura peso en seco

50°C

pH 5.0

CUADRO IV HIDROLISIS ENZIMATICA DE FRUCTANA DE A. tequilana

MUESTRAS	TIEMPO (Hrs)	FRUCTOSA (mg/ml)	GLUCOSA (mg/ml)	CARBOHIDRATOS TOTALES (mg/ml)
Carbohidratos libres en el jugo de <u>A. tequilana</u>	-	5.55	0.45	6.0
Hidrólisis ácido del jugo de <u>A. tequilana</u>	-	78.26	4.50	82.76
M ₁	1	43.82	4.60	48.42
M ₂	2	50.20	4.20	54.40
M ₃	3	51.53	3.60	55.13
M ₄	4	55.38	4.50	59.88
M ₅	5	73.68	5.40	79.08
M ₆	6	80.06	-	-
M ₇	7	78.26	-	-

CONDICIONES:

Se realizó en un reactor de 600 ml.

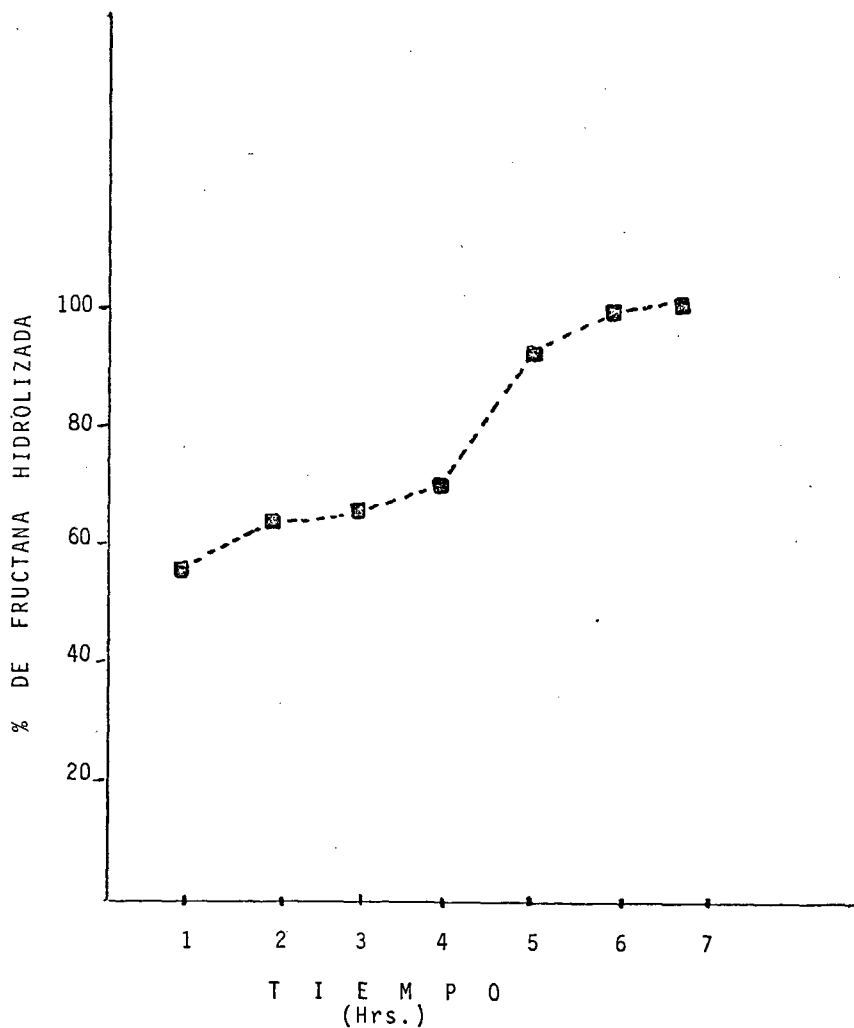
490 ml. de jugo de A. tequilana

50 ml. de suspensión de fructanasa (21.32 gr. de levadura) tratada con Etanol al 95% durante 30 minutos.

50°C

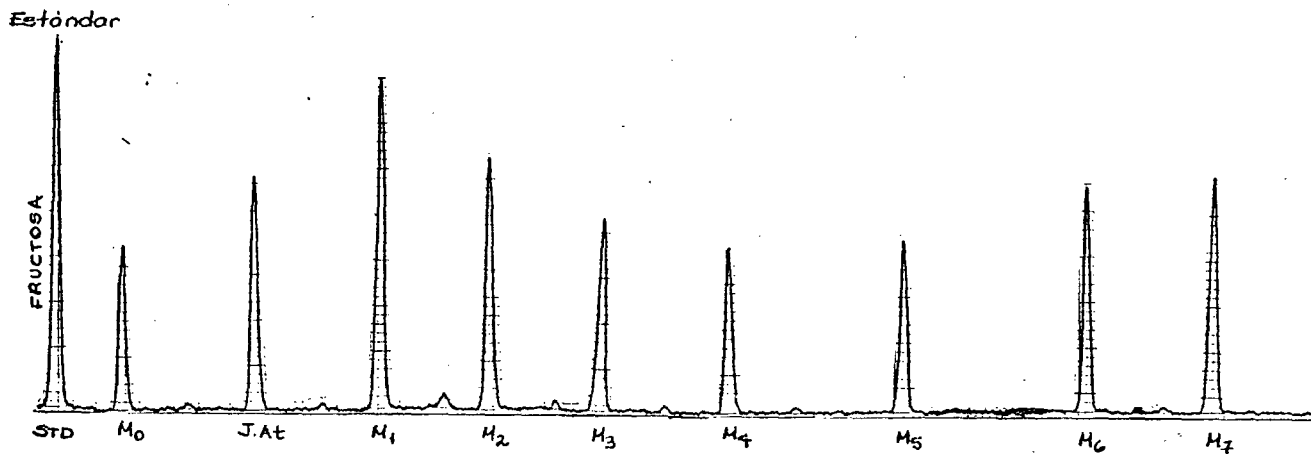
pH = 4.8

GRAFICA IV HIDROLISIS ENZIMATICA EN BATCH DE FRUCTANA DE
A. tequilana CON FRUCTANASA TRATADA DURANTE -
30 MINUTOS CON ETANOL AL 95%



CONDICIONES:
21.32 gr. de levadura peso en seco
50°C
pH 4.8

C. CROMATOGRAMA DE EL ENSAYO IV DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE FRUCTANA DE JUGO DE A. tequilana



DISCUSSION

DISCUSION DE RESULTADOS

SELECCION DE LA CEPA

En la selección de la cepa se tomó los siguientes criterios:

- (1) Que la fructanasa en la célula fuera accesible al sustrato (fructana). La levadura con actividad de fructanasa se encontrará la mayor parte en la pared celular.
- (2) La fructana al ser hidrolizada en fructosa, ésta fuera metabolizada para el crecimiento de la cepa.

De acuerdo a lo anterior, la levadura aislada de la mandarina fue eliminada porque las células no mostraron ninguna actividad de fructanasa, así como tampoco en el sobrenadante (ver cuadro 5).

Las levaduras aisladas del melón y del pulque sí presentaron actividad de fructanasa en la célula, siendo nula en ambas en el sobrenadante (ver cuadro 5).

La levadura aislada del pulque presentó más ventajas que la aislada del melón como:

- la actividad enzimática de la cepa fue por mucho la más efectiva para la hidrólisis de jugos ricos en fructana.
- el poder residual de fermentación de esta cepa puede liberar suficiente energía para la renovación de las células en el reactor.

- las células de esta cepa tiende a ser filamento--sa, lo cual es favorable para un proceso de in--movilización.
- cumple con los criterios (1) y (2) expuestos an--teriormente.
- no hubo problemas de competencia bacteriana, ya que en las fermentaciones se desarrolló muy bien inhibiendo el crecimiento bacteriano.

Las desventajas de la levadura aislada fueron:

- la actividad enzimática de la cepa fue menor a - la del pulque.
- el tamaño de la célula era muy pequeña siendo no muy favorable para el proceso de inmovilización.
- en las fermentaciones tuvo problemas en su desa--rrollo inhibiéndose ante la presencia de bacte--rias o en algunas ocasiones habiendo un desarro--llo de biomasa muy reducido.

Utilizándose finalmente como fuente potencial de - fructanasa la levadura aislada del pulque.

CONDICIONES OPTIMAS DE CULTIVO DE LA LEVADURA AISLADA DEL PULQUE.

Comparándose el desarrollo de la cepa en Agar de - Papa y Dextrosa a 35°C y a temperatura ambiente (30°C)

Tuvieron un mayor desarrollo los cultivos incuba--dos a una temperatura de 35°C.

Siendo las condiciones óptimas:

$$T = 35^{\circ}\text{C y pH} = 5.0$$

CARACTERIZACION DE LA LEVADURA AISLADA DEL PULQUE.

Resumiendo los resultados obtenidos en las características morfológicas presentadas en los cuadros 6,7,9, - 10,11,12,13 y 14 se tiene:

- Células ovales, reproducción vegetativa por gemación multilateral.
- La reproducción sexual no presente, por lo tanto no hubo formación de ninguna espora sexual.
- Cultivos no pigmentados y fermentación positiva.

Con las características morfológicas expuestas anteriormente se identificó la levadura de acuerdo a las claves para Género por Lodder, 1970 (15).

Clasificándose en el Género Candida (ver claves del Género según Lodder (15)).

Los resultados de las pruebas fisiológicas descritos en el cuadro 15 fueron base para la identificación a nivel especie de la levadura tomando las claves expuestas por Barnett (4) y Connant (6).

Utilizando el cuadro A para identificar las especies del género Candida según Connant (6), siendo positivas las pruebas de zimograma y auxanograma para la espe-

cie C. pseudotropicalis, esto concordando también con las claves de Barnett (4).

Por lo tanto la levadura aislada del pulque se --
identifico como: Candida pseudotropicalis.

CINETICA MICROBIANA DE LA FERMENTACION EN BATCH DE JUGO - DE A. Tequilana CON Candida pseudotropicalis.

El máximo crecimiento de C. pseudotropicalis se al-
canzó dentro de las 16 hrs. después de la inoculación co-
mo la muestra la Gráfica No. 1.

La actividad de la fructanasa intracelular aumentó
drásticamente durante la transición de fase de latencia -
a la fase estacionaria de la curva de la masa microbiana
como lo demuestran las Gráficas 1 (curva de la biomasa) y
2 (actividad específica).

Observándose que los niveles de la fructanasa in-
crementan proporcionalmente con el crecimiento.

Una vez que se agotó el sustrato (fructana) (ver -
cromatograma A y B), las células empezaron a autolisarse,
observándose que la actividad enzimática disminuyó en --
gran proporción; como lo muestran las Gráficas No. 1 (cur-
va de biomasa y curvas del sustrato) y No. 2 (curva de ac-
tividad específica).

La curva de la biomasa (ver gráfica No. 1) muestra
en la fase estacionaria del crecimiento éste bajaba y au-
mentaba, observándose que el consumo de fructana sucedía_

lo mismo, lo que hace pensar que C. pseudotropicalis se dedicaba a degradar fructana y una vez obtenida la fructosa ésta era consumida, aumentando la cantidad de biomasa, paraba el crecimiento y volvía a degradar la fructana para luego metabolizar de nuevo el producto; por eso probablemente las bajas y altas del crecimiento. (Ver cuadro 16 y Gráfica No. 1)

PREPARACION DEL BIOCATALIZADOR NO-VIABLE

Los resultados obtenidos de la preparación del biocatalizador no-viable mostrados en la Gráfica No. 3 muestran que la precipitación de C. pseudotropicalis con etanol al 95% a los 5 y 30 minutos llega a retener la mayor actividad enzimática de la fructanasa.

Se eligió el tiempo de 30 minutos porque es el más favorable para matar satisfactoriamente con el etanol a las levaduras y retiene una buena actividad enzimática de la fructanasa.

En el tiempo de 5 minutos se tiene una mayor retención de la actividad enzimática, pero no se obtuvo que las células fueran matadas satisfactoriamente (Ver Gráfica II).

INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La Gráfica No. 4 muestra que el pH óptimo de la fructanasa (célis. enteras) es de un pH de 5.5.

Pero se observa que a un pH de 6.0 se decae de una manera radical la actividad de la fructanasa.

Por lo que es más seguro manejar la actividad de la fructanasa a un pH de 5.0.

Para los pH 3.0, 3.5 y 4.0 se observa una actividad enzimática baja.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La Gráfica No. 5 muestra que la temperatura óptima fue entre 50 y 55°C para la fructanasa.

Eligiéndose la de 50°C, porque aunque se incrementara la temperatura en el reactor, no sería desfavorable para la actividad de la fructanasa, por lo tanto no perjudicaría la hidrólisis enzimática del jugo de A. tequilana.

Ya que en el reactor utilizado la temperatura tendía a elevarse, razón por la cual se trabajó la fructanasa a una temperatura de 50°C.

HIDROLISIS ENZIMATICA DE FRUCTANA DE JUGO DE Agave tequilana

ENSAYO I.

La Gráfica I muestra que se llegó a un máximo de - 58% de conversión de la fructana en fructosa-glucosa, en un lapso de 12 horas con fructanasa de C. pseudotropicalis (0.500 gr. de levadura en peso seco) tratada 30 minutos - con etanol al 95%.

La causa probable por la cual no se llegó a un -- 100% fue que la concentración de fructanasa fue menor para la cantidad de sustrato.

Se observó que a las 24 hrs. disminuyó la cantidad de fructosa como lo muestra el Cuadro I; esto debido quizá a un factor de contaminación del reactor, por una bacteria termófila, la cual consumió la fructosa-glucosa -- (Ver Gráfica I y Cuadro I).

ENSAYO II.

En esta hidrólisis se ensayó con fructanasa tratada 5 minutos con etanol al 95%. Ya que en este lapso se observó una mayor retención de la actividad enzimática - (como lo muestra la Gráfica II).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la anterior hidrólisis enzimática, mostraron que la suspensión - de fructanasa (0.500 gr. de levadura en peso seco) fue in suficiente, por lo que en esta hidrólisis se triplicó la cantidad de suspensión de fructanasa (1.547 gr. de levadura en peso seco).

Obteniendo un 86.5% de conversión de la fructana a las 8 horas como se muestra en la Gráfica II.

Se observó que la concentración de fructosa-glucosa decae a las 2 horas de la hidrólisis enzimática, así como también a las 10 y 12 horas.

Lo anterior se debió a que C. pseudotropicalis - fructanasa, no había sido matada satisfactoriamente con el proceso de etanol al 95% durante 5 minutos. Siendo su metabolismo todavía viable, por lo cual no se logró llegar a un 10% de conversión de la fructana, siendo ésta hidrolizada y el producto consumido por C. pseudotropicalis.

ENSAYO III

En esta hidrólisis enzimática se llegó al 100% de conversión de la fructana a fructosa-glucosa en un lapso de 24 horas como lo muestra la Gráfica III.

Utilizando fructanasa tratada con etanol al 95% durante 30 minutos (1.0478 gr. de levadura en peso seco) indicando que fue la concentración de enzima correcta para la cantidad de sustrato, con lo cual no hubo saturación de la enzima.

El cuadro III muestra que la hidrólisis ácida de la muestra de 24 horas, la concentración de carbohidratos totales es menor a la muestra de 24 horas de hidrólisis enzimática; esto sucede porque se hidrolizan los monosacáridos con el ácido y la temperatura.

Se muestra en el Cuadro III que la concentración de fructosa-glucosa bajó a las 8 y 12 horas, probable - -

mente a que la levadura todavía era viable, o a una bacteria termófila presente.

ENSAYO IV

Se manejó un volumen de jugo de A. tequilana de 490 ml. y una suspensión de fructanasa tratada durante 30 minutos (21.32 gr. de levadura en peso seco).

En este ensayo se llegó a una conversión del 100% de la fructana en fructosa-glucosa en un lapso de 7 horas como lo muestra la Gráfica IV y el Cromatograma C.

Demostrando que la fructanasa tratada durante 30 minutos no es viable.

En este caso no hubo problemas de contaminación. Se observó que al tiempo de 1 hora se llegó al 50% de conversión.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas al realizar el estudio de la hidrólisis enzimática de fructana de A. tequilana - Weber fueron las siguientes:

- Se muestra que Candida pseudotropicalis puede hidrolizar jugo de A. tequilana conteniendo fructana.
- Se obtuvo un 100% de hidrólisis enzimática de la fructana; esto se explica por el hecho de que las células crecieron en un medio con fructana, lo cual indujo la síntesis de enzima (fructanasa).
- El contenido inicial de fructanasa en las células fue responsable de la hidrólisis de fructana a través de toda la hidrólisis enzimática.
- El uso de biocatalizador no-viable ofreció la ventaja de la no extracción o purificación de la fructanasa.
- C. pseudotropicalis conteniendo fructanasa es susceptible para la inmovilización de células completas para la aplicación industrial.

De acuerdo a lo anterior, se concluye que:

- La transformación de fructana de A. tequilana a fructosa-glucosa mediante la hidrólisis enzimática es una técnica accesible. En la cual la fructosa-glucosa puede concentrarse como jarabe, presentando una solución alterna al problema de la industria azucarera nacional.

Con este tipo de edulcorante, se puede sustituir el azúcar cristalizado (sacarosa) en algunas industrias, dejando así al anterior para otros usos.

Obteniendo a partir de A. tequilana el jarabe de fructosa para la industria alimenticia.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Alexopoulos, J.C. y Mims, C.W. (1979). Introductory - Mycology. Third edition. John Wiley and Sons. New York. Chichester. Brisbane. Toronto. pp. 150-160.
- 2.- Archbold, H.K. (1940). Fructosans in the monocotyledons. *New Phytolog.* 39:185-219.
- 3.- Aspinall, J.P. y Dos Aupta, P.C. (1957). The structure of the fructosan from Agave veracruz Mill. *Proc. Chem.*, 193: 718-722.
- 4.- Barnett, A.J., Payne, R.W. y Yarrow, D. (1979). A Guide to Identifying and Classifying Yeasts. Cambridge University Press. pp. 1-100.
- 5.- Bucke, A. (1980). Recent Developments in the Production and Use of Glucose and Fructose -- Syrups. Barking, Essex: *Appl. Sci.*, 43 : 68.
- 6.- Connant, N.F., Smith, D.F. et al (1972). *Micología*. Nueva Editorial Interamericana, pp.50-80.
- 7.- Faix, O., (1979) Analizador de Carbohidratos por Cromatografía, ATCP, (XIX) (1).
- 8.- Fleming, S.E. y Grootwassink, J.W.D.(1979). Preparation of high fructose syrup from tubers of Jerusalem artichoke. *Criti. Rev. Food Sci.*, 12:1-28.

- 9.- Gestrelins, S., (1984), Use of non-viable cells for industrial application, CRC Immobilized Cells and Orangelles (Edited by B. Mattison), 2:19. Boca Raton: CRC Pres. Inc.
- 10.- GrootWassink, J.W.D. y Fleming, S.E. (1980). Non specific B-fructofuranosidase (inulinase) - from K. fragilis batch and continuous -- fermentation simple recovery and industrial properties. Enzy. Microb. Tech. 2: 45-53.
- 11.- Guiraud, J.P. y Galzy, P. (1981). Enzymatic hydrolysis of plant extract containing inulin.- Enz. Microb. Tech. 3:305-308.
- 12.- Guiraud, J.P. y et al (1983) Inulin hydrolysis by an immobilized yeast-cell reactor. Enz. - Microb. Tech., 5:185
- 13.- Kierstan,.M. (1980). Production of fructose syrups - from inulin. Proc. Biochemistry. 15 (4): 2-4.
- 14.- Levine, L., et al (1983). Fructose and glucose ingestion and muscle glycogen use during submaximal exercise. J. Appl. Physio. 55 - (6): 1767-1771.
- 15.- Lodder, J. (1971). The Yeasts. A Taxonomic Study. - - North-Holland Publishing Company-Amsterdam-London. pp. 1-122

- 16.- Mc Donald, E.J. (1946). The polyfructosans and di-fructose anhydrides. *Adv. Carboh. Chem.*-2: 253-277.
- 17.- Meier, H. y Reid, J.S.A. (1982). Reserve polysaccharides other than starch in higher plants . *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Volumen 13A* (Ed. by F.A. Loewus and W. Tanner), pp. 418-471.
- 18.- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid - Reagent for Determination of Reducing - Sugar. *Anal. Chem.*, 31:426-428.
- 19.- Parekh, S.R. y Margaritis, A. (1986). Application of immobilized cells of Kluyveromyces marxianus for continous hydrolysis to fructose of fructans in Jerusalem artichokè extracts. *J. Food Techn.* 21:509-515.
- 20.- Pollock, C.J. (1984). Physiology and metabolism of - sucrosyl fructans. *Storage Carbohydrates in Vascular Plants.* (Ed. by D.H. Lewis) pp. 97-113.
- 21.- Pollock, C.J. (1986). Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytolog.* 104:1-24.
- 22.- Sánchez Marroquín, A. Los Agaves de México en la Industria Alimentaria, Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo , pp. 20-100.

- 23.- Satyanarayana, M.N. (1977). The Structure of Naturally Occurring Oligosaccharides in Agave - Veracruz, Central Food Technological Research. Institute Mysore, India, pp. 15-50.
- 24.- Smith, D. (1973). The non structural carbohydrates . The Biochemistry of Herbage, Vol. 2 (Ed. by G.W. Butler and R.W. Bailey). Academic Press, New York, pp. 105-155.
- 25.- Thonart, P. y Artois, C. (1985). Inulin hydrolysis_ by and immobilized yeast cell reactor, - Biotechnology and Bioengineering Symp. - No. 15, pp. 410-418.
- 26.- Vandamme, E.J. y Deryke, D.G. (1983). Microbial Inulinases: fermentation process, properties and application. Adv. Appl. Microbiol. 29:139-176.

A P E N D I C E

CUADRO A

ZIMOGRAMA, AUXANOGRAMA Y OTRAS PRUEBAS PARA IDENTIFICAR LAS ESPECIES DEL GENERO CANDIDA MAS FRECUENTEMENTE AISLADAS DE MUESTRAS CLINICAS*.

	FERMENTACION						ASIMILACION										OTRAS PRUEBAS
	Dextrosa	Galactosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Trealosa	Dextrosa	Galactosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Celobiosa	Trealosa	Rafinosa	Inositol	D-xilosa	Tubo Germinativo
<u>C. albicans</u>	+	D	-	+	-	V	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
<u>C. parapsilosis</u>	+	V	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
<u>C. tropicalis</u>	+	+	+	+	-	D	+	+	-	+	+	V	+	-	-	+	-
<u>C. quilliermondii</u>	+	D	D	-	+	D	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
<u>C. pseudotropicalis</u>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
<u>C. stellatoidea</u>	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+

D = Débilmente positivo

V = Variable según la cepa

* TOMADO DEL LIBRO DE CONNANT (6).

CLAVE PARA GENERO

Esta clave fue tomada del Libro de Lodder, J. - -
1971 (15).

- 1 a Reproducción vegetativa exclusivamente por formación de pared cruzada sin constricción
Schizosaccharomyces
- b Reproducción vegetativa exclusivamente por células formadas por tallos.
Sterigmatomyces
- c Otras formas de reproducción vegetativa 2
- 2 a Reproducción vegetativa por gemación unipolar
Pityrosporium
- b Reproducción vegetativa por gemación bipolar 3
- c Reproducción vegetativa por gemación multilateral; micelio verdadero, arthrosporas y ballistosporas - pueden también presentarse 6
- 3 a No Fermentación de Glucosa
Schizoblastosporion
- b Fermentación de Glucosa 4
- 4 a Formación de ascosporas 5
- b No formación de ascosporas
Kloeckera
- 5 a Ascosporas en forma de gorra
Wickerhamia
- b Ascosporas esféricas, verrugosas caféas
Nadsonia

- c Ascosporas esféricas, suaves, hialinas, conjugadas en pares en el asca
Saccharomyces
- d Ascosporas de forma de sombrero o casco, o aparentemente globosas con un borde confuso no conjugado en pares
Hanseniopsis
- 6 a Formación de ballistosporas 7
b No formación de ballistosporas 9
- 7 a Presente conexiones de tipo abrazadera
Sporidiobolus
b No presente conexiones de tipo abrazadera 8
- 8 a Ballistosporas asimétricas; pigmentos carotenoides presentes
Sporobolomyces
b Ballistosporas simétricas; pigmentos carotenoides no presentes
Bullera
- 9 a Algunas células vegetativas triangulares
Trigonopsis
b Células vegetativas no triangulares 10
- 10 a Células frecuentemente ovales; fuerte producción de á. acético a partir de la glucosa; aroma característica; las céls. con corta vida en Agar de malta. 11
b Células difieren de las anteriores por una o más:

características	12
11 a Formación de ascosporas <u>Dekkera</u>	
b No formación de ascosporas <u>Brettanomyces</u>	
12 a Formación de ascosporas	13
b No formación de ascosporas	28
13 a Nitrato asimilado	14
b Nitrato no asimilado	16
14 a Ascosporas de forma de sombrero formadas en un compartimiento globoso al extremo distal del ascas de forma de tubo <u>Pachysolen</u>	
b Asca no en forma de tubo	
15 a Ascosporas esféricas con pared verrugosa <u>Citeromyces</u>	
b Ascosporas de forma de sombrero o saturno <u>Hansenula</u>	
16 a Asca es una protuberancia busiforme (como saco) sobre la célula vegetativa; esporas ligeramente ámbar. <u>Lypomyces</u>	
b Asca es diferente a la descripción anterior	17
17 a Abundante micelio verdadero y células gemantes <u>Endomycopsis</u>	

- b Micelio verdadero escaso o ausente 18
- 18 a Ascosporas en forma de aguja; una o dos esporas por asca.
Metschnikowia
- b Ascosporas fusiformes; más de 2 esporas por asca. 19
- c Ascosporas grandes, ovales o cilíndricas; crecimiento entre 30 y 40°C en un medio complejo de CO₂ gaseoso solamente; presentes en tracto digestivo de conejos y roedores.
Saccharomyces
- d Ascosporas esféricas u ovales, verrugosas con un borde ecuatorial.
Schwanniomyces
- e Ascosporas de forma diferente a las descritas anteriormente (a, b, c y d). 20
- 19 a Ascosporas con un apéndice como látigo
Nematospora
- b Ascosporas sin apéndice como látigo
Coccidiascus
- 20 a Ascas maduras se rompen fácilmente, liberando las esporas 21
- b Ascas maduras que no se rompen fácilmente 23
- 21 a Ascosporas esféricas u ovales
- b Ascosporas con forma de sombrero o saturno
Pichia
- c Ascosporas reniformes
Kluyveromyces

- 22 a Vigorosa fermentación de glucosa
Kluyveromyces
- b Fermentación de glucosa débil lenta o ausente -
Pichia
- 23 a Ascosporas esféricas u ovales
- b Ascosporas grandes, oblongas con extremos ob-
tusos
Lodderomyces
- c Ascosporas achatado-elipsoidales o lentiformes;
ligeramente cafés
Wingea
- d Ascosporas en forma de sombrero o de saturno; -
el borde puede ser muy confuso cuando se obser-
va con un microscopio de luz.
Pichia
- 24 a Vigorosa fermentación de glucosa 25
- b Fermentación de glucosa debil, lenta o ausente 26
- 25 a Rápida formación de película en extracto de -
malta
Pichia
- b No rápida formación de película en extracto de
malta
Saccharomyces
- 26 a Ascosporas lisas
Pichia
- b Ascosporas verrugosas 27

- 27 a Conjugación inmediatamente antes de la formación de asca

Debaryomyces

- b No conjugación inmediatamente antes de la formación del asca

Pichia

- 28 a Gemación multilateral en una amplia base combinada con formación de septos; no arthrosporas; no teliosporas.

Oosporidium

- b Gemación multilateral, micelio verdadero y arthrosporas no teliosporas

Trichosporon

- c Gemación multilateral, puede formarse micelio -- verdadero, no arthrosporas, pueden formarse teliosporas

29

- 29 a Células gemantes y micelio verdadero con teliosporas; conexiones de abrazadera pueden o no estar presentes; pseudomicelio presente o ausente. 30

- b Cél. gemantes; pseudomicelio, micelio verdadero o ambos pueden formarse; no teliosporas 31

- 30 a Cultivo con estrías rosadas debido a los pigmentos carotenoides; no fermentación.

Rhodospordium

- b Cultivo con estrías no pigmentadas; puede ocurrir fermentación

Leucosporidium

- 31 a Cultivo con estrías rosadas o amarillas debido a

- pigmentos carotenoides, no fermentación. 32
- b Cultivo con estrías no pigmentadas; puede ocurrir fermentación 34
- 32 a Inositol asimilado
Cryptococcus
- b Inositol no asimilado 33
- 33 a Compuestos como el almidón no formados
Rhodotorula
- b Compuestos como el almidón formados
Formas de tipo de levadura de Taphrina
- 34 a Células gemantes y pseudomicelio siempre presentes; puede formarse micelio verdadero
Candida
- b Pseudomicelio ausente o rudimentario; no micelio verdadero 35
- 35 a Inositol asimilado; no fermentación
Cryptococcus
- b Inositol no asimilado; puede ocurrir fermentación
Torulopsis.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
Número 1058/87.....

SRITA. MARTHA ANGELICA HERMOSILLO ESTRADA
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido-
aprobado el tema de Tesis "HIDROLISIS ENZIMATICA DE FRUCTA
NA DE Agave tequilana Weber" para obtener la Licenciatura-
en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido --
aceptada como Directora de Tesis la Q.F.B. Rosa María Do__
mínguez Arias.



A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Septiembre 12 de 1987

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. La Q.F.B. Rosa María Domínguez Arias, Directora de Tesis.
c.c.p. El expediente de la alumna.

mjsd.

Guadalajara, Jal Abril 5 de 1988.

C. DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

P R E S E N T E :

Apreciable Sr. Director :

Por la presente informo a Ud. que he revisado la tesis titulada " HIDROLISIS ENZIMATICA DE FRUCTANA DE AGAVE Tequilans Weber ", presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Biología Martha Angélica Herasillo Estrada. la cual apruebo para que se imprima y se someta a examen - por considerarle adecuada para ello.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E .



QFB. ROSA MA. DOMINGUEZ A.