

Caracterización de saponinas de *Agave durangensis* y *salmiana*, y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*

Tesis Doctoral:

Posgrado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología

Opción Terminal: Biotecnología Productiva

Presenta:

M. C. Elba Montserrat Alcázar Valle

Tutor: Dra. Eugenia Lugo Cervantes

Tutor en planta: Dra. Anne Christine Gschaedler Mathis

Asesor: Dr. Javier Placido Arrizon Gaviño

| | |
|---|------------|
| 5. Hipótesis..... | 43 |
| 6. Metodología..... | 45 |
| 6.1 Saponinas de <i>Agave</i> | 46 |
| 6.1.1 Material vegetal..... | 46 |
| 6.1.2 Extracción de las saponinas de <i>Agave</i> | 46 |
| 6.1.3 Identificación de las saponinas de <i>Agave</i> | 46 |
| 6.2 Microorganismos..... | 47 |
| 6.2.1 Condiciones de inoculación..... | 47 |
| 6.3 Cultivo en batch..... | 48 |
| 6.3.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)..... | 48 |
| 6.3.2 Cinéticas de crecimiento: determinación de la tasa de dilución..... | 48 |
| 6.3.2.1 Población celular..... | 49 |
| 6.3.2.2 Azúcares reductores..... | 49 |
| 6.4 Cinéticas en cultivo en continuo..... | 50 |
| 6.4.1 Perfil de carbohidratos en la pared celular..... | 51 |
| 6.4.2 Perfil de lípidos en la membrana celular..... | 53 |
| 6.4.3 Actividad enzimática..... | 54 |
| 6.5 Análisis estadístico..... | 54 |
| 7. Resultados y Discusión..... | 56 |
| 7.1 Extracción de las saponinas..... | 56 |
| 7.2 Caracterización de las saponinas..... | 57 |
| 7.3 Cinéticas de crecimiento en cultivo batch..... | 61 |
| 7.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las levaduras..... | 69 |
| 7.5 Cultivo en continuo..... | 73 |
| 7.5.1 Composición de la pared celular..... | 78 |
| 7.5.2 Actividad saponinasa..... | 82 |
| 7.5.3 Composición de la membrana celular..... | 84 |
| 8. Conclusiones..... | 90 |
| 9. Perspectivas..... | 91 |
| 10. Referencias..... | 93 |
| 11. Anexos..... | 115 |

| | |
|--|-----|
| Anexo 1. Masa-carga (m/z) de las saponinas esteroideas identificadas hasta el momento por espectrometría de masas..... | 115 |
| Anexo 2. Cinéticas de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> , con diferentes concentraciones de azúcares iniciales (a) 10 g L ⁻¹ , (b) 20 g L ⁻¹ , (c) 30 g L ⁻¹ y (d) 40 g L ⁻¹ | 144 |
| Anexo 3. Modelo esquemático del mecanismo molecular de las saponinas de agave en la pared y membrana celular de las levaduras..... | 145 |
| Anexo 4. Composición de la membrana celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> al adicionar los pulsos de los extractos de saponinas de <i>Agave durangensis</i> y <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 146 |
| Anexo 5. Actividades complementarias..... | 150 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| 2.1 Algunas especies relevantes de los agaves en la actualidad..... | 6 |
| 2.2 Algunas especies de <i>Agave</i> “mezcaleros”, su manejo y distribución..... | 8 |
| 2.3 Estudios recientes de las actividades bioactivas de las saponinas..... | 14 |
| 2.4 Saponinas identificadas en algunas especies de <i>Agave</i> por RMN..... | 18 |
| 2.5 Macromoléculas de la pared celular (en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)..... | 29 |
| 2.6 Algunos estudios que emplean el cultivo en continuo..... | 38 |
| 7.1 Concentraciones de extracto de saponinas de <i>Agave durangensis</i> y <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 56 |
| 7.2 Moléculas de saponinas y agliconas identificadas por MALDI-TOF en <i>A. durangensis</i> y <i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 59 |
| 7.3 Velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) y tasa de dilución (D) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 64 |

| | |
|---|----|
| 7.4 Rendimientos de biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> en función del consumo de sustrato ($Y_{x/s}$) transcurridas 12 horas de crecimiento, adicionando diferentes concentraciones (0.75, 1.5 y 3.0 mg mL ⁻¹) de extracto de saponinas de <i>Agave durangensis</i> y <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 68 |
| 7.5 Relación de los polisacáridos de la pared celular sin saponinas (control), 10 minutos después de haber realizado los pulsos de los extractos de saponinas de <i>Agave durangensis</i> y <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> y al final de los cultivos en continuo..... | 81 |
| 7.6 <i>P-values</i> obtenidos del análisis de varianza de las cepas de levadura, la especie de <i>Agave</i> , la concentración de extracto y la interacción entre ellos: AB (levadura-agave), AC (levadura-concentración de extracto) y BC (<i>Agave</i> -concentración de extracto), de cómo afectan la concentración de los β -glucanos y mananos en la pared celular..... | 82 |
| 7.7 Conformación de lípidos de la membrana celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> 10 después de adicionar los pulsos (0.75 y 3.0 mg mL ⁻¹) de extracto de saponinas de <i>Agave durangensis</i> y <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 88 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| 2.1 <i>Agave durangensis</i> , distancia genética entre las poblaciones del estado de Durango: Sierra de Registro, El Venado y Temoaya..... | 10 |
| 2.2 <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> distancia genética entre las poblaciones del estado de San Luis Potosí: El Cuervo (EC), Ipiña (IP), Aquiles Serdán (LS)..... | 11 |
| 2.3 Síntesis de saponinas esteroidales en plantas..... | 13 |
| 2.4 Estructura de saponinas de <i>Agave</i> (a) espirostano y (b) furostano..... | 17 |
| 2.5 Efecto de las saponinas en la membrana celular..... | 23 |
| 2.6 Síntesis y estructura de la pared celular en la levadura..... | 31 |
| 2.7 Imagen de microscopia electrónica de la pared y membrana celular, y la estructura de la membrana celular..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 2.8 Síntesis de fosfolípidos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 34 |
| 2.9 Esquema del cultivo en continuo (<i>chemostat</i>)..... | 36 |
| 6.1 Diagrama global de la metodología..... | 45 |
| 6.2 Diagrama de flujo para la extracción de los componentes de la pared celular..... | 52 |
| 7.1 Espectros de masas de las saponinas (a) <i>Agave cantala</i> saponin N y (b) Agavoside A y Agavoside B, detectadas en el extracto de saponinas de <i>Agave durangensis</i> | 58 |
| 7.2 Espectros de masas de (a) gentrogenina, (b) manogenina y (c) Agavoside A, detectadas en el extracto de saponinas de <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 60 |
| 7.3 Velocidades máximas de crecimiento en matraz de (a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y (b) <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 63 |
| 7.4 Población celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> en cultivo batch obtenida a las 12 horas de expuestos con diferentes concentraciones de extracto de saponinas de (a) <i>Agave durangensis</i> y (b) <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 65 |
| 7.5 Biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> en cultivo batch obtenida a las 12 horas de expuestos con diferentes concentraciones de extracto de saponinas de (a) <i>Agave durangensis</i> y (b) <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 67 |
| 7.6 Análisis de microscopía electrónica de barrido de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (a) sin adicionar extracto de saponinas; (b) 10 minutos y (c) 30 minutos después de agregar 3 mg mL ⁻¹ de extracto de saponinas de <i>A. durangensis</i> ; (d) 10 minutos y (e) 30 minutos después de agregar 3 mg mL ⁻¹ de extracto de saponinas de <i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 70 |
| 7.7 Análisis de microscopía electrónica de barrido de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (a) sin adicionar extracto de saponinas; (b) 10 minutos y (c) 30 minutos después de agregar 3 mg mL ⁻¹ de extracto de saponinas de <i>A. durangensis</i> ; (d) 10 minutos y (e) 30 minutos después de agregar 3 mg mL ⁻¹ de extracto de saponinas de <i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 72 |
| 7.8 Cultivo en continuo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; (a) <i>Agave durangensis</i> y (b) <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 75 |

| | |
|--|----|
| 7.9 Cultivo en continuo de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ; (a) <i>Agave durangensis</i> y (b) <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 77 |
| 7.10 Concentración de los polisacáridos de la pared celular, 1, 3 β–glucanos, 1, 6 β–glucanos y mananos (mg sobre g de biomasa) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 10 minutos después de haber aplicado los pulsos de (a) <i>Agave durangensis</i> y (b) <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> y en <i>Kluyveromyces marxianus</i> 10 minutos después de haber aplicado los pulsos de (c) <i>Agave durangensis</i> y (d) <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 80 |
| 7.11 Concentración de mananos (mg sobre g de biomasa) y actividad saponinasa ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 10 minutos después de haber aplicado los pulsos de (a) <i>Agave durangensis</i> y (b) <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> y en <i>Kluyveromyces marxianus</i> 10 minutos después de haber aplicado los pulsos de (c) <i>Agave durangensis</i> y (d) <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 84 |
| 7.12 Cromatograma y espectro de masas (UPLC Q TOF MS/MS) de <i>Kluyveromyces marxianus</i> al adicionar el extracto de saponinas de <i>Agave durangensis</i> (0.75 mg mL^{-1})..... | 86 |

Agradecimientos

¡Hay personas a quien damos las gracias, tan solo por cruzarse en nuestro camino!

Fiódor Dostoievski

Todos los días tenemos algo porque agradecerle a Dios, y en estas líneas me gustaría agradecerle por todas las bendiciones recibidas, por poner en mi camino a tantas personas que estuvieron y están presentes a lo largo de ella.

En esta etapa que concluyo, quisiera agradecer primeramente a mis papás, a mi hermano y a mis tías, por todo su amor, paciencia y apoyo que me brindaron y me siguen brindando en cada proyecto que emprendo.

A la Dra. Eugenia, Dra. Anne, y al Dr. Javier por sus consejos, enseñanzas y por su confianza en mí para desarrollar este proyecto que me permitió crecer y madurar no solo como investigadora sino también como persona.

Al Dr. Fiehn y Dr. Tobías por permitirme trabajar en su laboratorio y conocer otros horizontes y perspectivas en la investigación.

A la Dra. Paty, Dra. Lorena, Dra. Adriana y al Dr. Rogelio por su valiosa escucha y atención a este proyecto que concluye.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por su cariño, apoyo, consejos y comprensión, pero más que nada por su sincera amistad y por permitirme ser parte de su vida.

Agradezco, a CONACYT por la beca recibida y a CIATEJ por ser parte de mi formación.

No me queda más que decir, que no estaría aquí si no fuera por cada uno de ellos, por lo cual solo me queda decir:

¡Muchas gracias!

Abreviaciones

| Abreviación | Significado |
|--------------------|--|
| CRT | Consejo Regulador del Tequila |
| COMERCAM | Consejo Regulador de la Calidad del Mezcal |
| CRM | Consejo Regulador del Mezcal |
| ACE | Extracción acelerada de solventes |
| TLC | Cromatografía en capa fina |
| IR | Infrarojo |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta presión |
| UV | Ultravioleta |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| MS | Espectrometría de Masas |
| ESI | Electrospray |
| FAB | Bombardamiento rápido de haz atómico |
| MALDI | Desorción láser asistida por una matriz |
| TOF | Tiempo de vuelo |
| QTOF- MS/MS | Espectrometría con cuadrupolo y tiempo de vuelo |
| MALDI-TOF | Espectrometría con desorción láser asistida por una matriz y tiempo de vuelo |
| SEM | Microscopía Electrónica de Barrido |
| RID | Índice de refracción |
| DHB | 2,5-dihidroxibenzoico |
| DNS | Ácido 3,5-dinitrosalicílico |
| MTBE | Metil-terbutil-éter |
| PBS | Buffer de fosfatos |
| CWI | Ruta de integridad de la pared celular |
| ER | Retículo endoplásmico |
| PE | Fosfatidietanolamina |
| PI | Fosfatidilinositol |

| | |
|----------------------|---|
| PS | Fosfatidilserina |
| PC | Fosfatidilcolina |
| PA | Ácido Fosfatidico |
| CDP-DAG | Citidina Difosfato de Diagilglicerol |
| LPC | Monoacylglicerofosfocolinas |
| DG | Diacilglicerol |
| ssp. | Subespecie |
| Var | Variedad |
| $Y_{x/s}$ | Rendimiento de la producción de biomasa en función del sustrato consumido |
| D | Tasa de dilución |
| μ | Velocidad especifica de crecimiento |
| $\mu_{\text{máx.}}$ | Velocidad máxima de crecimiento |
| cm | Centímetros |
| Da | Daltones |
| nm | Nanómetros |
| Kg | Kilogramos |
| °C | Grados Celsius |
| mBar | Milibar |
| ppm | Partes por millón |
| μL | Micro litros |
| mL | Mililitros |
| v/v | Volumen/volumen |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| g L^{-1} | Gamos por litro |
| cel mL^{-1} | Células por mililitro |
| mg mL^{-1} | Miligramos por mililitro |
| min | Minutos |
| L | Litros |
| vvm | Volumen de aire por volumen de líquido desplazado por minuto |

| | |
|--|---------------------------------|
| mm | Milímetro |
| g | Gramos |
| mL s ⁻¹ | Mililitro por segundo |
| M | Molar (molaridad) |
| x g | Fuerza g |
| h | Horas |
| mL min ⁻¹ | Mililitros por minuto |
| μmol L ⁻¹ min ⁻¹ | Micro mol por litro por minuto |
| p/v | Peso/volumen |
| AR5 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SLP1 | <i>Kluyveromyces marxianus</i> |

Resumen

Las saponinas esteroidales presentes en los agaves son metabolitos secundarios involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas contra el ataque de hongos, bacterias, levaduras y algunos insectos. En los procesos de fermentación de las bebidas de agave, las saponinas inhiben el crecimiento de algunas levaduras, ocasionando una reducción en los rendimientos de producción. Estos mecanismos de inhibición no están del todo entendidos, sólo algunos estudios se han realizado con los esteroides de la membrana celular. Además, existe poca información acerca del efecto de las saponinas en los polisacáridos de la pared celular y los fosfolípidos de la membrana celular de las levaduras.

Por lo tanto, el principal objetivo del presente trabajo fue caracterizar las saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, y estudiar su efecto en la pared y la membrana celular de dos levaduras fermentativas una *Saccharomyces cerevisiae* y otra *Kluyveromyces marxianus* aisladas de los procesos de fermentación de las bebidas de agave.

Se identificó la presencia de tres tipos de saponinas en *Agave durangensis* y una más en *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, que se han reportado en otras especies de agave. Además, en el extracto de *A. salmiana* se identificaron dos agliconas (manogenina y gentrogenina) de carácter esterooidal unidas a una serie de cadenas de azúcares que posiblemente puedan ser dos nuevas estructuras de saponinas que no se han reportadas hasta el momento.

Este estudio se desarrolló en cultivos batch y continuo adicionando diferentes concentraciones (0.75, 1.5 y 3 mg mL⁻¹) de extracto de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*. En donde el extracto de *A. durangensis* mostró un mayor efecto inhibitorio que el *A. salmiana* en ambas especies de levadura.

Se observó que la composición de la pared celular muestra cambios específicamente en la relación β -glucanos/ mananos, que fueron confirmadas con imágenes de microscopia de ambas especies de levadura, y también que los fosfolípidos de membrana celular se ven afectados con la reducción de las cadenas de acilo y la insaturación de las mismas, cuando ambas levaduras interactúan con los extractos de saponinas de ambas especies de agave. Finalmente, se observó una mayor resistencia al efecto inhibitorio de las saponinas por parte de *K. marxianus* ya que esta presentó actividad saponinasa, capaz de hidrolizar las saponinas en ambos extractos.

Introducción

Profundizar en el conocimiento científico es una de las mejores vías para lograr plenitud y libertad

Pilar Alvarez Pellicero

1. Introducción

En México se producen diferentes bebidas alcohólicas obtenidas de la fermentación de diferentes especies de agave. La bebida más conocida es el tequila que se obtiene al fermentar el jugo de *A. tequilana* Weber variedad azul (Arrizon y col. 2006). De acuerdo al Consejo Regulador del Tequila (CRT; <https://www.crt.org.mx>) el periodo de enero a marzo del 2015 la producción total de tequila fue de aproximadamente 56.6 millones de litros y las exportaciones de esta bebida de agave registraron un crecimiento del 17.7%, siendo los países de mayor demanda Estados Unidos, Francia y España. Sin embargo, en los últimos años otra bebida de agave que ha tenido un crecimiento en su producción y demanda es el mezcal. El Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM; <http://www.crm.org.mx/>) reporta que en el 2013 se presentó un crecimiento del 140% (2.5 millones de litros) en la producción de mezcal en comparación con el año anterior, y además los principales países a los que se exportó esta bebida en el 2013 fueron Estados Unidos, Australia, Chile, Reino Unido y Alemania.

El mezcal es una bebida destilada que ha sido protegida por una denominación de origen. De acuerdo con esta el mezcal puede ser producido a partir de diferentes especies de *Agave*, por lo que los productores mexicanos pueden usar los recursos disponibles en sus regiones (Martínez-Aguilar y Peña-Alvarez 2009). La producción del mezcal inicia con la cosecha de las cabezas maduras de agave también conocidas como “piñas”. Estas normalmente son cocidas en hornos en el piso, posteriormente son molidas en una “taona” para obtener el jugo que se deja fermentar y finalmente destilar (Lappe-Oliveras y col. 2008; Narváez-Zapata y Sánchez-Teyer 2009).

La fermentación en la producción de mezcal, inicia espontáneamente dando lugar a un amplio espectro de microorganismos. Durante la fermentación, estos microorganismos consumen los azúcares (fructosa y glucosa, principalmente) y otros compuestos (micronutrientes) como sustratos para el crecimiento, producción de etanol, dióxido de carbono y compuestos volátiles (esteres, alcoholes superiores, aldehídos) que contribuyen a la composición y las cualidades organolépticas del mezcal. Por lo tanto, el proceso fermentativo es crucial para la industria del mezcal (Arrizon y col. 2006; Arroyo-López y col. 2009; Arellano y col. 2008; Escalante-Minakata y col. 2009).

Es importante mencionar que, en el caso particular de los procesos de fermentación de bebidas de *Agave*. Se reporta que las levaduras aisladas en vino tienen bajos rendimientos en la producción de etanol y compuestos volátiles al fermentar el jugo de *Agave tequilana* (Arrizon y col. 2006).

Además, el primer estudio que se realizó, para conocer el proceso de elaboración de las bebidas de *Agave*, fue el de Lachance en 1995 con el objetivo de conocer las especies de microorganismos presentes en la producción de tequila. En este estudio se encontró que en el proceso de fermentación las levaduras dominantes son *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida milleri* y *Brettanomyces anomalus*, mientras que las especies de levadura secundarias en el proceso de fermentación fueron: *Brettanomyces bruxellensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora vineae*, *Pichia membranaefaciens*, *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus* (Lachance 1995). En lo que se refiere a la producción del mezcal, las especies de levadura que se identificaron en los procesos de fermentación empleando como materia prima el jugo de *Agave salmiana* fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitaniae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida ethanolica*, *Saccharomyces exiguus*, *Pichia fermentans*, *Candida lusitaniae* (Escalante-Minakata y col. 2008; Verdugo y col. 2011). En donde las levaduras non-*Saccharomyces* predominantes, encontradas son: *Kluyveromyces* spp., *Zygosaccharomyces* spp. y *Torulaspota* spp. (Verdugo y col. 2011). De hecho, la especie de levadura *Kluyveromyces marxianus* parece estar estrechamente relacionada con las fermentaciones que se llevan a cabo con agaves como materia prima (Pérez-Brito y col. 2007; Lappe-Oliveras y col. 2008).

Además, en cuanto a la producción de etanol y compuestos volátiles, algunos estudios recientes han demostrado que cepas de *Kluyveromyces marxianus* son capaces de fermentar el jugo de *Agave tequilana* produciendo una mayor concentración de compuestos volátiles y rendimientos superiores de etanol en comparación con *Saccharomyces cerevisiae* (Lopez-Alvarez y col. 2012; Segura-García y col. 2015). No obstante, las fermentaciones con *A. tequilana* presentan una mayor diversidad de levaduras que las fermentaciones con *Agave salmiana*. Esto se puede deber a que el *A. salmiana* contienen altas concentraciones de saponinas (Zamora y col. 2010), y se conoce que estas moléculas son inhibidoras de algunas especies de microorganismos (Miyakoshi y col. 2000). Lo anterior, origina que los procesos de fermentación sean diferentes en la producción de etanol y compuestos volátiles, particularmente en la producción de mezcal en San Luis Potosí y en Durango (Cira y col. 2008; Zamora y col. 2010; Gonzalez-Valdez y col. 2013; Barraza-Soto y col. 2014). Por lo tanto, es necesario conocer cuales estructuras de saponinas están presentes en las especies de agave empleadas como materia prima para la producción de las bebidas de agave y su

interacción con las levaduras presentes en los procesos de fermentación, con el fin implementar mejoras en los procesos de producción de estas bebidas de agave.

Antecedentes

La motivación nos impulsa a comenzar y el hábito nos permite continuar

Jim Ryun

2. Antecedentes

Antes de que el maíz fuera cultivado o domesticado, los agaves eran la principal fuente de carbohidrato para las poblaciones en las que hoy es el noroeste y noreste de México y suroeste de Estados Unidos (Zizumbo-Villareal y col. 2009). La historia de la diversificación de este cultivo puede dividirse en tres periodos (Colunga-García Marín y col. 2007):

1. Como alimento (aproximadamente 11,000 años antes de nuestra era). En este periodo el *Agave* también era utilizado para la elaboración de bebidas, jarabes, vestidos, bálsamos para tratar heridas, entre otras cosas.
2. En la elaboración de bebidas fermentadas.
3. En la elaboración de bebidas destiladas, con la introducción del proceso de destilación filipino por los españoles. Esta etapa comenzó a finales del siglo XVI y ha registrado un importante crecimiento comercial en los últimos 50 años.

En la actualidad los agaves son utilizados principalmente como materia prima para la producción de bebidas alcohólicas destiladas como lo son el tequila, el mezcal, el sotol y el bacanora (Lappe-Oliveras y col. 2008), y para la obtención de fructo-oligosacaridos que actúan como prebióticos y fibras dietéticas, ayudando a la función intestinal, digestión y estimulación del sistema inmune (López y col. 2003; Ávila-Fernández y col. 2011). Además, en las últimas décadas se ha impulsado el estudio del uso de algunas especies de *Agave* como posible materia prima para la elaboración de bio-combustibles, así como en la elaboración de compuestos bio-activos y para la bio-remediación de suelos (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Algunas aplicaciones relevantes de los agaves en la actualidad

| Usos | Especie de <i>Agave</i> | Referencias |
|-------------------------------|--|---------------------------|
| | <i>Agave angustifolia</i> , <i>Agave</i> | Buenrostro y col. 2010 |
| Como alimento (fibra) y | <i>potatorum</i> , <i>Agave cupreata</i> , | Narváez-Zapata 2010 |
| bebidas (mezcal, tequila, | <i>Agave durangensis</i> , <i>Agave</i> | Lopez-Alvarez y col. 2012 |
| bacanora, pulque, agua miel). | <i>pacifica</i> , <i>Agave salmiana</i> , | Sáyago-Ayerdi y col. 2014 |
| | <i>Agave tequilana</i> | Zamora-Gasga y col. 2014 |

Tabla 2.1 Algunas aplicaciones relevantes de los agaves en la actualidad (continuación)

| Usos | Especie de <i>Agave</i> | Referencias |
|--|---|-------------------------------|
| Fuente de prebióticos y compuestos bio-activos | <i>Agave rzedowskiana</i> , <i>Agave</i> | Arrizon y col. 2010 |
| | <i>ornithobroma</i> , <i>Agave</i> | Ávila-Fernandez y col. 2011 |
| | <i>impressa</i> , <i>Agave schidigera</i> , | Ahumada-Santos y col. 2013 |
| | <i>Agave angustifolia</i> , <i>Agave</i> | Allsopp y col. 2013 |
| | <i>tequilana</i> , <i>Agave salmiana</i> | Moreno-Vilet y col. 2014 |
| Potencial uso biotecnológico como bio-combustibles y bio-remediación | <i>Agave salmiana</i> , <i>Agave</i> | Davis y col. 2011 |
| | <i>sisalana</i> , <i>Agave tequilana</i> , | dos Santos y col. 2011 |
| | <i>Agave fourcroydes</i> , <i>Agave</i> | Holtum y col. 2011 |
| | <i>mapisaga</i> , <i>Agave foetida</i> , | Velázquez-Jimenez y col. 2013 |
| | <i>Agave lechuguilla</i> , <i>Agave</i> | Caspeta y col. 2014 |
| | <i>cantala</i> , <i>Agave letonae</i> ,, <i>Agave angustifolia</i> | Yang y col. 2015 |

2.1 *Agave*

El género *Agave* pertenece a la familia de las *Agavaceae* que es endémica del continente Americano cuenta con 200 especies, de las cuales 150 se encuentran en México, es decir el 75% del total. Sólo 116 especies son endémicas o exclusivas de nuestro territorio, de los cuales alrededor de 15 especies de agaves son considerados como “agaves mezcaleros” (tabla 2.2), distribuyéndose en 24 estados de la República Mexicana. No obstante, el *Agave* también se cultiva en el sur de los Estados Unidos, Kenia, Tanzania y existe un interés reciente en producir agaves en Australia (Nava-Cruz y col. 2015).

Tabla 2.2 Algunas especies de *Agave* “mezcaleros” su manejo y distribución (Aguirre y col. 2005)

| Nombres comunes | Nombre científico | Manejo | Distribución |
|--|--|---|---|
| yavi incoyo (mixteco), chelem (maya), hamoc (seri), amole, bacanora, zapupe, espadín, espadilla | <i>Agave angustifolia</i> | Se cultiva de manera intensiva en Oaxaca. En Sonora, es la materia prima para el bacanora, que se basa en poblaciones silvestres y cultivos | Crece en muy variados tipos de vegetación, de Sonora hasta Yucatán. Es el maguey de más amplia distribución en México. Planicies áridas y Sierra Madre Occidental, en Durango y Zacatecas |
| Cenizo | <i>Agave durangensis</i> | Silvestre | Matorrales y pastizales de la Meseta Central, particularmente en el altiplano potosino-zacatecano. En las áreas productoras de tequila: Jalisco, Michoacán, Guanajuato y Tamaulipas. |
| bronco, cimarrón, chino, liso, manso, verde | <i>Agave salmiana</i> <i>ssp. crassispina</i> | Silvestre, con manejo; se recuperan y plantan los hijuelos en sus áreas de distribución natural | Oaxaca |
| según la variedad: azul, bermejo, chato, chino, mano larga, moraleño, pie de mula | <i>Agave tequilana</i> | Exclusivamente cultivado, con base en hijuelos y cultivo <i>in vitro</i> . No existe en condiciones silvestres. | |
| dua-bzog (zapoteco), arroqueño, blanco, castilla, de coyote, de rayo, xolo. | <i>Agave americana</i> var. <i>oaxacensis</i> | Domesticado. La variedad <i>oaxacensis</i> de la especie <i>A. americana</i> se conoce sólo asociada al hombre. | |

Es importante mencionar que el número, identidad y distribución de todos los agaves de México no se conoce con precisión (Aguirre y col. 2005; Zizumbo-Villarreal y Colunga-García Marín 2008; Torres-Morán y col. 2008).

Algunas de las especies de agave que son importantes desde el punto de vista económico ya que se utilizan como materia prima para la elaboración de productos (fibra, bebidas, prebióticos) son: *Agave tequilana* Weber var. azul, *Agave angustifolia*, *Agave cupreata*, *Agave potatorum*, *Agave*

americana, *Agave karwinskii*, *Agave utahensis*, *Agave vilmoriniana*, *Agave deserti*, *Agave fourcroydes*, *Agave sisalana*, *Agave lechuguilla*, *Agave salmiana* y *Agave durangensis* (Almaraz-Abarca y col. 2013; Nava-Cruz y col. 2015).

Muchas de estas especies producen semillas re-calcitrantes o no-viables, y como consecuencia son propagados principalmente de manera asexual. Por lo que se ha reducido la diversidad genética, teniendo como desventaja ser sujetas a un mayor número de enfermedades y plagas de insectos. Esta falta de diversidad genética ha causado, por ejemplo problemas para el cultivo de *A. tequilana* Weber variedad azul. Además otros agaves están amenazados por la extinción como es el caso del *Agave victoriae-reginae*. Por lo tanto, la falta de métodos convencionales eficientes para la propagación de *Agaves* han causado el uso directo de poblaciones salvajes sin remplazarlas en sus ambientes naturales reduciendo en números las especies de *Agave* en México, como es el caso del *A. durangensis* en Durango, *A. salmiana* ssp. *crassispina* en Zacatecas, San Luis Potosí y Guanajuato (Ramírez-Malagón y col. 2008).

La investigación aplicada en las plantas de agave durante las décadas pasadas ha tenido un énfasis ampliamente básico. La investigación comercial ha sido conducida esencialmente para optimizar procesos antiguos y recientemente en el desarrollo de nuevas y prometedoras tecnologías para el uso específico de biomoléculas de estas plantas desérticas. Existen considerables oportunidades de desarrollo que proveen una posición económica a futuro importante para el *Agave* (Narváez-Zapata y Sánchez-Teyer 2009). En este contexto, el comercio del mezcal se ha incrementado considerablemente. De acuerdo con el Consejo Regulador del Mezcal (CRM o COMERCAM) en los últimos tres años las exportaciones del mezcal crecieron 79%. Siendo estado de Oaxaca el que realiza la mayor parte de las exportaciones. Teniendo como marcas destacadas Los Danzantes, Maestro Mezcalero, Alipús, Alacrán y 7 Misterios (<http://www.elfinanciero.com.mx>). Por lo tanto, el *A. angustifolia* del estado de Oaxaca es probablemente la materia prima mejor conocida para el mezcal. Aunque también se emplean otras especies de *Agave* en la elaboración de esta bebida, por ejemplo: el *A. cupreata* en Guerrero, el *A. salmiana* es ampliamente usado en San Luis Potosí y Zacatecas, y el *A. durangensis* en Durango (Narváez-Zapata y Sánchez-Teyer 2009).

2.1.1 *Agave durangensis*

En Durango se encuentran 24 especies del género *Agave*, siendo el *Agave durangensis* (figura 2.1) una de las más importantes debido, a como ya lo hemos mencionado, mantiene la industria del mezcal en esa entidad (Almaraz-Abarca y col. 2009).

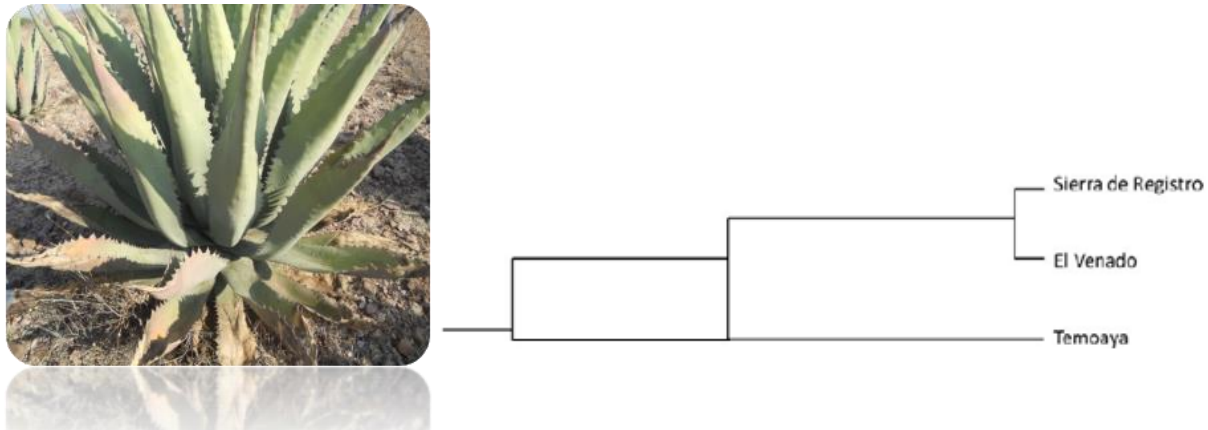


Figura 2.1 *Agave durangensis*, distancia genética entre tres poblaciones del estado de Durango: Sierra de Registro, El Venado y Temoaya (Almaraz-Abarca y col. 2013).

La descripción de algunas estructuras somáticas para esta especie dada por Gentry incluye: pertenece a la sección *Ditepalae*, subgénero *Agave*, presenta rosetas de 80-120 cm de alto, 120-180 cm de ancho, hojas de 40-90 por 14-22 cm, espina fuerte de 4-6 cm de largo. Algunos autores consideran al *A. durangensis* como una especie compleja en lugar de una especie taxonómicamente definida, debido a la ausencia de una relación particularmente cercana con otros miembros de la sección *Ditepalae*. Además raramente hay flores disponibles, que son las estructuras con una mayor relevancia taxonómica (Almaraz-Abarca y col. 2013).

2.1.2 *Agave salmiana*

El *A. salmiana* puede producir 44 toneladas de biomasa por hectárea por año, lo que lo hace comparado con otros agaves, una especie altamente productiva. Esta productividad aunada al hecho de su alto potencial de crecimiento en altas temperaturas hace que el *A. salmiana* este bien posicionado para enfrentar los retos del cambio climático. Taxonómicamente sólo se reconocen tres variedades y una subespecie del *Agave salmiana*: *A. salmiana* variedad *salmiana*, *A. salmiana*

var. *angustifolia*, *A. salmiana* var. *ferox* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* (Ramírez-Higuera 2009; Martínez Salvador y col. 2012).

El *A. salmiana* ssp. *crassispina* (figura 2.2) ha sido empleado en la industria del mezcal en el altiplano Potosino-Zacatecano desde tiempos coloniales. Sus características morfológicas son: roseta de 150 cm alto, 200 cm de ancho, hojas lanceoladas y gruesas con espinas grandes y anchas, coloración de verde a verde oscuro, inflorescencia hasta los 800 cm de alto, flores amarillo-verdosas (Lara-Ávila 2005).

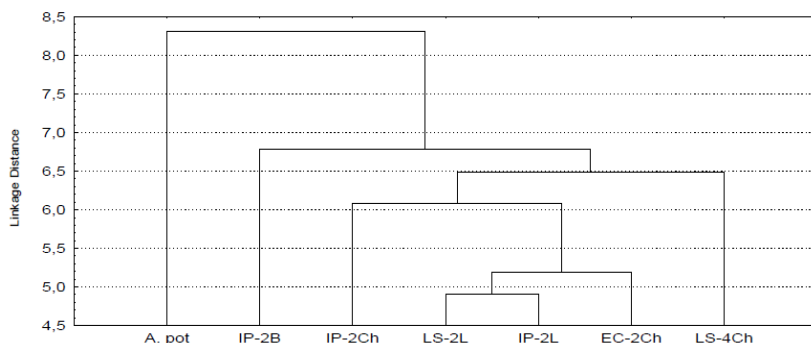


Figura 2.2. *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, distancia genética entre tres poblaciones del estado de San Luis Potosí: El Cuervo (EC), Ipiña (IP), Aquiles Serdán (LS) (Lara-Ávila 2005).

La reproducción más común del *A. salmiana* ssp. *crassispina* es a partir de un rizoma (hijuelo), que emerge a cierta distancia de la base de la planta, el cual dará lugar a otro individuo, desde su primer año la planta genera de 8 a 15 hijuelos (Lara-Ávila 2005).

Finalmente, aunque a simple vista la morfología de los agaves parece ser la misma, su composición fitoquímica es compleja y variable, siendo el *Agave ornithobroma* una de las especies de *Agave* con mayor diversidad de fitoquímicos (Ahumada-Santos y col. 2013).

Dentro de los metabolitos secundarios que forman parte del *Agave* podemos encontrar: fructanos, triterpenos, esteroides, taninos, cumarinas volátiles, flavonoides, alcaloides y saponinas esteroidales, (López y col. 2003; Nava-Cruz y col. 2015; Peña-Alvarez y col. 2004; Yokosuka y Mimaki 2009).

2.2 Saponinas

Las saponinas son metabolitos glicosilados de alto peso molecular, utilizados por las plantas como mecanismo de defensa contra el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias. Su presencia ha sido reportada en más de 100 familias de plantas. También se han reportado en animales marinos, como en *Phylum Echinodermata* y particularmente en especies de la clase *Holothuroidea* y *Asteroidea* (Oleszek y Bialy 2006; Cira y col. 2008).

Su estructura consta de una parte glúcídica que pueden ser cadenas de glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa, y una parte no glúcídica denominada sapogenina o aglicona, que puede ser de naturaleza triterpénica o esteroideal. La clasificación de las saponinas se hace según la naturaleza de la aglicona. Así se distinguen entre saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales. Algunos autores dividen a las saponinas en un tercer grupo denominando aminas esteroidales o alcaloides esteroidales (Sparg y col. 2004). Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en las plantas monocotiledóneas, las cuales pertenecen a los géneros *Liliaceae*, *Dioscoreaceae* y *Agavaceae* (Guclu-Ustundang y Mazza 2007; Martínez-Martínez 2001).

Su síntesis en plantas es por la ruta del acetyl-CoA vía ácido mavalónico y escualeno. En donde una vez formado un precursor esteroide con 27 átomos de carbono, este es deshidrogenado para originar 3-colestona. La colestona es hidroxilada en los carbonos 16, 22 y 27. Este compuesto intermediario al ser altamente hidroxilado en la cadena lateral, puede sufrir una deshidratación en los hidroxilos unidos a los carbonos 16 y 22, lo que origina la 3-furestanona; o también puede sufrir además otra deshidratación entre los hidroxilos restantes de las posiciones 22 y 27, lo que da lugar al anillo de espirostanona propiamente dicho. La 3-espirostanona puede ser reducida a 3-espirostanol, el cual puede sufrir procesos enzimáticos de glicosilación para originar las saponinas esteroidales (Yang y col. 2014; figura 2.3).

Aunque algunos autores también sugieren que las agliconas (sapogeninas) esteroidales se pueden producir a partir de los esteroides de las plantas seguidas por una oxidación en los carbonos C-16, C-22, C-27, seguido por el cierre del anillo, debido a que se ha observado que en las especies de *Agave* y *Dioscoreaceae* cuando la concentración de esteroides es alta la concentración de sapogenina es baja y viceversa (Heftmann 1963).

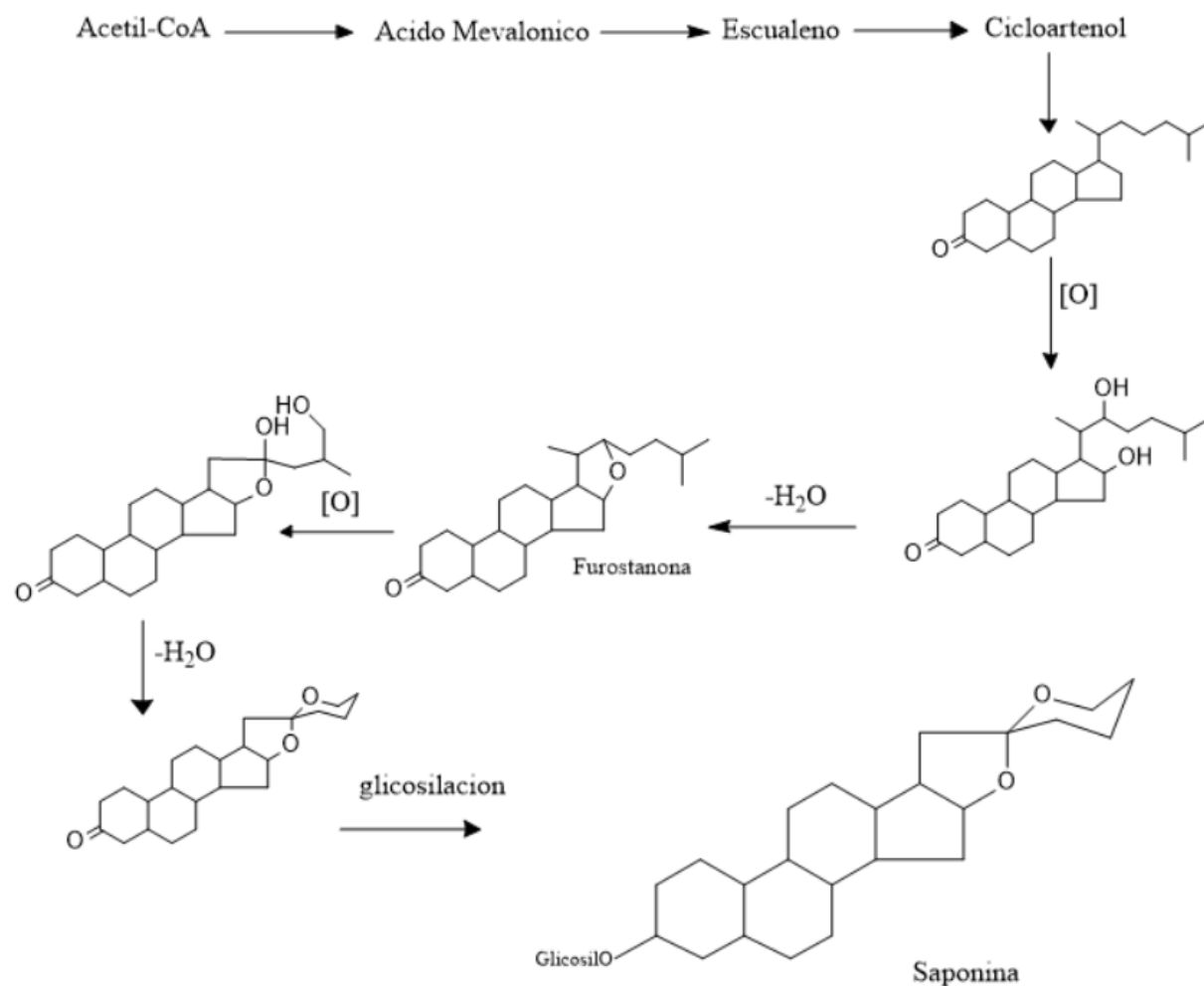


Figura 2.3 Síntesis de saponinas esteroidales en plantas (Martínez-Martínez 2001)

Anteriormente las saponinas se empleaban como detergentes debido a su naturaleza anfifílica con la presencia de una aglicona (sapogenina) lipo-soluble y cadenas de azúcares solubles en agua. No obstante, el descubrimiento de que las saponinas poseen un amplio rango de actividad bioactiva, como lo es su actividad anti-insectos, anti-hongos, anti-viral, anti-levadura, anti-cáncer, antitumoral, entre otras (tabla 2.3). No solo limitó su uso tradicional, sino que se comenzó a buscar aplicaciones principalmente en la industria farmacéutica (Coleman y col. 2010; Chapagain y col. 2007; Chen y col. 2010; Choi y col. 2015; Guclu-Ustundang y Mazza 2007).

Tabla 2.3 Estudios recientes de las actividades bioactivas de las saponinas.

| Tipo de saponina | Especies de plantas | Actividad | Referencias | |
|--------------------------------|---|------------------|---|------------------------------|
| Triterpenica | <i>Aesculus californica</i> , <i>Camellia oleifera</i> | Citotóxica | Altunkeyik y col. 2012 | |
| | C. Abel | | Boutaghane y col. 2013 | |
| | <i>Gypsophila trichotoma</i> Wender | | Voutquenne y col. 2013 | |
| | var. <i>trichotoma</i> , | | Yuan y col. 2013 | |
| | <i>Genista ulicina</i> , | | Melek y col. 2014 | |
| | <i>Cyclamen hederifolium</i> , | | Zhou y col. 2014 | |
| | <i>Gleditsia caspica</i> | | Wu y col. 2015 | |
| | Deft. | | | |
| | <i>Microsechium helleri</i> , <i>Sicyos bulbosus</i> | | Anti-insectos Nematicida Fitotóxica | Hernández-Carlos y col. 2011 |
| | <i>Calliandra pulcherrima</i> , <i>Gypsophila arrostii</i> , | | Hemolítica Adyuvante | Arslan y Celik 2013 |
| <i>Gypsophila pilulifera</i> , | da Silva y Parente 2013 | | | |
| <i>Gypsophila simonii</i> | | | | |

Tabla 2.3 Estudios recientes de las actividades bioactivas de las saponinas (continuación).

| Tipo de saponina | Especies de plantas | Actividad | Referencias |
|-------------------------|---|--|-----------------------|
| Triterpenica | <i>Gynostemma pentaphyllum</i> | Anti-inflamatoria Inhibidora de la enzima α -glucosidasa | Yang y col. 2013 |
| | <i>Aralia taibaiensis,</i> | | |
| | <i>Gypsophila arrostii,</i> | Antioxidante | Bi y col. 2012 |
| | <i>Gypsophila pilulifera,</i> | Anti-diabetes | Arslan y Celik 2013 |
| | <i>Gypsophila simonii</i> | | Weng y col. 2014 |
| Esteroidal | <i>Liriope sp.</i> | Anti-diabetes | |
| | <i>Dioscorea zingiberensis</i> C. H. Wright | Anti-inflamatoria | Challinor y col. 2012 |
| | | Anti-asmática | Mari y col. 2012 |
| | | Laxante | Esposito y col. 2013 |
| | <i>Ruscus aculeatus</i> | Antioxidante | Zhang y col. 2014 |
| | <i>Smilax sp.</i> | Anti-cáncer | Choi y col. 2015 |
| | <i>Lilium longiflorum</i> | Anti-trombótica | |
| | Thunb | Antiviral | |
| | <i>Ophiopogon japonicus</i> | Inmunosupresor Citotóxica | Li y col. 2013 |

Tabla 2.3 Estudios recientes de las actividades bioactivas de las saponinas (continuación).

| Tipo de saponina | Especies de plantas | Actividad | Referencias |
|-------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| | <i>Paris polyphylla</i> | | Lanzotti y col. 2012 |
| | var. <i>yunnanensis</i> | | Lanzotti y col. 2012 b |
| | <i>Allium sativum</i> L. | Antimicrobiana | Qin y col. 2012 |
| | var Voghiera | Anti-fúngico | Mostafa y col. 2013 |
| | <i>Allium nigrum</i> L. | | Heng y col. 2014 |
| | <i>Sapindus saponins</i> | | |
| | <i>Allium cepa</i> L. | | |
| | <i>Agave offoyana</i> | Fitotóxica | Pérez y col. 2013 |
| | <i>Solanum tuberosum</i> | | |
| | <i>Solanum</i> | Antiviral | |
| | <i>lycoperiscum</i> | Antioxidante | Akter 2013 |
| Alcaloides | <i>Solanum nigrum</i> | Citotóxica | Friedman 2015 |
| esteroidales | <i>Solanum</i> | Anti-cancer | Njeh y col. 2016 |
| | <i>melongena</i> | Anti-fúngico | |
| | <i>Solanum</i> | Anti-inflamatirio | |
| | <i>elaeagnifolium</i> | | |

Es importante mencionar, que la concentración de saponinas se ve afectada por la especie de planta, el origen genético, así como también de los factores ambiental y agronómico, como lo puede ser el crecimiento de la planta, los procedimientos de colecta y almacenamiento (Guclu-Ustundang y Mazza 2007).

Por lo anterior, la planta que más ha sido estudiada en la caracterización y aislamiento de saponinas es el ginseng (Wu y col. 2001; Cheng y col. 2010; Wang y col. 2012) debido a que presenta diferentes actividades biológicas. Aunque también se ha registrado la presencia de saponinas en la alfalfa, la soya, espárragos, tomate y algunos cereales, como por ejemplo la avena (Oleszek 2002; Osbourn 2003), y su distribución se ha encontrado en diferentes partes de las plantas. Por ejemplo en las raíces de *Medicago truncatula* y *Allium nigrum*, y/o en las semillas de *Capsicum annum* I.

En el *Agave* la concentración más alta de saponinas se localiza en la hoja (Novel 1998; Cheok y col. 2014).

2.2.1 Saponinas de *Agave*

Los jugos de las hojas de los agaves (*Agave difformis*, *A. lechuguilla*, *A. toumeyana*, *A. vilmoriniana*, *A. schott*, *A. durangensis*, *A. salmiana*, *A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. cupreata*, por ejemplo) presentan saponinas de carácter esterooidal (Novel 1998). Las saponinas esteroidales se pueden dividir de acuerdo a su estructura en saponinas esteroidales de tipo espirostanos o furostanos.

Las saponinas esteroidales espirostanos la estructura de su sapogenina consta de 27 carbonos, generalmente comprimidos por una estructura de seis anillos, mientras que las saponinas esteroidales del tipo furostano presentan en la posición 26 un enlace glicosilado y la estructura de la sapogenina permanece pentacíclica (Yang y col. 2006; Figura 2.4).

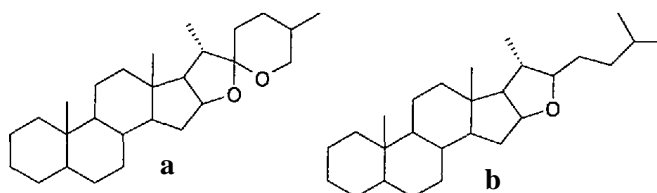


Figura 2.4 Estructura de sapogeninas de *Agave* (a) espirostanos y (b) furostanos.

Estudios realizados en *A. decipiens* muestran la presencia de cuatro tipos de saponinas esteroidales, mientras que en *A. utahensis* se aislaron 15 saponinas, de las cuales 5 fueron identificadas como saponinas con estructura espirostanos y 3 con estructura furostano (Abdel-Gaward y col. 1999; Yokosuka y Mimaki 2009). Por lo tanto, el tipo y concentración de saponinas varía de una especie a otra. Además de que su concentración puede variar de acuerdo al estado de madurez de cada planta (tabla 2.4).

Tabla 2.4 Saponinas identificadas en algunas especies de *Agave* por Resonancia Magnética Nuclear (Ahmad y Basha 2007)

| <i>A. americana L.</i> | <i>A. attenuata Salm-Dyck</i> | <i>A. cantala Roxb</i> | <i>A. kerchovei</i> | <i>A. lophantha Schiede</i> | <i>A. sisalana Perrine</i> |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|
| agamenoside a | agave attenuata saponin | agave cantala saponin 1 | melongoside a | agave lophantha saponin 1 | dongnoside a |
| agamenoside b | agave attenuata saponin 1 | agave cantala saponin 2 | | agave lophantha saponin 2 | dongnoside b |
| agamenoside c | | agave cantala saponin 3 | | | dongnoside c |
| agamenoside d | | agave cantala saponin n | | | dongnoside d |
| agamenoside e | | agaveside a | | | dongnoside e |
| agamenoside h | | agaveside b | | | |
| agamenoside i | | agaveside c | | | |
| agamenoside j | | agaveside d | | | |
| agavoside c | | cantalanin-a | | | |
| agavoside e | | cantalanin-b | | | |
| agavoside h | | cantalsaponin 1 | | | |
| saponin d | | cantalsaponin 2 | | | |
| agavoside a | | cantalsaponin 3 | | | |

Tabla 2.4 Saponinas identificadas en algunas especies de *Agave* por Resonancia Magnética Nuclear (Ahmad y Basha 2007) (continuación)

| <i>A. americana</i> <i>L.</i> | <i>A. attenuata</i> Salm- <i>Dyck</i> | <i>A. cantala</i> <i>Roxb</i> | <i>A. kerchovei</i> | <i>A. lophantha</i> <i>Schiede</i> | <i>A. sisalana</i> <i>Perrine</i> |
|--|--|----------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| agavoside b | | cantallasapon in 4 | | | |
| agavoside c1 | | | | | |
| agavoside d | | | | | |
| agavoside f | | | | | |
| agavoside g | | | | | |
| hosta longipes saponin 5 | | | | | |
| polianthes tuberosa saponin 9, agamenoside f | | | | | |
| yucca gloriosa saponin yg-1 | | | | | |
| cantallasapon in 1 | | | | | |

En el caso de las saponinas de agave, se han realizado estudios para reportar la actividad antimicrobiana de algunas especies de *Agave* (*A. americana*, *A. montana*, *A. marginata*, *A. ferox*, *A. scabra*, *A. lecheguilla*, *A. picta*, *A. lophantha*) principalmente en levaduras y hongos patógenos (Yang y col. 2006; Verastegui y col. 2008; Siddhapura y col. 2011). Además, debido a su

naturaleza esteroideal las saponinas de agave pueden presentar actividad antitumoral, hipoglicémica, inmunoregulatoria en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Yang y col. 2006), teniendo así un prometedor espectro de futuras investigaciones.

La búsqueda de saponinas en plantas que presente una o más actividades bioactivas como: actividad analgésica, antialérgica, anti-fúngica, anti-inflamatoria, anti-tumoral, antioxidante, citotóxica, diurética, entre otras (Guclu-Ustundang y Mazza 2007), ha ocasionado el desarrollo de nuevas tecnologías de extracción con el propósito de maximizar los rendimientos.

2.2.2. Extracción y purificación de las saponinas esteroidales

En los métodos de extracción de las saponinas esteroidales, usualmente se obtiene un extracto en polvo seco, que posteriormente es diluido en metanol, etanol o en una solución con 50% de etanol o metanol a temperatura ambiente. Existen técnicas convencionales de extracción como la maceración, Soxhlet, extracción por reflujo, y técnicas no convencionales, amigables con el ambiente, como la extracción por ultrasonido, microondas y extracción acelerada de solventes (ACE). Usualmente el extracto es concentrado, y fraccionado con acetato de etilo y n-butanol. Para su separación y purificación se utilizan comúnmente la cromatografía en capa fina (TLC) con gel de sílice usando como fase móvil cloroformo y metanol o cloroformo, metanol y agua. Actualmente, para hacer una extracción de la mezcla cruda de las saponinas se utiliza una columna compuesta por una resina de dietilbenceno con etilbenceno (Dianion HP-20), usualmente la saponina es obtenida en el eluyente que va de 70-100% de metanol. Una vez fraccionado los compuestos en la columna, se emplea una TLC preparativa para poder separar las saponinas de forma individual (Meagher y col. 2001; Skhirtladze y col. 2006; Temraz y col. 2006; Theunis y col. 2007; Kim y col. 2008; Cheok y col. 2014).

2.2.3. Caracterización de las saponinas

La identificación de la estructura de la saponina se puede dar por la combinación de los métodos químicos y espectrofotométricos. Se ha encontrado que la mayoría de las agliconas en los agaves

son esteroidales del tipo espirostano, que exhiben en el infrarojo (IR) absorciones a los 918 y 900 cm^{-1} (Mahato y col. 1982; Martínez-Martínez 2001).

Para la elucidación de la estructura de la saponina, por métodos convencionales, se inicia con una hidrólisis ácida separando la parte glucídica de la saponina. La estructura de los azúcares es identificada, por ejemplo, por cromatografía de líquidos (HPLC), y la aglicona es identificada ya sea por IR o por TLC (Oleszek y Bialy 2006).

Debido a que las saponinas esteroidales saturadas no presentan absorción en la UV (Oleszek 2002), es muy complicado la elucidación de su estructura por métodos convencionales. Sin embargo, existen otros métodos más robustos en donde se puede conocer de forma más puntual la estructura de la saponina como es el caso de la resonancia magnética nuclear (RMN) o la espectrometría de masas (MS)

Al utilizar la espectrometría de masas para el análisis de las saponinas, se pueden usar diferentes fuentes de ionización suave, como lo son (Kind y Fiehn 2010):

- Electro spray (ESI), que es usada para moléculas ionizables disueltas en un solvente polar volátil bombardeadas a través de un capilar de acero mediante nitrógeno formando un aerosol de pequeñas gotas con moléculas cargadas promovidas por un campo eléctrico.
- Bombardeo rápido de haz atómico (FAB), donde la muestra es disuelta en una matriz líquida (por ejemplo, glicerol) no volátil que es bombardeada por un rayo atómico de un gas inerte (Ar, Xe).
- Desorción laser asistida por una matriz (MALDI), la muestra es mezclada con una matriz de moléculas altamente ionizable (por ejemplo, 2,5-dihidroxibenzoico (DHB)). La matriz ayuda a ionizar la muestra una vez que el haz del láser incide sobre la mezcla de matriz-muestra, y exista a los iones por el impacto tanto de la muestra como los de la matriz.

Una vez que la muestra es ionizada a través de ESI, FAB o MALDI, la muestra ionizada es conducida a través de cuadrupolos o túneles de tipo de vuelo para detectar la relación de masa carga (m/z) del compuesto, por lo que al realizar el análisis por espectrometría de masas no solo se tiene conocimiento sobre el peso de la molécula, sino que también da una idea de cómo están enlazadas las moléculas de acuerdo a su ionización (Sahu y col. 2008; Zhu y col. 2010; Kang y col. 2012). Varias investigaciones en saponinas contenidas en plantas se han identificado por

HPLC-MS (Li y col. 2006). Sin embargo, para su identificación molecular se requiere que sean estructuras aisladas y que se conozca el peso esperado aproximado, así como también se recomienda realizar otros análisis complementarios para confirmar su estructura, como lo es el IR o RMN.

Finalmente es importante mencionar, que los efectos de la temperatura afectan fuertemente la extracción de las saponinas y por ende su eficiencia en la purificación y en la caracterización debido a que las saponinas podrían ser hidrolizadas a una polaridad más baja a temperaturas por arriba de los 60 °C. Este cambio en la polaridad afectaría las actividades biológicas que pudieran tener las saponinas, como por ejemplo su actividad anti-microbiana (Zhang y col. 2013).

2.2.4 Actividad anti-microbiana de las saponinas

Las plantas producen las saponinas como medio de protección, el mecanismo por el cual estos compuestos actúan como medio de defensa no es conocido del todo. Sin embargo, ha sido propuesto en diferentes modelos celulares que las saponinas interactúan con los esteroides de la membrana plasmática originando un incremento en la permeabilidad y eventualmente en la formación de poros (figura 2.5) originando el escape de los contenidos celulares (Kaczorek y col. 2008; Augustin y col. 2011).

Glauert y colaboradores (1962) fueron los primeros en proponer un modelo de acción de las saponinas en las membranas de eritrocitos. Este modelo sugiere la formación de un complejo espontáneo entre las saponinas y el esteroide de la membrana celular, en este caso del colesterol. Posteriormente la cadena hidrofílica de las saponinas, permite la formación de un poro acuoso, que causa el incremento de la permeabilidad de la membrana.

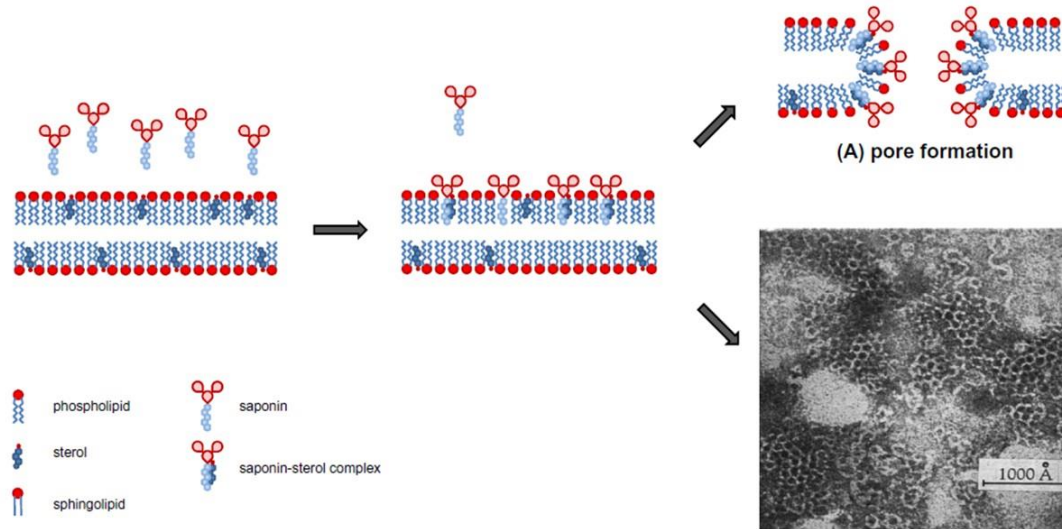


Figura 2.5 Efecto de las saponinas en la membrana celular (Glauert y col. 1962; Augustin y col. 2011).

También ha sido reportado que las saponinas generan cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana celular de los hongos (Simonin y col. 2007). Además se ha observado un efecto dual al emplear la saponina α -tomatidina y su aglicona (sapogenina) la tomatidina en la membrana celular de *S. cerevisiae*, ya que la primera ocasiona una permeabilización en la membrana celular, mientras que la segunda afecta la síntesis del ergosterol debido a que propicia la acumulación del precursor zimosterol, ocasionando que la membrana no sea lo suficientemente rígida, generando el escape de los contenidos celulares. También se observó este mismo efecto de la permeabilización de la membrana con saponinas como la digitonina y la α -hederina (Simons y col. 2006).

En cuanto a las saponinas presentes en los agaves, se ha reportado que la actividad anti-fúngica depende de la estructura de la saponina presente en los agaves. Por lo tanto, las saponinas con estructura espirostano presentan una alta inhibición en comparación con las de estructura furostano. Además, las saponinas que tienen una cadena ramificada de trisacáridos sin ningún enlace de oxígeno en las posiciones C-2 y C-12 exhiben una alta actividad inhibitoria, mientras que las saponinas con enlaces 2β -hidroxil muestran poca o ninguna actividad, y las saponinas que

presentan en la mitad de su estructura enlaces de disacáridos muestran poca actividad inhibitoria (Miyakoshi y col. 2000; Yang y col.2006; Siddhapura y col. 2011).

Finalmente, se ha observado que las levaduras *S. cerevisiae* en fermentaciones con jugo de *A. tequilana* la composición del jugo induce cambios en la pared celular, uno de estos inductores podrían ser las saponinas presentes en el jugo, por lo que estos compuestos podrían ser los responsables en la inhibición de *S. cerevisiae* en fermentaciones tradicionales en el proceso de producción de mezcal utilizando *A. salmiana* como materia prima (Aguilar-Uscanga y col. 2007).

No obstante, algunos hongos presentan resistencia a las saponinas presentes en las plantas como es el caso de *Sapindus saponaria* que presenta un hongo que produce enzimas glicosil hidrolasas que inhiben la actividad de las saponinas presentes en la planta (Heftmann 1963; Kohara y col. 2007; Amaral y col. 2008). Estas enzimas son específicas a algunos tipos de saponinas y pertenecen a la misma familia de las β -glucosidasas y podrían estar relacionadas con proteínas que están localizadas en la pared celular de algunos microorganismos (Rosi y col. 1994; Bernards y col. 2011). Por lo tanto, el hongo más estudiado en la resistencia a las saponinas es el *G. graminis* var. *avenae* presente en la avena (Carter y col. 1999; Bernards y col. 2011).

Aunque, también existen hongos resistentes a las saponinas presentes en el tomate como lo es el *Septoria lycopersici* y se ha observado que su resistencia se debe no solo a la secreción de enzimas sino también a la conformación de su pared y membrana celular (Lairini y col. 1996). En este contexto, se ha observado en diferentes procesos de fermentación de bebidas de agave la presencia de *Kluyveromyces marxianus* como una de las levaduras predominantes (Lappe-Oliveras y col. 2008), por lo que se podría suponer que esta levadura resiste la concentración de saponinas presentes en los jugos de agave.

2.3 Levaduras

La historia de las levaduras en asociación con la sociedad es sinónimo de la evolución de la producción del pan, cerveza y vino como alimento y bebidas globales, desde hace aproximadamente 5000 años. En la actualidad, el impacto de las levaduras en la producción de alimentos y bebidas se extiende más allá de las nociones originales de la producción de pan, vino y cerveza por *Saccharomyces cerevisiae*. Muchos ingredientes valiosos y coadyuvantes son ahora

derivados de las levaduras (Fleet 2006). Por ejemplo, en la producción de alimentos para animales se utilizan los polisacáridos de la pared celular de las levaduras (Kwiatkowski y Kwiatkowski 2012).

Las levaduras son microorganismos unicelulares que están dispersos en diferentes ambientes, donde su colonización está íntimamente relacionada a su adaptabilidad fisiológica. Las rutas metabólicas centrales son básicamente idénticas entre las diferentes especies, sugiriendo que estos microorganismos pueden constituir a un grupo metabólico homogéneo. Sin embargo, el mecanismo para la obtención de nutrientes, el número de enzimas y más importante la regulación de la fermentación y respiración difiere sustancialmente y hace a las levaduras un grupo altamente heterogéneo y complejo (Zamora 2009). En un ambiente natural las especies de levadura tienen una amplia gama de fuentes de carbono como alimento (por ejemplo, ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos), pero preferentemente metabolizan azúcares. La información relacionada al metabolismo de las diferentes fuentes de carbono es enorme, la más ampliamente estudiada es el azúcar como hexosa (glucosa, fructosa, galactosa o manosa) y disacáridos (maltosa o sacarosa), así como también compuestos de dos carbonos (etanol o acetato). La red metabólica empleada para el metabolismo de las hexosas y disacáridos comparte las mismas rutas y solo difieren en los pasos básicos iniciales del metabolismo (Rodrigues y col. 2006).

La especie de levadura de la que se tiene un mejor conocimiento es *S. cerevisiae*, esta levadura es excepcional debido a que es una de las pocas levaduras que pueden crecer anaeróbicamente y también en condiciones aeróbicas, esta levadura muestra un inusual comportamiento (van Dijken y col. 1993). No obstante, en los últimos años, otras levaduras además de *S. cerevisiae* han ganado cierto interés industrial, como es el caso de *K. marxianus* debido a que posee la capacidad de asimilar diferentes azúcares (Fonseca y col. 2013), además de presentar una velocidad de crecimiento alta, ser termotolerante y tener una alta capacidad secretora (Lane y Morrissey 2010).

2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La historia del género *Saccharomyces* comienza a principios del siglo XIX, cuando en 1838 Meyen, introduce el nombre genérico, llamando a la levadura de la cerveza *Saccharomyces cerevisiae* (Barnett 1992).

En la actualidad *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más usado industrialmente. De hecho fue uno de los primeros organismos en ser modificados genéticamente para producir aditivos alimenticios (Verstrepen y col. 2006).

Muchas herramientas biológicas, como la secuenciación de su genoma, su perfil transcripcional, estudios metabolómicos, estimaciones de su flujo de carbono, modelado *in silico* del genoma y bioinformática se han aplicado primero en *S. cerevisiae* (Otero y col. 2013).

Esta levadura esta tradicionalmente asociada con la producción de bebidas alcohólicas (cerveza, vino y cidra), debido a su capacidad de fermentar uno o más azúcares para producir etanol (Barnett 1992). Aunque también se emplea para la producción de alimentos, fármacos y últimamente para la producción de bioetanol y se ha estudiado su uso para aplicaciones ambientales como la remoción de metales pesados (Soares y Soares 2012; Kim y col. 2013).

2.3.2 *Kluyveromyces marxianus*

La primera vez que fue descrita *Kluyveromyces marxianus* fue en 1888 por E. C. Hansen, en aquel entonces fue nombrada *Saccharomyces marxianus* en honor a Marx quien fue la persona que originalmente la aisló por primera vez de la uva. Debido a su morfología, a la capacidad de fermentar y oxidar diferentes azúcares, y a la hibridación entre cepas, cuando se compararon con otras cepas de *Saccharomyces*, fue necesario reclasificar las especies *S. fragilis*, *S. marxianus* y *S. lactis* en una nueva taxonomía. Por lo que en 1956, van der Walt describe el nuevo género de *Kluyveromyces* (Fonseca y col. 2008).

Esta levadura, al igual que *S. cerevisiae*, es una levadura respiro-fermentativa. Sin embargo, debido a que *S. cerevisiae* es una levadura Crabtree positiva, lo que la hace requerir un controlado suplemento de carbono para evitar el metabolismo fermentativo, que es poco deseable cuando se requiere obtener altas cantidades de biomasa con el objetivo de producir compuestos de alto valor agregado como proteínas. Las levaduras Crabtree negativas, como es el caso de *K. marxianus*, en términos de metabolismo energético son levaduras más factibles para la producción de estos compuestos (van Dijken y col. 1993; Fonseca y col. 2007; Lane y Morrissey 2010).

Por lo tanto, *K. marxianus* posee ciertas aplicaciones de interés biotecnológico que son atractivas para la industria (Morrissey y col. 2015):

1. Producción de β -galactosidasa e inulinasa: La asimilación de lactosa es poco común en las levaduras, pero es posible en *K. marxianus*. Además la capacidad de uso de inulina como una sola fuente de carbono es una de las herramientas de diagnóstico que se usan para identificar cepas de *K. marxianus*.
2. Termotolerancia: Todas las cepas de *K. marxianus* pueden crecer a 44 °C y algunas cepas puede tolerar temperaturas de crecimiento mayores a 50°C.
3. Exhiben altas velocidades de crecimiento: Con tiempos de generación de 45 minutos en un medio rico.
4. Nueva plataforma para la producción de aromas y sabores: Producción de metabolitos como el 2-feniletanol y el acetato de etilo.
5. Levadura respiro-fermentativa: El etanol como subproducto, ha originado el uso de *K. marxianus* en el sector de los biocombustibles.

Como podemos observar tanto *S. cerevisiae* como *K. marxianus* son levaduras potencialmente aplicables a la industria, no sólo para la elaboración de bebidas, sino también para la industria alimentaria, farmacéutica o bien para la elaboración de biocombustibles o la remediación de suelos (sección 2.3.1 y 2.3.2). Por lo tanto, es importante el estudio de los componentes de la levadura como lo son su pared y membrana celular, con el objetivo de conocer cómo es que interactúa la levadura con el medio para producir etanol o secretar alguna enzima.

2.3.3 Pared celular en las levaduras

La capa más lejana que envuelve a la levadura es la pared celular, está mantiene la estructura y la rigidez de la célula y es permeable a solutos más pequeños que 600 Da (van der Rest y col. 1995).

La pared celular de la levadura está constituida por polisacáridos y glicoproteínas en forma de una red tridimensional, que funciona como una estructura altamente dinámica. Es capaz de adaptarse a cambios fisiológicos (multiplicación logarítmica o estacional), y morfológicos (conjugación, esporulación y crecimiento), o a las condiciones ambientales del entorno. Las principales funciones de la pared celular están encaminadas a garantizar la supervivencia de la célula, entre

estas se pueden incluir las siguientes: mantiene las condiciones de estabilidad osmótica dentro de la célula, brinda protección ante condiciones de estrés físico, mantiene la integridad y la forma celular durante los procesos de crecimiento y división (Klis y col. 2006); limita la permeabilidad de macromoléculas a través de la pared celular y la blinda del ataque de proteínas externas; evita el escape hacia el medio externo de moléculas solubles intermediarias durante la construcción de la pared celular, y crea los micro-ambientes internos adecuados para la membrana celular durante las fases de estancamiento de los cultivos y colonias (Osumi 1998; Klis y col. 2006).

Los constituyentes individuales de la pared celular se conectan uno con otro por enlaces covalentes formando un solo biopolímero supra-molecular. Para encontrar la naturaleza de estas conexiones, así como también la estructura de los polisacáridos todos sus elementos deben ser cortados, solubilizados, purificados y analizados. En este proceso es casi imposible no dañar algunos elementos estructurales y posteriormente distinguir entre los componentes originales de la pared celular y los polisacáridos solubles que pudieron estar presentes en el citoplasma o pudieron estar “atrapados” dentro de la pared celular. Para la extracción de la pared celular se han desarrollado diferentes metodologías, la mayoría de los protocolos emplean la diferenciación de los componentes celulares basados en su solubilidad en álcali y/o en ácidos inorgánicos. Los análisis químicos de los compuestos de la pared en gran medida dependen de la química del sacárido y la proteína. El contenido del sacárido en la pared celular es usualmente determinado por los reactivos de fenol-ácido sulfúrico y/o por el reactivo de antrona. Más de 50 años de investigación fueron requeridos para establecer la estructura de la pared celular (Farkas 2003; Kwiatkowski y Kwiatkowski 2012).

2.3.3.1 Estructura de la pared celular

La pared celular es una estructura robusta, en *S. cerevisiae* presenta un grosor de 120 nm, y está conformada por dos capas distintas que rodean a la célula. La capa externa en *S. cerevisiae* es de 34 ± 3 nm de espesor, mientras que su capa interna se estima que es de 86 ± 14 nm de espesor (Francois 2016).

En las levaduras la pared celular está conformada principalmente por 1,3 β -glucanos, 1,6 β -glucanos, mananos (manoproteínas) y quitina (tabla 2.5).

Tabla 2.5 Macromoléculas de la pared celular (en *Saccharomyces cerevisiae*)

| Macromolécula | % peso seco | Lugar de síntesis | Aplicaciones biotecnológicas | Referencias |
|-------------------------|-------------|--|---|--|
| 1,3 β -glucanos | 50-55 | Membrana plasmática | Estimular el sistema inmune, disminuir el colesterol, actividad antitumoral, actividad prebiótica | |
| 1,6 β -glucanos | 5-10 | Posiblemente inicia en el Aparato de Golgi y termina en la membrana plasmática | potencial uso en cosméticos | Klis y col. 2002 Liu y col. 2008 Limam y col. 2011 Novak y col. 2012 Free 2013 |
| Mananos (manoproteínas) | 35-40 | Retículo endoplásmico-Aparato de Golgi-Membrana plasmática | En vinos disminuye la astringencia, agrega complejidad aromática, incrementa el dulzor. | Da Silva y col. 2014 Domizio y col. 2014 Borchani y col. 2015 Schiavone y col. 2015 |
| Quitina | 1-2 | Membrana plasmática | Antioxidante Antibacteriana Anti-fúngica | |

Los 1, 3 β -glucanos son los mayores componentes y forman el soporte fibroso de la pared celular, que es visible en microscopia electrónica de barrido (SEM), existe un número similar de 1, 6 β -

glucanos unidos a los 1, 3 β -glucanos. La fuerza mecánica de la pared se debe principalmente a la capa interna, que consiste de 1, 3 β -glucanos y quitina y representa cerca del 50-60% del peso seco de la pared. El complejo 1, 3 β -glucanos/quitina es el mayor constituyente de la parte interna de la pared, y los 1,6 β -glucanos enlazan los componentes del interior y el exterior de la pared celular. La parte externa contiene principalmente manoproteínas que están involucradas en el reconocimiento de célula-célula. Además las manoproteínas, están densamente empacadas y limitan la permeabilidad de los solutos (Klis y col. 2002; Lipke y Ovalle 1998).

Es importante mencionar que los estudios de la química y la estructura de la pared de la levadura se han enfocado principalmente en *S. cerevisiae* y *Candida albicans*. Finalmente las proporciones de los diferentes componentes de la pared celular (β -glucanos, manoproteínas y quitina) pueden variar de una especie a otra, en *S. cerevisiae* existen aproximadamente iguales proporciones de manoproteínas y β -glucanos (Nguyen y col. 1998).

2.3.3.2 Función y regulación de la pared celular

La levadura invierte una cantidad considerable de su energía para la biogénesis de la pared celular, que comprende entre el 20-30% del peso seco celular. Aunque hay varias rutas de señalización que contribuyen con el mantenimiento de la pared celular, la principal ruta responsable de orquestar los cambios de la pared y responder a los retos de esta estructura es conocida como la ruta de integridad de la pared celular (CWI, Cell Wall Integrity pathway). La ruta de señalización CWI está conformada por una familia de sensores de superficie acoplados a una pequeña proteína G llamada Rho1, que activa una serie de efectores, estos regulan diversos procesos incluyendo la síntesis de β -glucanos. La ruta CWI es regulada a través del ciclo celular pero es también activada en respuesta a una variedad externa de estímulos que causan el estrés de la pared celular (Levin 2005). Por lo tanto, la integridad de la pared celular se debe mantener en todo momento para prevenir la lisis celular, también debe ser constantemente remodelada para soporte del crecimiento. Dicha remodelación involucra el rompimiento de enlaces, la introducción de nuevos polisacáridos y cadenas de proteínas a la pared y la formación de nuevos enlaces. Las enzimas que catalizan la síntesis de la pared celular están localizadas en la membrana plasmática, es importante mencionar que la síntesis de los 1, 6 β -glucanos parece ser más compleja que los otros polisacáridos y no del

todo comprendida, pero el último paso de su síntesis parece ocurrir en la membrana plasmática (Cabib y Arroyo 2013; Figura 2.6).

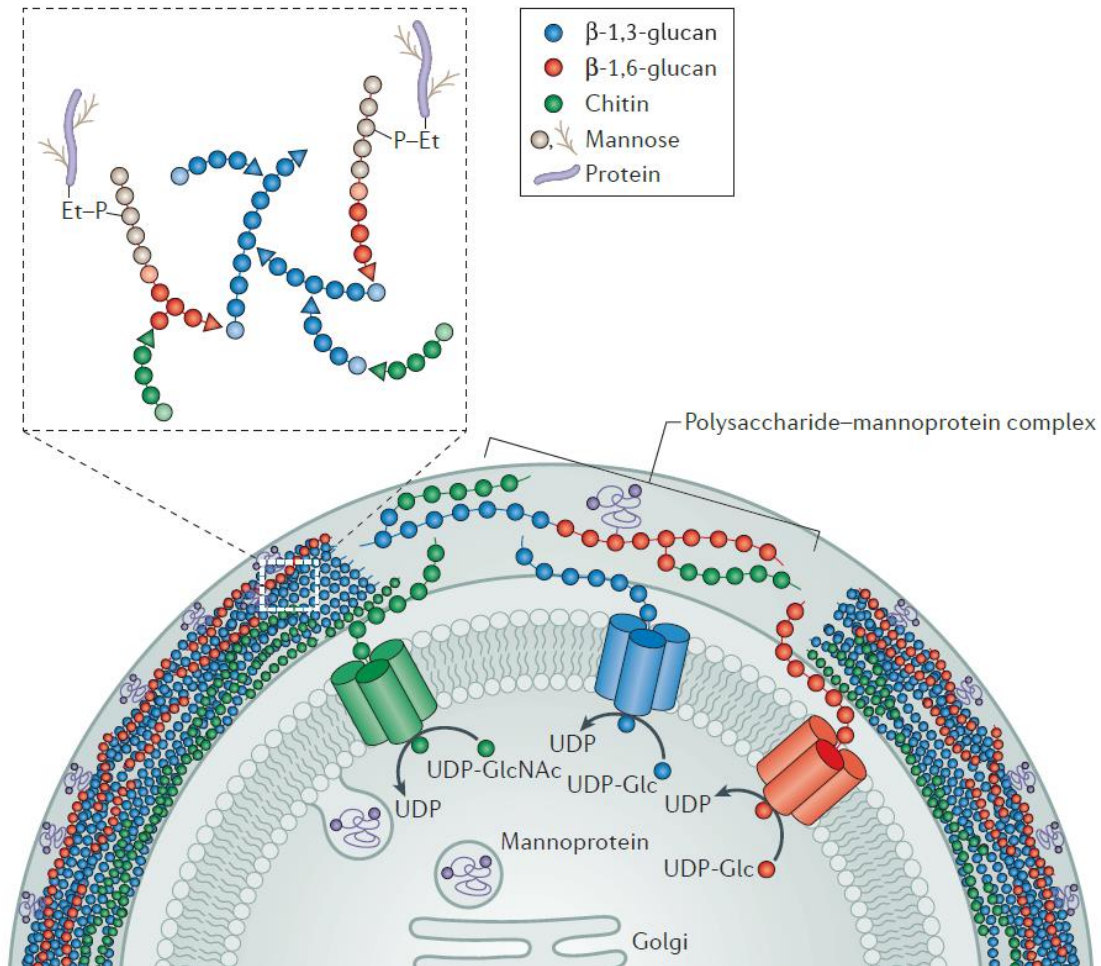


Figura 2.6 Síntesis y estructura de la pared celular en la levadura (Cabib y Arroyo 2013).

En conclusión, la pared celular es una barrera esencial y eficiente a varias moléculas incluyendo iones metálicos, toxinas, proteínas, entre otras. Al no existir la pared el paso libre de estas moléculas podría impedir la función adecuada de la membrana plasmática. Por lo tanto, no es de sorprenderse que exista una estrecha relación entre estas dos estructuras. Sin embargo, los detalles moleculares de su conexión no son del todo conocidos (Francois 2016).

2.3.4 Membrana plasmática en las levaduras

La membrana plasmática forma una barrera relativamente impermeable por moléculas hidrofílicas (van der Rest y col. 1995). A diferencia de las bacterias, en donde la membrana citoplasmática acomoda todos los procesos asociados a la membrana, las levaduras contienen muchas membranas especializadas:

- i. La membrana plasmática separa las otras membranas y los componentes celulares del medio externo.
- ii. La membrana mitocondrial está relacionada en la generación de la energía metabólica.
- iii. El retículo endoplásmico (ER) y el aparato de Golgi que están relacionados con la síntesis y almacenamiento de proteínas lipídicas.
- iv. Las membranas vasculares y peroximales que delimitan funciones metabólicas y digestivas especiales.

2.3.4.1 Estructura de la membrana plasmática

La membrana plasmática forma una barrera lipídica de 7.5 nm de ancho. Contiene una mezcla de lípidos polares y proteínas (figura 2.7). Una de sus funciones primordiales es la de aislar los procesos metabólicos del medio ambiente (Luevano-Martinez y Kowaltowski 2015).

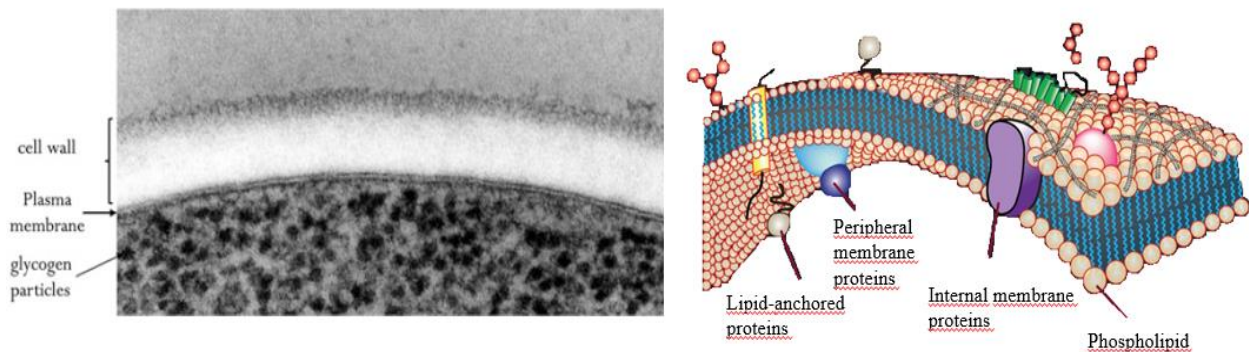


Figura 2.7 Imagen de microscopía electrónica de la pared y membrana celular, y la estructura de la membrana celular (Francois 2016).

El modelo clásico de Singer y Nicolson describe a la membrana como un continuo “mar” de lípidos dotado de proteínas globulares que se mueven de manera indistinta dentro del plano de la membrana. En este modelo, los lípidos no solo se difunden libremente en el plano de la membrana, también a través de movimientos transversos y rotacionales (flip-flop). La alta movilidad lateral de los lípidos en la membrana, se ha cuestionado debido a que la movilidad de un lípido fluorescente en la membrana de *S. cerevisiae* se observó que fue anormalmente lenta (van der Rest y col. 1995).

La membrana plasmática agrupa proteínas involucradas en el transporte de solutos, en la transducción de señal, en el anclaje del citoesqueleto y en la síntesis de los compuestos de la pared celular. Los lípidos de la membrana están asimétricamente depositados a través de la bicapa. En el interior de la membrana de *S. cerevisiae* son: la fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS), mientras que la parte externa cuenta con fosfatidilcolina (PC) y esfingolípidos. Otros lípidos de membrana importantes que se ubican tanto en la parte interna como en la externa de la membrana son los esteroides siendo el ergosterol el principal esteroide en levaduras y hongos, su función es darle rigidez a la membrana (Ratray y col. 1975; Carman y Henry 1989; van der Rest y col. 1995; Ejsing y col. 2009; Tronchoni y col. 2012).

Los fosfolípidos son las moléculas esenciales que contribuyen a la estructura y función de la membrana. La síntesis de fosfolípidos en *S. cerevisiae* ocurre por rutas complementarias comunes a aquellas encontradas en células de mamíferos. Los fosfolípidos PS, PI y PG son sintetizados por la vía CDP-DAG, mientras que los fosfolípidos PE y PC son sintetizados vía la ruta de Kennedy (figura 2.8). Es importante aclarar que cuando existe una ausencia de etanolamina o de colina los fosfolípidos PE y PC pueden ser sintetizados también por la vía CDP-DAG (Carman y Kersting 2004; Luevano-Maritnez y Kowaltowski 2015)

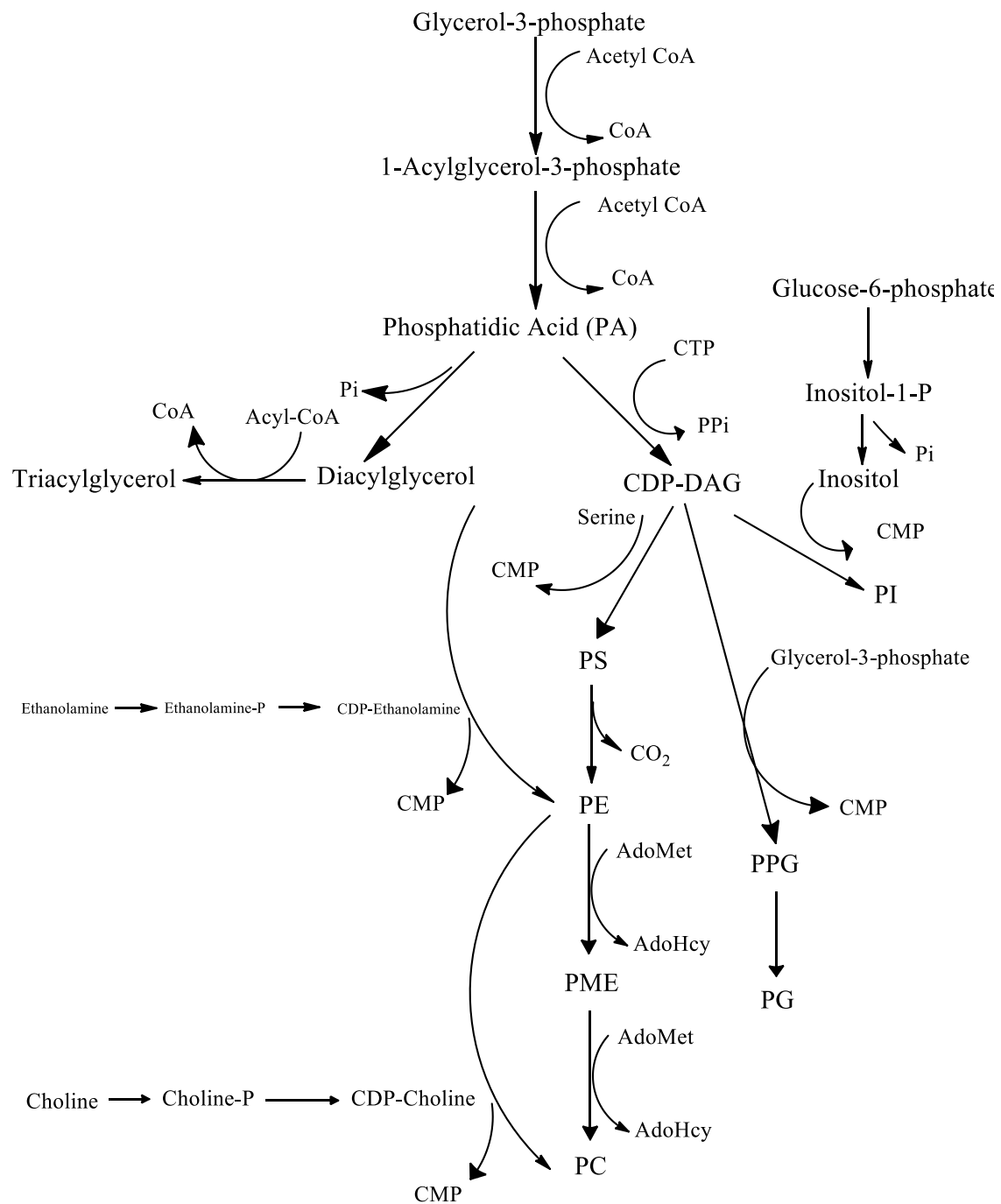


Figura 2.8 Síntesis de fosfolípidos en *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.4.2 Composición lipídica y rol de los lípidos en la membrana plasmática

La composición de ácidos grasos en la levadura muestra una preferencia de los C16 y C18. Un total de 33 ácidos que van desde C8-C26 han sido detectados en *S. cerevisiae*. En las levaduras generalmente abundan los ácidos grasos insaturados; siendo el mayor componente el ácido oleico (18:1). Aunque también se pueden encontrar como ácidos grasos mayoritarios, el ácido palmitoleico (16:1), el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0). La insaturación de los ácidos grasos en las levaduras, parece estar restringida a la dependencia del oxígeno, el contenido de ácidos grasos insaturados en *S. cerevisiae* decrece bajo condiciones anaeróbicas. Por lo tanto la composición de ácidos grasos parece ser la variable más importante en determinar la morfología de la membrana (Ratray y col. 1975; Blagovic y col. 2001; Boumann y col. 2003; Tronconi y col. 2012).

La mayoría de las especies de levadura tienen de un 3-7% de fosfolípidos de ellos 35-55% es PC, 20-32% PE, 9-22% PI y 4-18% PS (Ratray y col. 1975; Schneiter y col. 1999; Ejsing y col. 2009).

La respuesta de las membranas a los cambios de temperatura es uno de los parámetros ambientales más estudiados, en donde la mayoría de los estudios se enfocan a los cambios en la composición lipídica. Se observa que al bajar la temperatura de crecimiento los microorganismos alteran la composición de las cadenas de ácidos grasos disminuyendo el nivel de insaturación y la longitud de la cadena de hidrocarburos, y además se observa que la composición de los esteroides no presenta ningún cambio. Por lo tanto, parece ser que la clave de la regulación de la fluidez de la membrana en las levaduras son las proporciones relativas del esteroles total y los fosfolípidos (Turk y col. 2011).

Por otro lado, se ha reportado que el PI es un componente muy importante para los procesos tolerantes a inhibidores. Además los dos factores más importantes que influyen en la fluidez de la membrana son la saturación de los lípidos de membrana y la longitud de las cadenas de hidrocarburos de los lípidos, en el caso particular de la inhibición con furfural los cambios de los fosfolípidos de la membrana de algunas cepas de levadura representan una alteración adaptativa para compensar las alteraciones fisicoquímicas directas con la interacción del inhibidor (furfural) con la membrana celular (Xia y Yuan 2009).

Por lo tanto, para observar estas modificaciones en la estructura de la membrana se debe considerar que el estudio en medios de cultivo en batch pueden enmascarar las diferencias fisiológicas. Por

lo que la aplicación de un cultivo continuo en donde su estado estacionario de crecimiento puede ser perturbado con pulsos de extracto de saponinas, puede ayudarnos a entender como las saponinas interactúan con los polisacáridos de la pared celular y los lípidos de la membrana plasmática en las levaduras (Hoskinsson y Hobbs 2005; Rattray y col. 1975).

2.4 Cultivo en continuo

Desde su introducción en 1950, los cultivos en continuo han sido una herramienta útil para el estudio de la biología de varias especies y ha adoptado muchos contextos industriales como el de la cerveza y el tratamiento de desechos (Matteau y col. 2015).

Un cultivo en continuo es alimentado con una solución de nutrientes para mantener la población de microorganismos en la fase exponencial de crecimiento. En el cultivo en continuo se alcanza “el balance de crecimiento” en donde los niveles de microorganismos, producto y los componentes del medio y la salida de los productos son constantes. Esta condición es referida como un “estado estacionario” (estado de residencia) de crecimiento (figura 2.9). Para poder mantener el cultivo en estado estacionario se alimenta medio estéril y fresco al cultivo al mismo tiempo que es removido medio que contiene células y producto de cultivo. Bajo estas condiciones, la velocidad en que las nuevas células son producidas en el fermentador es igual a la velocidad en que las células están saliendo del fermentador (Doran 1995).

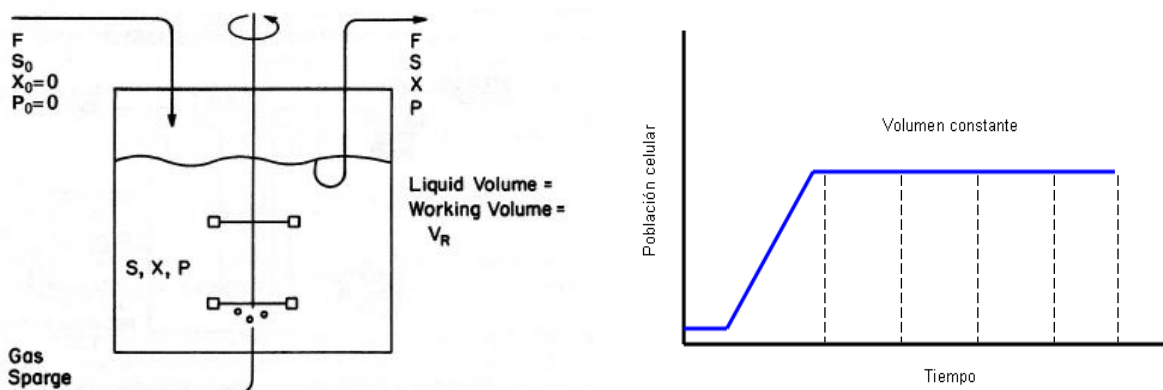


Figura 2.9 Esquema del cultivo en continuo (*chemostat*)

Un tipo de sistema que es ampliamente usado para el cultivo en continuo es el *chemostat*. Este sistema depende de la concentración de un nutriente esencial dentro del cultivo que controla la velocidad de crecimiento de las células. En general, el nutriente es limitado a una cantidad que restrinja el crecimiento, y el cultivo es removido a la misma velocidad en que el nutriente es adicionado (Doran 1995; Dunn y col. 2003).

Cuando se alcanza las condiciones del estado estacionario en el *chemostat* la tasa de dilución (D) es igual a la velocidad específica de crecimiento (μ). Por lo tanto, se puede calcular fácilmente el promedio del tiempo de generación de crecimiento del microorganismo. El resultado clave de este sistema es que el crecimiento de los microorganismos, que puede ser manipulado para conocer las velocidades más cercanas a lo que ocurre en la naturaleza (Kieran y Berovic 2001).

Para el balance de la concentración de células de un *chemostat* se emplea la siguiente ecuación (Kieran y Berovic 2001; Dunn y col. 2003):

$$FX_0 - FX + V_R\mu X - V_Rk_dX = V_R \frac{dx}{dt} \quad (2.1)$$

Donde:

F= velocidad de flujo de la solución del nutriente (L h⁻¹)

V_R= volumen del cultivo (L)

X= concentración de la célula

μ = velocidad de crecimiento (h⁻¹)

k_d= velocidad de muerte celular (h⁻¹)

D= tasa de dilución (D= F/V_R)

Usualmente el medio que se emplea es estéril, por lo tanto X₀=0

Si la tasa k_d es muy pequeña comparada con μ y si el sistema está en estado estacionario o de residencia entonces:

$$\frac{dx}{dt} = 0; \mu = D = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_s+S} \quad (2.2)$$

$\mu_{m\acute{a}x}$ es velocidad máxima de crecimiento (h⁻¹) y S es concentración residual de sustrato (gL⁻¹)

K_s = concentración de sustrato utilizado, numéricamente es igual a la concentración de sustrato cuando μ es la mitad de $\mu_{m\acute{a}x}$. Los valores de K_s son muy pequeños del orden de miligramos por litro para sustratos como carbohidratos para *S. cerevisiae*. Por ejemplo, K_s para la glucosa es de 25 mg L⁻¹ en *S. cerevisiae*.

Si D es un valor más grande que $\mu_{m\acute{a}x}$ el cultivo no se puede reproducir lo suficientemente rápido para mantenerse por sí mismo y es entonces lavado.

Los cultivos en continuo se pueden emplear para varios propósitos como establecer condiciones reproducibles de crecimiento o mantener las poblaciones celulares bajo un ambiente controlado por periodos largos de tiempo (tabla 2.6). Las condiciones de un cultivo en continuo resultan ser un estable y controlable set de condiciones fisicoquímicas en donde la velocidad de crecimiento, pH, biomasa, así como la concentración de oxígeno disuelto, proteínas y metabolitos alcanzan un equilibrio dinámico y se mantienen aproximadamente constantes en un periodo de tiempo extendido. Los sistemas biológicos que tengan como objetivo analizar e integrar grandes cantidades de datos para comprender las complejas interacciones entre componentes de sistemas biológicos, se verán beneficiados al usar equipos de cultivos continuos por contar con parámetros de crecimiento controlados y altamente reproducibles (Matteau y col. 2015).

Tabla 2.6 Algunos estudios que emplean cultivos en continuo

| Objetivo del continuo | Parámetros de medición | Referencias |
|---|--|-----------------------------|
| Obtener los rendimientos de <i>Salmonella typhimurium</i> probando diferentes tasas de dilución. | Consumo de glucosa, cantidad de proteína, concentración de amoníaco. | Dunkley y col. 2009 |
| Medir el efecto de la tasa de dilución y la adición de nutrientes en una fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> paravolátiles. | Concentración de biomasa, etanol, glicerol, azúcares reductores, y compuestos volátiles. | Moran-Marroquin y col. 2011 |

Tabla 2.6 Algunos estudios que emplean cultivos en continuo (continuación).

| Objetivo del continuo | Parámetros de medición | Referencias |
|--|--|-----------------------------|
| Producción de n-butanol con <i>Clostridium ssp</i> , a partir de n-butirato en un continuo de dos etapas | Consumo de n-butirato, biomasa, producción de etanol, acetato y n-butanol | Richter y col. 2011 |
| Determinar la cantidad de aminoácidos requeridos por <i>K. africana</i> . | Concentración de biomasa, consumo de azúcares reductores y aminoácidos, producción de etanol | Valle-Rodriguez y col. 2012 |
| Medir la energía en la dinámica celular de las levaduras | Oxígeno disuelto, flurometria directa de NADPH | Amariei y col. 2013 |
| Determinar si el incremento de la materia orgánica afecta el metabolismo bacteriano y su diversidad | Materia orgánica, composición de la comunidad bacteriana | Landa y col. 2013 |
| Medir la resistencia e inhibición de fármacos en bacterias | Velocidad de crecimiento y concentración de biomasa | Toprak y col. 2013 |
| Estimación de la intensidad de la luz óptima para un cultivo de <i>C. zofingiensis</i> | La intensidad de la luz por cada célula, la cantidad de biomasa | Imaizumi y col. 2014 |
| Producción de microalgas en un sistema en continuo de dos etapas | Intensidad de luz, demanda de nitrógeno, densidad celular, rendimiento de lípidos | Novoveska y Henley 2014 |
| Producción de pigmentos por bacterias | Concentración de CO ₂ , biomasa, amonio y pigmento (okenone) | Smith y col. 2015 |

Planteamiento del problema, Objetivos e Hipótesis

Si tengo mil ideas y sólo una termina por funcionar, me siento satisfecho

Alfred Novel

3. Planteamiento del problema

El tequila y el mezcal son dos bebidas destiladas de agave 100 % mexicanas que han adquirido en los últimos años un posicionamiento y prestigio en el mercado internacional. Ambas bebidas están reguladas por una norma oficial y cuentan con una denominación de origen que ayuda a reconocer y a proteger sus procesos de producción. Siendo necesario que exista una constatación de investigación para generar nuevo conocimiento en mejorar los procesos, para obtener un producto de alta calidad que mantenga los estándares nacionales e internacionales.

En el caso particular del mezcal, la norma establece que la materia prima pueden ser los agaves disponibles en las regiones que se encuentran dentro de la denominación de origen, haciéndolo un proceso más heterogéneo y complejo en comparación con el tequila que sólo puede emplear como materia prima principal el jugo de *Agave tequilana* Weber variedad azul. En este contexto, las zonas de Durango y San Luis Potosí, los agaves que se emplean como materia prima son el *Agave durangensis* y *Agave salmiana*, respectivamente. Ambas especies de *Agave* producen saponinas a las que los productores les atribuyen que los procesos de fermentación no se desarrollen por completo, afectando de esta manera la producción de mezcal en estas regiones.

Lo anterior nos hace cuestionarnos: ¿Cuáles son las estructuras de las saponinas presentes en estas especies de *Agave*?, ¿Cómo es que las saponinas inhiben los procesos de crecimiento y fermentación?, ¿Cómo afectan las saponinas a la estructura de la pared y membrana celular de las levaduras presentes en estos procesos?, ¿Existen levaduras capaces de resistir a esta actividad inhibitoria?, ¿Cómo se pueden mejorar los procesos de fermentación de mezcal en estas regiones?

Por lo tanto, el presente trabajo busca contribuir a generar conocimiento sobre el tipo de saponinas presentes en *A. durangensis* y *A. salmiana*. Además de conocer cómo las saponinas interactúan con dos cepas aisladas de levadura predominantes en los procesos de fermentación de bebidas de agave, específicamente conocer el efecto de las saponinas en la pared y membrana celular de las levaduras. Finalmente analizar si alguna de estas cepas presenta actividad “saponinasa” que evite o disminuya el efecto inhibitorio en las saponinas.

3.1 Justificación

El *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina* son utilizados como materia prima en la elaboración de mezcal en los estados de Durango y San Luis Potosí, respectivamente. Ambas regiones presentan problemas en sus procesos de fermentación, que son atribuidos a las altas concentraciones de saponinas presentes en los jugos de agave.

Hasta el momento, no existen estudios sobre el tipo de saponinas presentes en las hojas de los *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina*, y de su efecto en la composición de la pared y membrana celular de los microorganismos presentes en los procesos de fermentación de mezcal, que usan estos agaves como materia prima. Así como también, si existen levaduras presentes en dichos procesos de fermentación con actividad enzimática (saponinasa) capaces de inhibir la actividad antimicrobiana de las saponinas de agave.

Por lo tanto, es necesario generar el conocimiento necesario sobre las estructuras de saponinas presentes en las ambas especies de *Agave*, además de su interacción con la pared y membrana celular de las levaduras presentes en los procesos de fermentación, que conlleve posteriormente a una mejora en el mismo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar las saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, y determinar su efecto en la pared y membrana celular de dos cepas de levadura aisladas de procesos de fermentación de bebidas de agave. Así como de evaluar la actividad saponinasa, capaz de contrarrestar el efecto de las saponinas, en ambas cepas de levadura.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la saponinas de *Agave durangensis* y *Agave* ssp. *crassispina* por espectrometría de masas

- Evaluar el efecto de las saponinas sobre el crecimiento de las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* en un cultivo en continuo
- Evaluar el efecto de las saponinas sobre la composición de los carbohidratos de la pared celular y los fosfolípidos de la membrana celular en las cepas de levadura *S. cerevisiae* y *K. marxianus* por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas
- Evaluar la actividad saponinasa de ambas cepas de levadura *S. cerevisiae* y *K. marxianus* empleando un método espectrofotométrico.

5. Hipótesis

Es posible que, las saponinas presentes en el *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina* influyan modificando la composición de los carbohidratos de la pared y los fosfolípidos de la membrana plasmática de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*, así como la presencia de actividad enzimática, que conlleve a diferentes comportamientos de crecimiento y fermentación, de ambas cepas de levadura en los procesos de fermentación de bebidas de agave.

Metodología

Un experto es aquél que ya ha cometido todos los errores posibles en una materia muy concreta

Niels Henrik David Bohr

6. Metodología

El diagrama que se muestra en la figura 6.1 muestra un esquema general de la metodología que se empleó en el presente trabajo

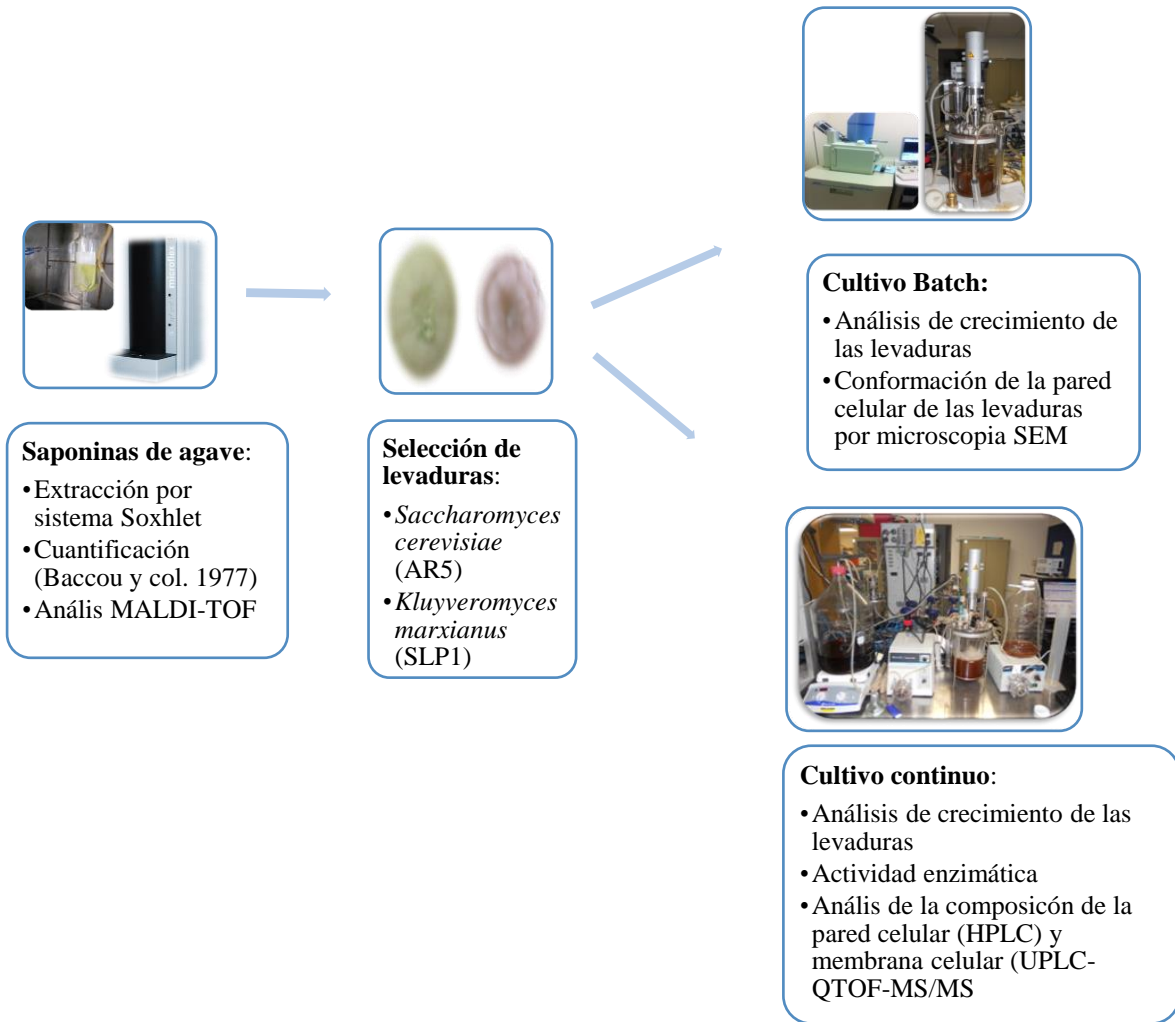


Figura 6.1 Diagrama global de la metodología

6.1 Saponinas de agave

6.1.1 Material vegetal

Se recolectaron hojas de *Agave durangensis* de la población de “El Venado” en el estado de Durango en abril del 2012, y de *Agave salmiana* ssp. *crassispina* de la población de “Charcas” en el estado de San Luis Potosí en mayo del mismo año. También se obtuvo, jugo de *Agave tequilana* Weber variedad azul de la destilería “La Madrileña” ubicada en Tototlán, Jalisco.

6.1.2 Extracción de las saponinas de agave

Las hojas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* se cortaron en cuadros de aproximadamente 2 cm, se secaron en horno a una temperatura de 60°C y se molieron obteniendo un peso final de 3.27 Kg, retirando un 75.7% de la humedad para el *A. durangensis*, y 1.43 Kg, retirando un 79.2% de la humedad para el *A. salmiana*.

Posteriormente se realizó la extracción de las saponinas utilizando un sistema Soxhlet, empleando hexano por 10 horas, cloroformo por 8 horas y metanol por 24 horas. Todos los solventes fueron evaporados a sequedad en un rotavapor a 42°C y una presión de 408 mBar. El extracto fue disuelto en agua y se almacenó a 4°C (da Silva y col. 2002; Sautour y col. 2007; Eskander y col. 2009; Yokosuka y Mimaki 2009).

Para la cuantificación de las saponinas se empleó un método espectrofotométrico que cuantifica la sapogenina esteroidal, la curva de calibración se realizó empleando diosgenina (0-10 ppm). Un mililitro de muestra se disolvió en un volumen igual de acetato de etilo, se realizó una extracción de la muestra al sonicarse dos veces por un minuto, posteriormente 500 µL del extracto se disolvió en 500 µL de acetato de etilo. Finalmente se adicionaron 500 µL del reactivo A (0.5 mL de anisaldehído y 99.5 mL de acetato de etilo) y 500 µL del reactivo B (ácido sulfúrico y acetato de etilo 50:50 v/v), la reacción colorimétrica se llevó a cabo en un baño a 60°C por 20 minutos, finalmente la reacción una vez fría se leyó a 430 nm (Baccou y col. 1977).

6.1.3 Identificación de las saponinas de *Agave*

Previo a la caracterización de las saponinas se realizó una purificación de ambos extractos de saponinas empleando la metodología de cromatografía de capa fina (TLC), para la cual se emplearon placas de TLC de sílica 60F₂₅₄ de Merck®, como fase móvil se empleó n-butanol, ácido acético y agua (5:1:4 v/v) (Basu y Rastogi, 1967). Las fracciones obtenidas se recolectaron y se suspendieron en metanol.

Finalmente, se tomó 1 µL de cada fracción y se mezcló con 1 µL de solución saturada de DHB para su análisis en MALDI-TOF (Microflex LT, Bruker, USA). La adquisición de datos y el procesamiento de los mismo se desarrolló empleando los procedimientos standard y el software FlexAnalysis (Bruker, USA).

6.2 Microorganismos

Se emplearon dos cepas de levadura pertenecientes a la colección de microorganismos del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ AC), una *Saccharomyces cerevisiae* (AR5), que se aisló del proceso de fermentación del tequila en Jalisco y una *Kluyveromyces marxianus* (SLP1), que se aisló del proceso de fermentación del mezcal en San Luis Potosí.

6.2.1 Condiciones de Inoculación

Cada cepa de levadura (*S. cerevisiae* y *K. marxianus*) creció en matraces Erlenmeyer de 250 mL, por 12 horas a 30°C con agitación (250 rpm) en 25 mL de jugo de *A. tequilana* Weber variedad azul, con una concentración inicial de azúcares de 20 g L⁻¹ y sulfato de amonio (1 g L⁻¹) como fuente de nitrógeno. (Arrizon y Gschaedler 2007).

6.3 Cultivo en batch

6.3.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se realizó un cultivo batch de cada cepa de levadura en matraces Erlenmeyer de 250 mL, empleando como medio de cultivo 50 mL de jugo de *A. tequilana* (20 g L⁻¹, de azúcar inicial) y sulfato de amonio (1 g L⁻¹). Los cultivos se inocularon con 1E+06 cel mL⁻¹ a 30°C, 250 rpm. Cuando las cepas de levadura alcanzaron su fase exponencial se adicionaron 3 mg mL⁻¹ de extracto de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana*. Se tomó muestra (1mL) después de 10 y 30 minutos de haber adicionado los extractos de saponina. Cada muestra y los controles de ambas cepas fueron lavados con buffer de fosfatos (PBS, Singma-Aldrich), y fijados con glutaraldehído 50% (v/v) por 1 h. Finalmente, las muestras se secaron en láminas de carbón y se les esparció partículas de oro en vacío, para ser analizadas en el microscopio de barrido de electrones (Jeol JSM-6610LV, Estados Unidos) en la Universidad de Guadalajara (Osumi 2012).

6.3.2 Cinéticas de crecimiento: determinación de la tasa de dilución

Para la determinación de la tasa de dilución de ambas cepas de levadura se realizaron cinéticas de crecimiento en cultivo en batch empleando matraces (500 mL) a diferentes concentraciones de azúcar inicial (10, 20, 30 y 40 g L⁻¹) y con una población inicial de células de 1E+06 cel mL⁻¹. Se empleó como medio de cultivo jugo de *A. tequilana* Weber variedad azul con 1 g L⁻¹ de sulfato de amonio estéril (121°C, 15 min). Lo anterior, para conocer la concentración óptima de azúcares para el crecimiento de ambas levaduras. Una vez seleccionada dicha concentración se realizaron cinéticas de crecimiento en cultivo en batch utilizando bio-reactores (Applikon, Países Bajos). Con una población inicial de 1E+06 cel mL⁻¹ y un volumen de trabajo de 1.5 L de jugo de *A. tequilana* y 1 g L⁻¹ de sulfato de amonio estéril (121°C, 15 min), con el objetivo de calcular la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) para de esta forma poder conocer la tasa de dilución (D) que se empleó en el cultivo continuo. Por lo anterior, el sistema en cultivo que se utilizó es del tipo *chemostat* (sección 2.4).

Las condiciones de cultivo fueron controladas y monitoreadas con una bio-consola Applikon modelo ADI 1030. La temperatura se mantuvo durante toda la cinética a 30°C, la velocidad de agitación fue de 250 rpm y el flujo de aire de 1 vvm. Para el monitoreo del pH y el oxígeno disuelto,

el software que se empleó para obtener los datos en línea fue el Bioexpert v.1.50.114 (Applikon, Países Bajos). Se analizaron la población celular, biomasa y azúcares reductores del medio de cultivo tanto en los cultivos en batch como en continuo.

6.3.2.1 Población celular

Para la cuantificación de levaduras se empleó la cámara de *Neubauer*, que se divide en dos partes laterales y una central. Esta última, cuenta con una cuadrícula de 1mm² dividida en 400 cuadros pequeños, que están agrupados en 25 cuadros grandes que hacen el total de la cuadrícula.

Sobre la cámara se coloca un cubre objeto dejando un espacio de aproximadamente 1 mm por el cual se coloca una pequeña cantidad de muestra en la cámara, dicha muestra es colocada por capilaridad a la cámara, posteriormente se hace la lectura de las células en el microscopio con un lente de 40X. La concentración de células por mililitro se determina con la ecuación.

$$X = \left(\frac{NC}{NK} \right) (D) (0.25 \times 10^6) \quad (3)$$

Donde X= millones de células por mililitro, NC= número de células contadas, NK= número de cuadros contados, D=dilución de la muestra (Hernández 2007).

La biomasa se determinó por medio de peso seco de la siguiente manera; 5 mL de muestra se centrifugaron (3900rpm, 10 min, y 4°C) separando el sobrenadante de la biomasa. Después la biomasa se lavó dos veces en 5 mL de agua destilada. Finalmente, la biomasa es secada a 50°C por 24 horas. El sobrenadante del medio es utilizado para el análisis de azúcares reductores (Morán-Marroquín y col. 2011).

6.3.2.2 Azúcares reductores

La cuantificación de azúcares se utilizó la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS), que se basa en la reacción de reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico en 3-animo-5nitrosalicílico, cuando los grupos aldehídos son oxidados por los grupos carboxílicos.

La preparación de la solución de DNS se realizó disolviendo 10 g de hidróxido de sodio, 200 g de tartrato de sodio y potasio, 0.5 g de metabisulfito de sodio y 2 g de fenol en 600 mL de agua destilada, una vez disueltas las sales se adicionaron 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, el ácido debe de adicionarse poco a poco hasta lograr su completa dilución. Finalmente se afora a un litro con agua destilada.

El protocolo a seguir para la cuantificación de los azúcares reductores es el siguiente: colocar 100 μL de muestra (sobrenadante del medio) y 100 μL de la solución de DNS en un tubo de ensayo, agitar y colocar por 5 minutos en un baño entre 95-100°C la muestra con el DNS, posteriormente enfriar la muestra en un baño de hielo por 5 minutos, una vez frío agregar 1 mL de agua destilada y leer la absorbancia a 540nm.

Para la lectura de las muestras se empleó un lector de microplacas *Bio-Rad* modelo 680XR. Los valores leídos son convertidos a valores de concentración en (g L^{-1}) mediante una curva de calibración, que se obtuvo preparando diferentes niveles de concentración de azúcares (glucosa o fructosa) siendo el nivel más alto de 1 g L^{-1} (Miller 1959).

6.4 Cinéticas en cultivo en continuo

Para analizar el efecto de las saponinas de *Agave* en la pared y membrana celular de las cepas *S. cerevisiae* y *K. marxianus* se realizaron cinéticas en cultivo continuo con jugo de *A. tequilana*. El estudio se llevó a cabo adicionando diferentes concentraciones (0.75, 1.5 y 3.0 mg mL^{-1}) de extracto de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina*. Lo anterior, debido a que algunos estudios realizados con hongos y levaduras muestran que conforme se aumenta la concentración de saponinas la velocidad de crecimiento de las levaduras va disminuyendo (Sparg y col. 2004; Verastegui y col. 2008; Fischer y col. 2011). Por lo tanto, al ir aumentando la concentración de saponinas que se adiciona al medio podremos observar el punto en el que las saponinas permeabilizan la membrana celular e inhiben el crecimiento de la levadura. Por lo que se tomaron muestras antes y 10 minutos después de haber adicionado el pulso con las diferentes concentraciones del extracto de saponinas para determinar la composición de la pared y la membrana celular de ambas cepas de levadura.

Las condiciones en las que se realizaron los cultivos en continuo fueron a 30°C, aireación 1 vvm, agitación de 250 rpm y un pH inicial de 4.5. El volumen de trabajo fue de 1.5 L de jugo de *A. tequilana* (concentración de azúcares inicial, 20 g L⁻¹) y sulfato de amonio (1 g L⁻¹), el medio se filtró y se esterilizó (121°C, 15 min). Los cultivos iniciaron en modo batch, al inocular 1E+06 cel mL⁻¹. Posteriormente cuando las levaduras alcanzaron su fase exponencial, se comenzó a alimentar el cultivo con jugo de *A. tequilana* (concentración de azúcares inicial, 20 g L⁻¹) y sulfato de amonio (1 g L⁻¹), que fue filtrado y esterilizado (121°C, 30 min). La alimentación de medio fresco y la extracción de mosto (0.06 mL s⁻¹), se realizó con dos bombas peristálticas (Cole-Parmer). Para alcanzar el estado estacionario, el cultivo se mantuvo durante 5 estados de residencia.

Se tomaron muestras cada 2 horas para la cepa de *S. cerevisiae* y cada 4 horas para la cepa de *K. marxianus*. Se alcanzó el estado de residencia, cuando la variación de la concentración de la biomasa, la población celular y el azúcar residual fue menor al 5% (Morán-Marroquin y col. 2011). Una vez que se alcanzó el estado de residencia se hicieron los pulsos con los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* a distintas concentraciones (Verastegui y col. 2008).

Se evaluó el crecimiento celular por peso seco y conteo celular, el consumo de azúcares por la técnica de DNS, se monitoreo el pH, la formación de CO₂ y el consumo de O₂ en la salida de gases exhaustos con los sensores de Bluesens y los datos fueron obtenidos por el software Bacvis v.

7.6.2.1

6.4.1 Perfil de carbohidratos en la pared celular

Para la extracción de la pared celular se suspendieron las levaduras (biomasa) en un buffer de fosfatos 0.1 M a pH de 8.5, posteriormente fueron homogenizadas por 5 minutos a una velocidad de 13,500 rpm (Ultra-turrax T25 basic, S25N-10G). Una vez homogenizadas la solución paso 5 veces por un microfluidizador (Microfluidics M-110P, USA) a una presión de 20,000 psi (figura 6.2).

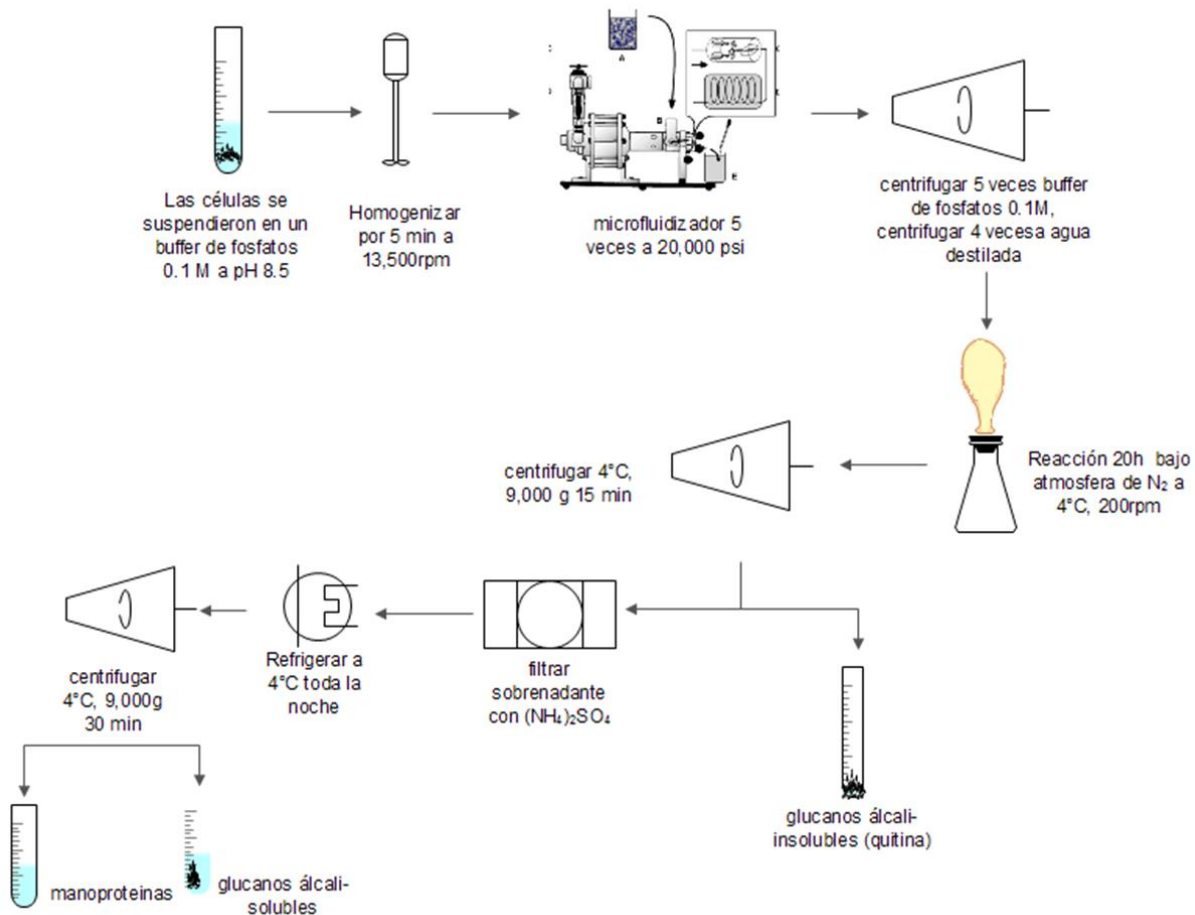


Figura 6.2 Diagrama flujo para la extracción de los componentes de la pared celular

La pared celular es separada por centrifugación (Hermle Z383, Alemania) a 9,000 x g por 15 minutos, posteriormente la pared es lavada 5 veces con el buffer de fosfato 0.1 M a pH 8.5 y después es lavada con agua destilada 4 veces. La temperatura se mantuvo todo el tiempo por debajo de los 5°C y la velocidad de los lavados fue de 9,000 x g por 15 minutos. Posteriormente la pared fue extraída bajo atmósfera de nitrógeno con una solución de 1 M de hidróxido de potasio (100 mL por cada gramo de pared seca) en un orbital a 10°C por 20 h a 200 rpm. La solución fue centrifugada 3 veces a 4°C a una velocidad de 9,000 x g por 15 minutos, conservándose el sobrenadante y el residuo. El residuo se re-extrajo 2 veces más bajo atmósfera de nitrógeno con 1 M de hidróxido de potasio por 2 horas a 10°C. Se combinaron los extractos alcalinos (sobrenadante), que se saturan con sulfato de amonio y se filtran a través de un papel de fibra de vidrio, posteriormente se refrigeraron las muestras ya filtradas toda la noche a 4°C. Se forma un precipitado blanco que es recuperado por centrifugación a 4°C y 9,000 x g por 30 minutos. El

residuo de la pared, el precipitado y el sobrenadante son identificados como fracciones de glucanos álcali-insolubles, glucanos álcali-solubles y manoproteínas (Nguyen y col. 1998).

Finalmente las tres fracciones fueron hidrolizadas enzimáticamente por 2.5 h a 37°C, 300 rpm (Thermomixer confort, Eppendorf, USA), con la Chitinase de *Trichoderma viridie* y la *Endo-1-3(4)-β-glucanasa* ambas enzimas fueron adquiridas de Sigma Aldrich ®, las fracciones hidrolizadas fueron analizadas por cromatografía de líquidos (HPLC Agilent 1220 Infinity LC) los detectores que se utilizaron fueron de índice de refracción (RID) a 50°C y UV a 210 nm. La columna que se empleó fue la Biorad-Animex ® HPX-87H (300 x 7.8 mm). El flujo de trabajo fue de 0.50 mL min⁻¹, la temperatura del horno fue de 50°C, el volumen de inyección fueron 40 µL. La fase móvil fue ácido sulfúrico 5mM (Gonzalez-Ramos y col. 2008).

6.4.2 Perfil de lípidos en la membrana celular

Para el análisis del perfil lipídico de la membrana celular de ambas levaduras. Se realizó la extracción de lípidos y se trabajó con el protocolo modificado propuesto por Matyash y colaboradores (2008), consistió en pesar 2 mg de biomasa seca, se adicionó 225 µL de metanol a 4°C. Posteriormente, se agregaron perlas metálicas (SSB05 0.5 mm y SSB10 1.6 mm) y se rompió la pared en un SPECX GENO GRINDER por 2 min a 1500 rpm. Una vez rota la pared, se agregó 750 µL de metil-terbutil-éter (MTBE) y se agitó en un vórtex por aproximadamente 10 segundos, posteriormente las muestras se llevaron a un *Thermomixer* a 4°C por 6 minutos. Después, se agregaron 188 µL de agua miliQ y se homogenizó la muestra. Finalmente se centrifugó por 2 min a 14,000 x g. Se tomaron 300 µL de sobrenadante y se conservaron a -20°C, y otros 300 µL se secaron en un sistema de concentración *speed vacuum*. La muestra seca se re-suspendió en 100 µL de metanol: tolueno (90:10 v/v) para su análisis, que se llevó a cabo por cromatografía de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con un cuádrupolo y tiempo de vuelo (LC/Q-TOF MS/MS), la columna que se empleó fue una ACQUITY UPLC CSH C18 (1.7 µm) 2.1x100mm de Waters. Las muestras se corrieron en modo positivo y negativo. La fases móviles que se emplearon fueron, fase A: acetonitrilo con agua acidificada 0.1% de ácido fórmico v/v y 10mM de formato de amonio (40:60 v/v) y fase B: isopropanol y acetonitrilo con 10mM de formato de amonio y 0.1% de ácido fórmico (90:10 v/v). El flujo de la fase móvil fue de 0.6 mL min⁻¹ y el gradiente que se empleó fue: 0-4 min 70% A, 4-22 min 52% A, 22-24.20 min 1% A y 24.20-30 min 85% A. Para el análisis

de resultados se emplearon librerías de la NIST MS y otras bases de datos para su identificación (Kind y col. 2013).

6.4.3 Actividad enzimática

Se realizó una medición de la actividad enzimática de ambas levaduras, para conocer si existe alguna actividad β -glucosidasa (actividad saponinasa) (Bernards y col. 2011) que pudiera hidrolizar las saponinas de ambos extractos. Por lo tanto, se empleó como sustrato 0.5% (p/v) de carboxil-metil-celulosa en buffer de citratos 0.1 M pH 5.5. Se tomaron 50 μ L de sustrato que fueron incubados (50°C) por 15 minutos con 50 μ L del sobrenadante del medio de cultivo transcurridos 10 minutos de la adición de los pulsos de saponinas de ambos extractos de *Agave*, y la actividad fue medida con la técnica de DNS (King y col. 2009).

6.5 Análisis estadístico

El efecto de la cepa de levadura, la especie de *Agave*, la concentración del extracto de saponinas y la interacción entre estos factores en la concentración de los β -glucanos y mananos fue evaluada por un análisis multifactorial, usando el software STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.11 (StatPoint Technologies, EUA)

Resultados y Discusión

Me enseñaron que el camino del progreso no es rápido ni fácil

Marie Curie

7. Resultados y Discusión

7.1 Extracción de las saponinas

Las extracciones de las saponinas se realizaron empleando el sistema Soxhlet, cuantificando la concentración de dicho extracto empleando el método propuesto por Baccou y col. (1977), obteniéndose las concentraciones de extracto de saponinas que se presentan en la tabla 7.1. El método de extracción empleado en el presente trabajo, se considera como un método convencional con buenos rendimientos de extracción de saponinas (Guclu-Ustundang y Mazza 2007; Cheok y col. 2014). Además, las concentraciones obtenidas (tabla 7.1) son superiores a las reportadas por Pinos-Rodriguez y col. (2008), esto se puede deber a que el método de extracción y las especies de agave estudiadas son distintas. Sin embargo, la concentración de saponinas obtenida en *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina* se encuentra dentro del rango promedio esperado de concentración de saponinas presente en plantas (Glucu-Ustundang y Mazza 2007).

Tabla 7.1 Concentraciones de extracto de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*

| Especie de <i>Agave</i> | Extracción (g de extracto por g de hoja seca) | Concentración de saponinas en el extracto (g L ⁻¹) |
|--|---|--|
| <i>Agave durangensis</i> | 0.30 ± 0.02 | 14.05 ± 4.0 |
| <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | 0.47 ± 0.01 | 26.53 ± 2.5 |

En la tabla 7.1 se observa que existe una mayor de extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* que en *A. durangensis*. Esto se puede deber a los factores ambientales y de crecimiento, que sufrieron ambas plantas, debido a que se conoce que los factores ambientales y de crecimiento afectan la concentración de saponinas en plantas (Guclu-Ustundang y Mazza 2007). Además, aunque pertenezcan al mismo género, se sabe que estos metabolitos secundarios difieren cuantitativa y cualitativamente de acuerdo a la zona geográfica en la que crece la planta,

temperatura, fertilidad de la tierra, disponibilidad de agua y luz (Szakiel y col. 2011). En este contexto, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI; <http://www.cuentame.inegi.org.mx>) aunque los estados de Durango y San Luis Potosí son estados donde predomina un clima seco y de escasa precipitación pluvial. Es el estado de San Luis Potosí el que presenta una temperatura promedio más elevada (21°C) y también su precipitación media de agua es mayor (950 mm anuales) en comparación con el estado de Durango. Además, el temporal que se presentan la temperatura más elevada en ambas entidades es en mayo, fecha en la cual se recolectaron las hojas de *Agave salmiana* ssp. *crassispina*. Lo que nos hace suponer que la temperatura y la disponibilidad de agua son factores importantes para que los agaves produzcan las saponinas. Es importante mencionar que existen pocos datos disponibles en relación a los cambios del contenido de saponinas en las plantas ocasionado por factores ambientales, lo que hace potencialmente atractivo para futuras investigaciones (Szakiel y col. 2011).

7.2 Caracterización de las saponinas

Utilizando la espectrometría de masas (MALDI-TOF) se identificaron las estructuras de las saponinas presentes en ambas especies de *Agave*. Para su análisis se realizó una búsqueda exhaustiva de la masa-carga (m/z) de saponinas esteroidales en bases de datos como HMDB y CHEMSPIDER (anexo 1). Se encontraron tres tipos de saponinas espirostanos en el *Agave durangensis*: Agavoside A, Agavoside B y *Agave cantala* saponin N (figura 7.1). Debido a que, se observó la m/z de la tigogenina seguida de una serie de cadenas repetitivas de hexosa, obteniendo como resultado la m/z del *Agave cantala* saponin N (figura 7.1a). De igual manera, se

encontró la m/z de la hecogenina unida a una serie repetitiva de cadenas de hexosa que conlleva a obtener la m/z del Agavoside A y el Agavoside B (figura 7.1b).

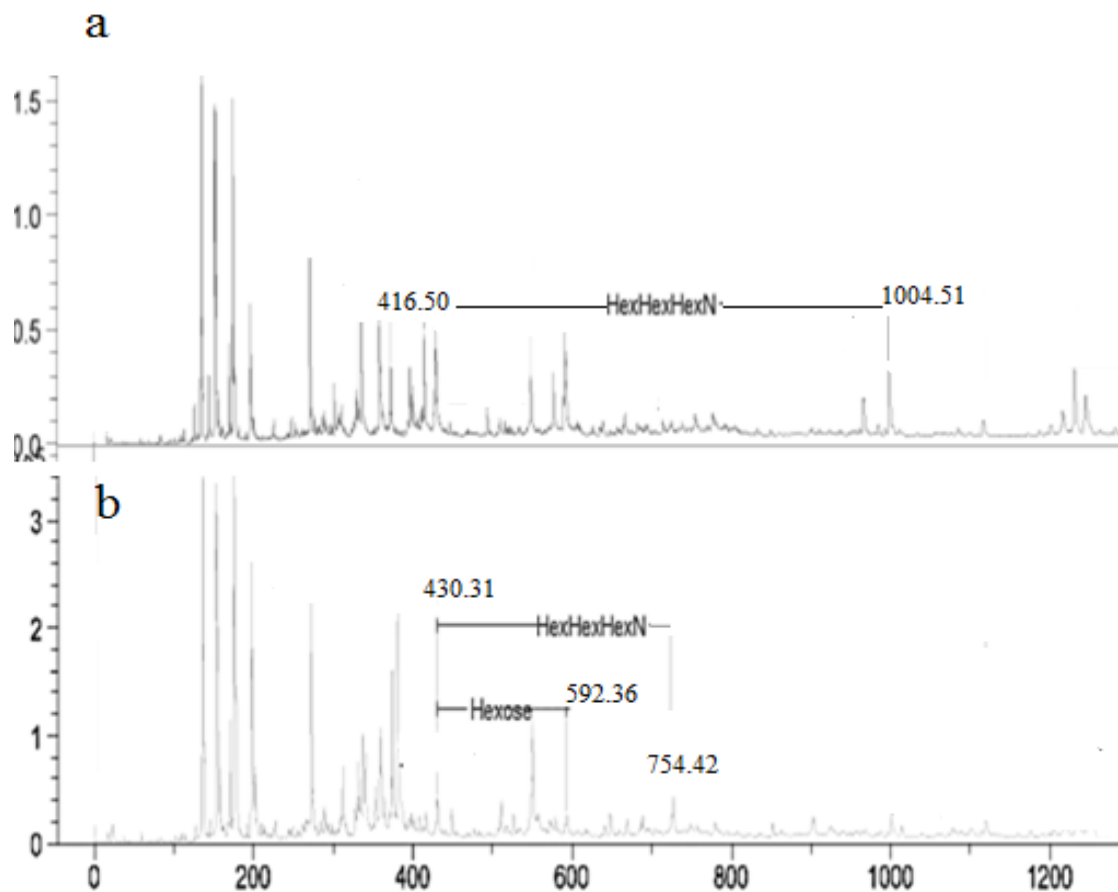
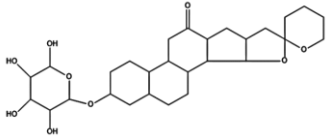
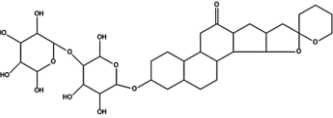
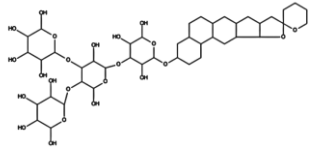
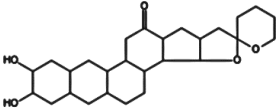
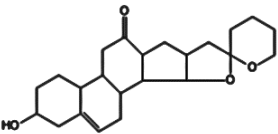


Figura 7.1 Espectros de masas de las saponinas (a) *Agave cantala* saponin N y (b) Agavoside A y Agavoside B, detectadas en el extracto de saponinas de *Agave durangensis*.

Yang y col. (2006) reportaron que las saponinas esteroidales espirostano presentan una alta actividad antimicrobiana en comparación con las saponinas esteroidales de tipo furostano. Además las saponinas Agavoside A y Agavoside B (tabla 7.2) poseen una hecogenina como su aglicona, y existen reportes en donde sugieren que este tipo de aglicona tiene actividad antimicrobiana (Miyakoshi y col. 2000; Yang y col. 2006). Ambas saponinas fueron identificadas anteriormente en *Agave americana* y *Agave durangensis* (Ahmad y Basha 2007; Gonzalez-Valdez y col. 2013). Es importante mencionar que en el caso de la identificación en el *Agave durangensis* por Gonzalez-Valdez y col. (2013), ellos realizaron una identificación parcial empelando técnicas de HPLC y

UV, en el presente trabajo la masa carga que se obtuvo por MALDI-TOF nos da la certeza de afirmar que ambas saponinas (Agavoside A y Agavoside B) se encuentran en el extracto de *A. durangensis*. Mientras que, la saponina *Agave cantala* saponin N se identificó anteriormente en las hojas del *Agave cantala* (Ahmad y Basha 2007).

Tabla 7.2 Moléculas de saponinas y agliconas identificadas por MALDI-TOF en *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

| Saponina/aglicona | m/z | Agave | Estructura | Referencia |
|-----------------------------------|----------|---|--|---------------------------|
| Agavoside A | 592.3611 | <i>A. durangensis</i> <i>A. salmiana</i> |  | Ahmad y Basha, 2007 |
| Agavoside B | 754.4139 | <i>A. durangensis</i> |  | Ahmad y Basha, 2007 |
| <i>Agave cantala</i> saponin N | 1004.519 | <i>A. durangensis</i> |  | Ahmad y Basha 2007 |
| Manogenina | 446.3033 | <i>A. salmiana</i> |  | Leal-Diaz y col. 2015 |
| Gentrogenina | 428.2926 | <i>A. salmiana</i> |  | Leal-Diaz y col. 2015 |

En el caso del *Agave salmiana* ssp. *crassispina* se encontraron dos diferentes tipos de agliconas (figura 7.2): manogenina y gentrogenina que también son de tipo espiroetano, y fueron identificadas anteriormente en el agua miel del *A. salmiana* por Leal-Díaz y col. (2015). Aunque no existen reportes, de la actividad antimicrobiana de estos dos tipos de agliconas, existe evidencia que sugiere que de acuerdo a la estructura de la aglicona la actividad antimicrobiana puede aumentar o disminuir (Miyakoshi y col. 2000). También se encontró en el extracto de *A. salmiana* ssp. *crassispina* la saponina Agavoside A, aunque en menor proporción que en *A. durangensis*.

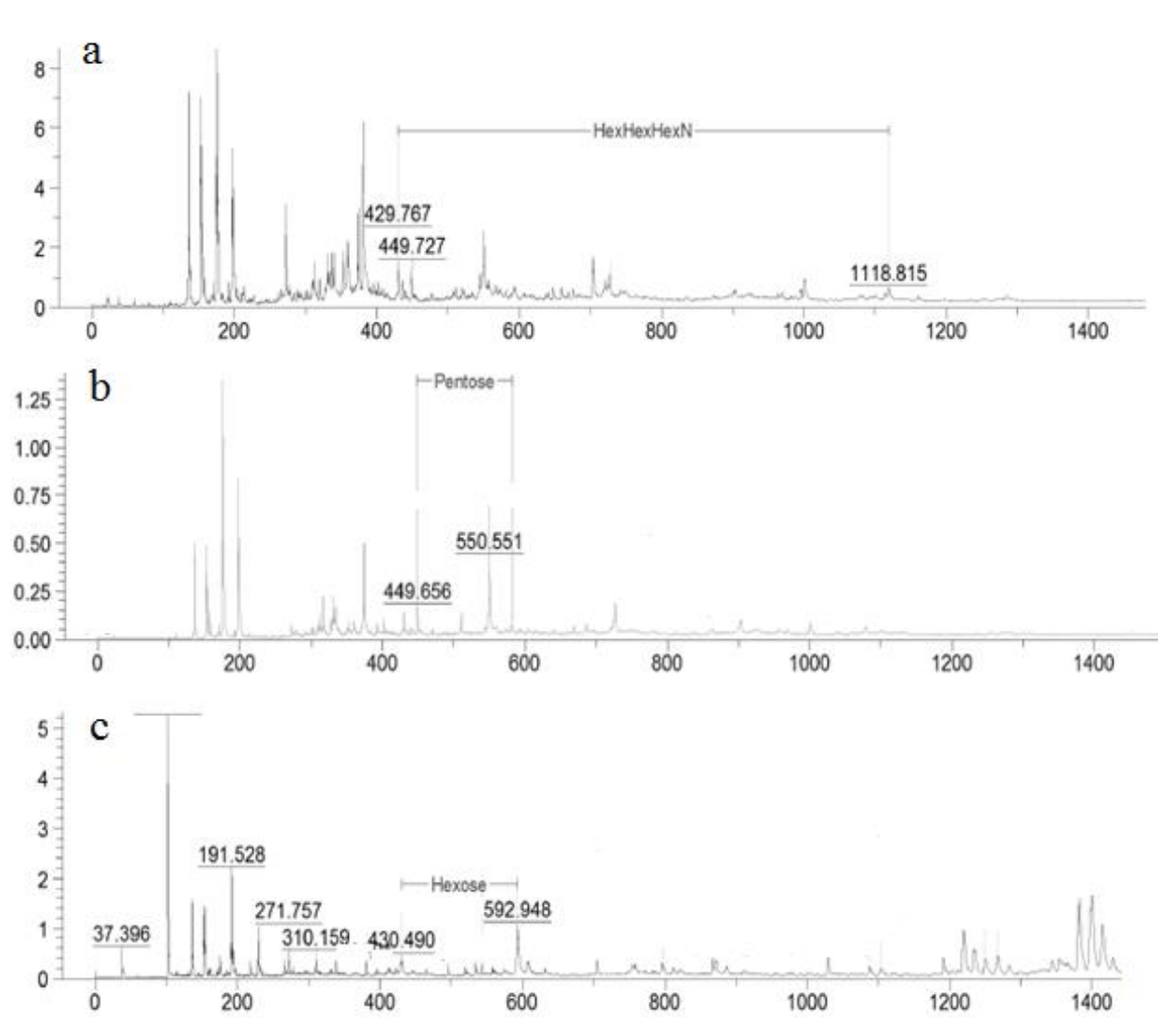


Figura 7.2 Espectros de masas de (a) gentrogenina, (b) manogenina y (c) Agavoside A detectadas en el extracto de *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

Existen aproximadamente 150 tipos de saponinas esteroidales identificadas, de las cuales alrededor de 45 saponinas han sido identificadas hasta el momento en especies de *Agave* (Novel 1998; Ahmad y Basha 2007), bajo distintas técnicas analíticas. (Zhang y col. 2010; Zhu y col. 2010).

En la figura 7.1 y la figura 7.2 al utilizar la espectrometría de masas MALDI-TOF se puede conocer la masa de saponinas presentes en las diferentes especies de *Agave*. Sin embargo, esto sólo será posible si se conoce con anterioridad el tipo de masa-carga (m/z) de las agliconas y/o de las saponinas. Es importante mencionar que si no se conoce con anterioridad la m/z se deberá realizar una resonancia magnética nuclear (RMN) e infrarojo (IR), para conocer la estructura de las nuevas saponinas identificadas por masas, debido a la presencia de sus cadenas de azúcares asociadas a su estructura. En el presente trabajo se realizó una búsqueda exhaustiva de los tipos de saponinas cuya m/z han sido reportadas hasta el momento, en bases de datos como la HMDB y CHEMSPIDER (anexo 1). Por lo tanto, al conocer la m/z de las saponinas se logró corroborar la presencia de tres de ellas en *A. durangensis* y una más en *A. salmiana* ssp. *crassispina* (tabla 7.2). Sin embargo, las agliconas encontradas en el *A. salmiana* ssp. *crassispina* (manogenina y gentrogenina) contienen cadenas de hexosas y pentosas enlazadas, generando una m/z de 1118.81 en el caso de la gentrogenina (figura 7.2a) y una m/z de 550.55 en el caso de la manogenina (figura 7.2b), dado que estas m/z no han sido reportadas, la elucidación de las estructuras de estas saponinas no se puede realizar sólo con esta información, por lo que se sugiere realizar una RNM e IR de estas estructuras.

Una vez identificadas las saponinas, se prosiguió a realizar diferentes cultivos en batch para conocer la velocidad máxima de crecimiento y posteriormente las tasas de dilución para el cultivo en continuo.

7.3 Cinéticas de crecimiento en cultivo batch

Se realizaron cinéticas de crecimiento en matraces con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* en jugo de *Agave tequilana* Weber variedad azul, con diferentes concentraciones de azúcar (10, 20, 30 y 40 g L⁻¹) con el objetivo de saber cuál es la concentración ideal para favorecer el crecimiento celular y no la fermentación debido a que se desea conocer cómo afectan las saponinas el crecimiento de las levaduras. A todos los medios (jugo de A.

tequilana) que se emplearon para realizar las cinéticas (anexo 2) se les adicionó 1 g L^{-1} de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Podemos observar en la figura 7.3 que ambas cepas presentan una velocidad de crecimiento a los 30 g L^{-1} de azúcares iniciales, estos resultados son similares a los obtenidos por de León-Rodríguez y col. (2008), ellos realizaron cinéticas de crecimiento con *Agave salmiana* y diferentes cepas aisladas de mezcal. No obstante, para asegurar que la levadura se mantiene en su estado de respiración y no de fermentación se optó por utilizar la concentración de 20 g L^{-1} .

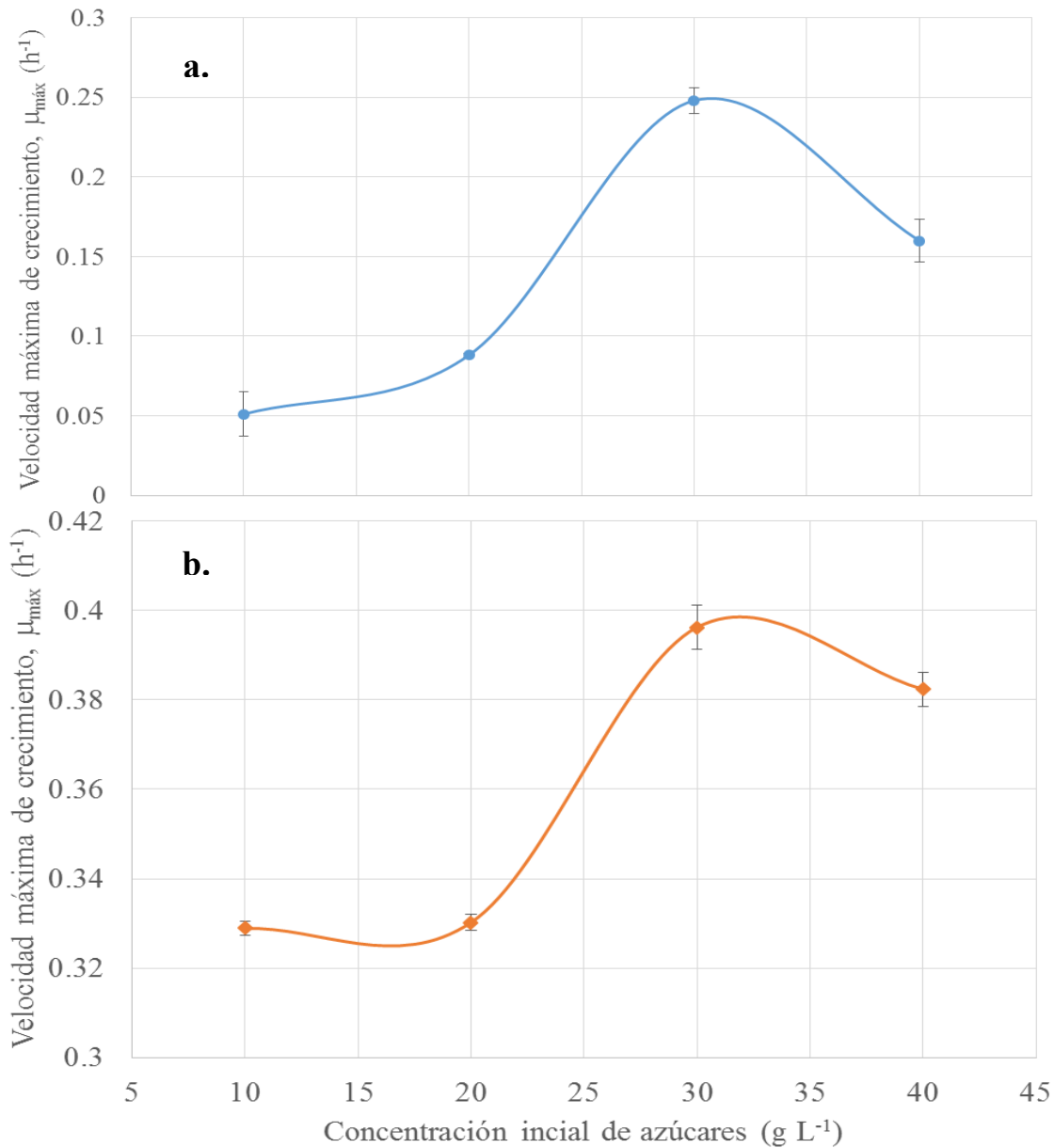


Figura 7.3 Velocidades máximas de crecimiento en matraz de (a) *Saccharomyces cerevisiae* y (b) *Kluyveromyces marxianus*, a diferentes concentraciones de azúcares.

Posteriormente, se realizaron cinéticas de crecimiento en bio-reactores de 3 L de capacidad con jugo de *Agave tequilana* a una concentración de azúcares iniciales de 20 g L⁻¹, para seleccionar la velocidad de crecimiento y a su calcular la tasa de dilución (sección 2.4) que se manejó en los cultivos en continuo para ambas cepas: *S. cerevisiae* y *K. marxianus* (tabla 7.3).

Tabla 7.3 Velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) y tasa de dilución (D) de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*

| Cepa | μ_{\max} (h ⁻¹) | D (h ⁻¹) |
|----------------------|---------------------------------|----------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | 0.44±0.001 | 0.21±0.06 |
| <i>K. marxianus</i> | 0.55±0.04 | 0.12±0.001 |

En la tabla 7.3 se observa una velocidad de crecimiento mayor por parte de *K. marxianus* en comparación con *S. cerevisiae*. Lo anterior confirma lo reportado por Lane y Morrissey (2010), ellos mencionan que las cepas de *K. marxianus* muestran velocidades de crecimiento elevadas.

Debido a que se desea tener un cultivo en continuo donde la cantidad de nutriente restrinja el crecimiento (*chemostat*). El punto clave de este sistema es el crecimiento del microorganismo y por ello debemos de trabajar a una tasa de dilución (D) en la cual el sistema no será “lavado”, es decir las células no pueden sobrepasar su velocidad de crecimiento máxima (μ_{\max}). Por lo tanto, se empleó la ecuación 2.2 (sección 2.4) del presente trabajo, para calcular D que mantendría a ambas células en crecimiento (Doran 1995; Dunn y col. 2003).

$$\frac{dx}{dt} = 0; \mu = D = \frac{\mu_{\max}S}{K_s+S} \quad (2.2)$$

Al presentar *K. marxianus* una velocidad de crecimiento más elevada es de esperarse que la tasa de dilución fuera más pequeña debido a que tenemos que mantener la población celular estable en un volumen constante, es decir, evitar que el flujo de alimentación y el de salida ocasionen que nuestro sistema sea lavado.

Finalmente, se realizaron pruebas en matraces con jugo de *A. tequilana* Weber var. azul a una concentración inicial de azúcares de 20 g L⁻¹ y como fuente de nitrógeno sulfato de amonio (1 g L⁻¹), adicionando diferentes concentraciones de los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* (0.75, 1.5 y 3.0 mg mL⁻¹). Estas concentraciones se seleccionaron tomando por referencia los resultados obtenidos por Verastegui y col. (2008). Lo anterior, permitió

conocer la concentración con la cual las levaduras son inhibidas y poder establecer los pulsos a los cuales se llevaría a cabo el cultivo en continuo. Por lo tanto, se inocularon los matraces con $1E+06$ cel mL^{-1} , y se tomó muestra transcurridas 12 horas, tiempo en el cual ambas levaduras alcanzan su fase exponencial (anexo 2). En las figura 7.4 y figura 7.5 se muestran la población celular y la concentración de biomasa en ambas cepas de levadura, al adicionar las diferentes concentraciones de los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana ssp. crassispina*.

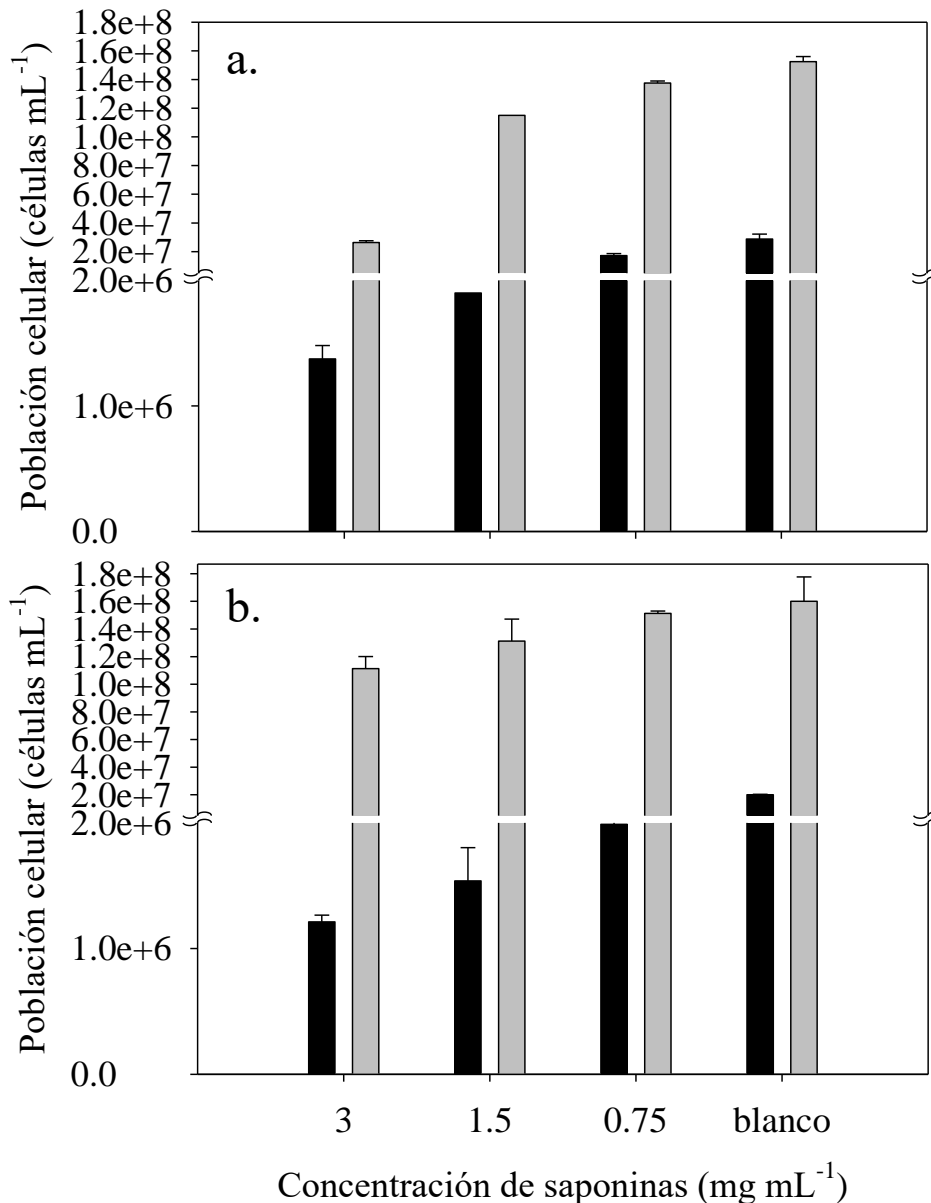


Figura 7.4 Población celular de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* en cultivo batch obtenida a las 12 horas de expuestos con diferentes concentraciones de extracto de saponinas de (a) *Agave durangensis* y (b) *Agave salmiana ssp. crassispina*.

En la figura 7.4 y figura 7.5 se observa que conforme aumenta la concentración de saponinas de ambos extractos la población celular y la biomasa disminuyen, siendo la cepa de *S. cerevisiae* la que presenta una mayor inhibición en su crecimiento. Además, a diferencia de Verastegui y col. (2008) los resultados obtenidos muestran una disminución en el crecimiento al adicionar la concentración más baja de extracto de saponinas de ambas especies de *Agave*.

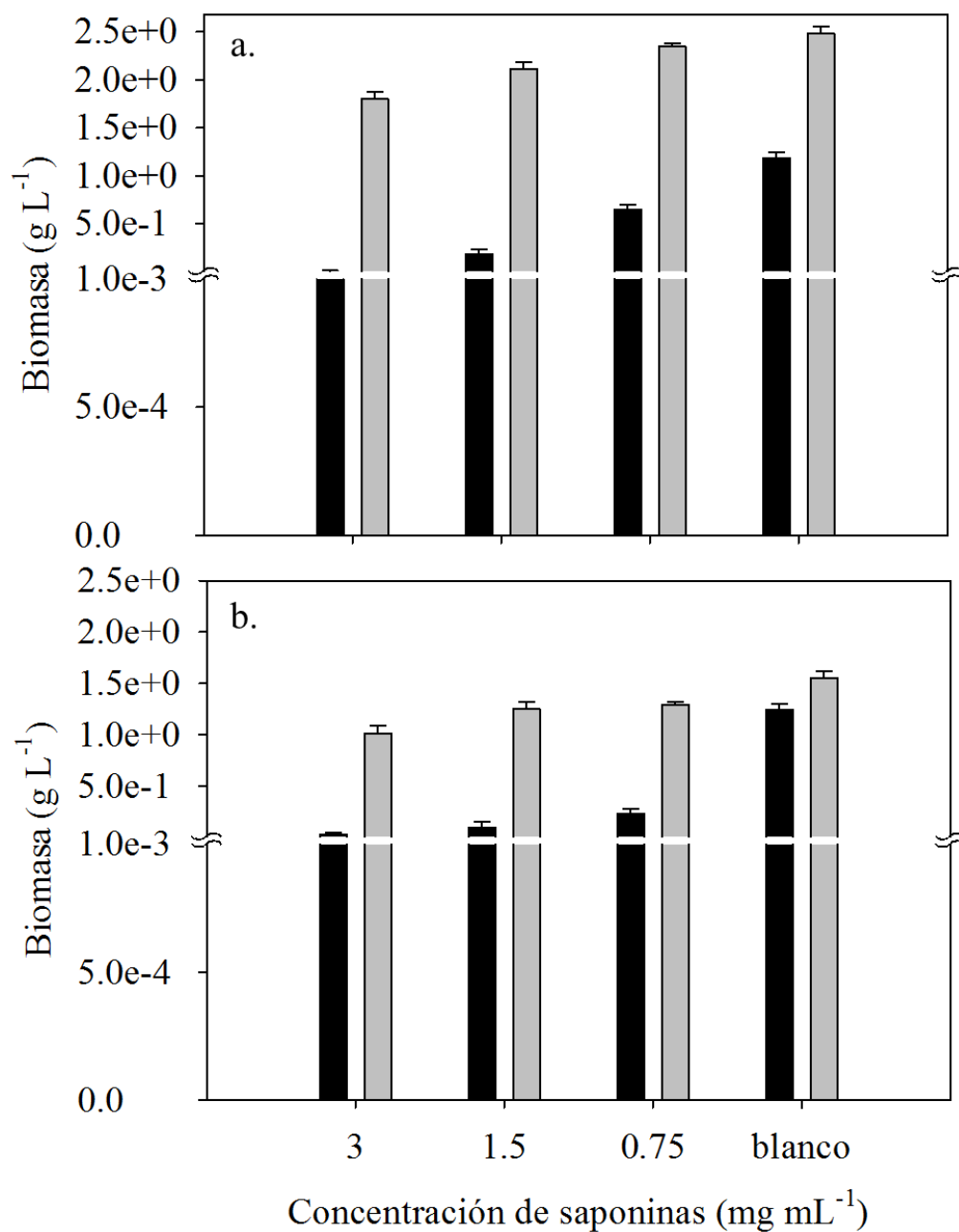


Figura 7.5 Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* en cultivo batch obtenida a las 12 horas de expuestos con diferentes concentraciones de extracto de saponinas de (a) *Agave durangensis* y (b) *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

Existen diversos factores físicos y químicos que pueden ocasionar la inhibición del crecimiento de la levadura, como lo son cambios en la temperatura y pH, presión osmótica o la presencia de

sustancias inhibidoras, como por ejemplo el etanol, acetato, lactato o algunos ácidos orgánicos (Deak 2006; Walker y van Dijck 2006). En el presente trabajo podemos observar que existe una disminución en el crecimiento de ambas cepas de levadura, que se evidencia más al calcular los rendimientos (tabla 7.4) de producción de biomasa en función del consumo de sustrato ($Y_{x/s}$).

Tabla 7.4 Rendimientos de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* en función del consumo de sustrato ($Y_{x/s}$) transcurridas 12 horas de crecimiento, adicionando diferentes concentraciones (0.75, 1.5 y 3.0 mg mL⁻¹) de extracto de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

| <i>Agave</i> | Concentración (mg mL ⁻¹) | Levaduras | |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------|---------------------|
| | | <i>S. cerevisiae</i> | <i>K. marxianus</i> |
| <i>A. durangensis</i> | Blanco | 0.1135±0.01 | 0.8602±0.02 |
| | 0.75 | 0.0941±0.01 | 0.4499±0.01 |
| | 1.5 | 0.0423±0.002 | 0.3553±0.05 |
| | 3.0 | 0.0017±0.00 | 0.1121±0.004 |
| <i>A. salmiana</i> | Blanco | 0.1187±0.02 | 0.8397±0.02 |
| | 0.75 | 0.0329±0.004 | 0.4761±0.01 |
| | 1.5 | 0.0229±0.003 | 0.3190±0.01 |
| | 3.0 | 0.0341±0.005 | 0.1632±0.01 |

En la tabla 7.4, se observa que los rendimientos de biomasa en ambas cepas de levaduras disminuyen conforme se adiciona los extractos de saponinas de ambas especies de agave. No obstante, los rendimientos de *S. cerevisiae* disminuyen en mayor medida cuando se adicionan el extracto de saponinas de *A. durangensis*, mientras en la cepa de *K. marxianus* la disminución de sus rendimientos es similar al agregar las diferentes concentraciones de los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina*. Lo anterior, nos hace suponer cierta resistencia de la cepa de *K. marxianus* con ambos extractos de saponinas.

7.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de las levaduras

Finalmente, se realizaron cultivos en batch para determinar si existen cambios en la pared celular al momento de interactuar con los extractos de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*. Debido a que la pared celular es la primera barrera de entrada selectiva de la célula (Francois 2016). Las muestras que se analizaron por SEM se tomaron a los 10 y 30 minutos de haber adicionado los extractos (3 mg mL^{-1}) en ambas cepas de levadura.

La figura 7.6a presenta la estructura de *Saccharomyces cerevisiae* sin la adición de los extractos de saponinas, y se observa que la pared celular de la levadura es una estructura fibrosa y rugosa (Lipke y Ovalle 1998). Después de 10 minutos de haber agregado los 3 mg mL^{-1} de extracto de saponinas de *A. durangensis*, se observaron algunas invaginaciones y la ruptura de la pared celular de *S. cerevisiae* (figura 7.6b). Mientras que transcurridos 30 minutos *S. cerevisiae* fue capaz de comenzar la regeneración de su pared celular, debido a que se observaron algunas invaginaciones y el protoplasto, pero también partes fibrosas comenzaron a formarse (figura 7.6c), dicha estructura es la característica de los β -glucanos (Osumi 2012).

De acuerdo con Levin (2005) 30 minutos es el tiempo necesario para que *S. cerevisiae* regenere su pared celular cuando sufre stress causado por temperatura o presión osmótica. En el caso del extracto de saponinas de *A. durangensis* se observa que en este tiempo la cepa de *S. cerevisiae* comienza a regenerar su pared celular en un cultivo en batch.

Un comportamiento similar se observó cuando se adicionó el extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina*. Debido a que después de 10 minutos se observó un rompimiento de la pared celular (figura 7.6d). Sin embargo, después de 30 minutos *S. cerevisiae* pudo regenerar su pared celular, debido a que se muestra la restauración completa de la estructura de las β -glucanos (figura 7.6e). Con esta evidencia se confirma que el extracto de saponinas de *A. durangensis* afectó en mayor medida la pared celular de *S. cerevisiae*. Además, de que 30 minutos es tiempo suficiente para que *S. cerevisiae* regenere su pared celular cuando sufre daños por saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* en un cultivo en batch.

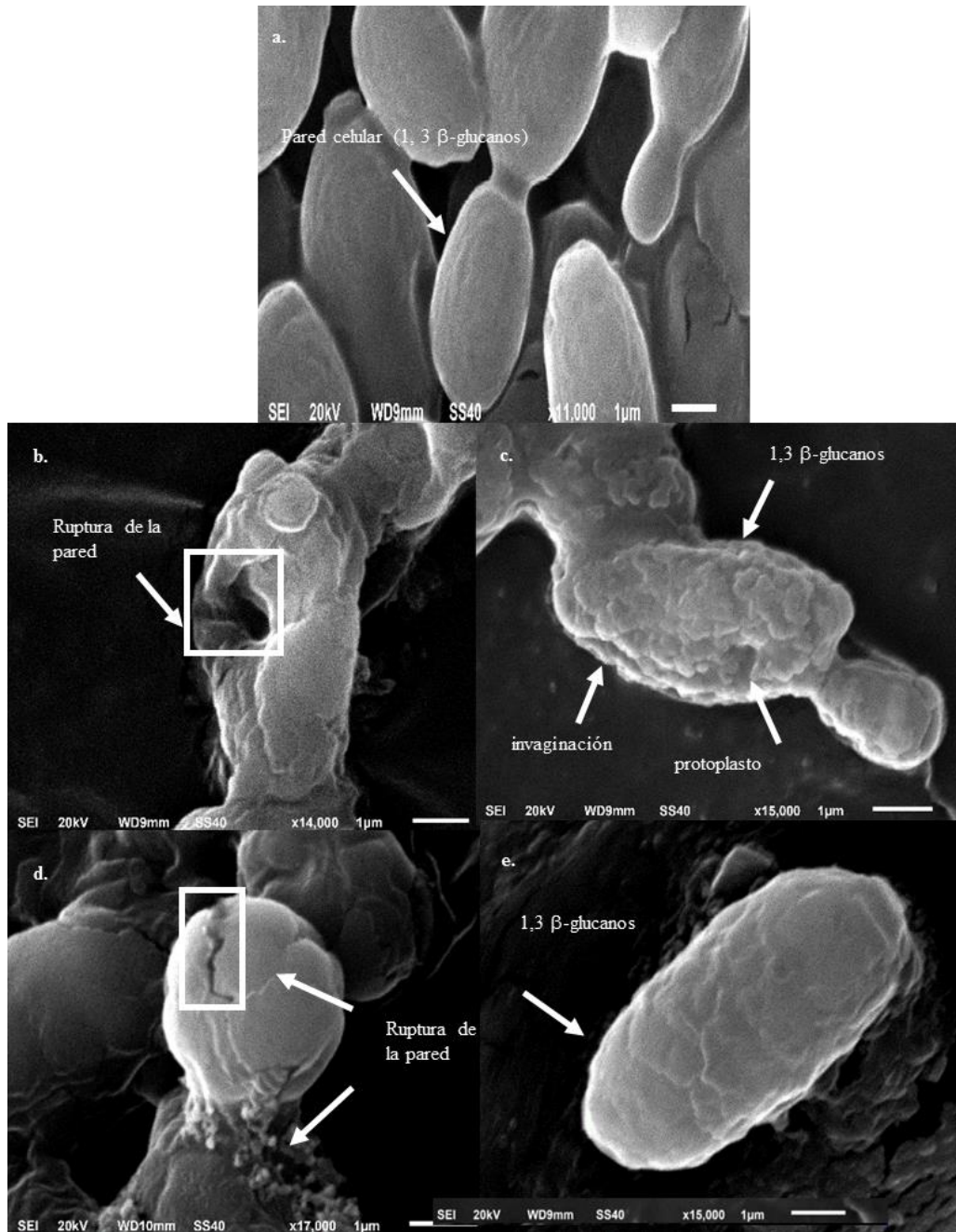


Figura 7.6 Análisis de microscopía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae* (a) sin adicionar extracto de saponinas; (b) 10 minutos y (c) 30 minutos después de agregar 3 mg mL^{-1} de extracto de saponinas de *Agave durangensis*; (d) 10 minutos y (e) 30 minutos después de agregar 3 mg mL^{-1} de extracto de saponinas de *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

En el caso de *Kluyveromyces marxianus*, también presentó una estructura fibrosa y rugosa (figura 7.7a). Sin embargo, se observaron pequeñas invaginaciones después de haber agregado el extracto de saponinas de *A. durangensis* (figura 7.7b), y después de 30 minutos la pared celular se restauró, debido a que se muestran microfibras (β -glucanos) en su estructura (figura 7.7c). También se detectaron cambios en la pared celular de *K. marxianus* cuando se agregó el extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* (figura 7.7d y figura 7.7e) debido a que partes de β -glucanos y protoplasto se observaron a los 10 y 30 minutos después de agregarse el extracto de *A. salmiana* ssp. *crassispina*.

Por lo tanto, ambos extractos afectan en mayor medida la pared celular de *S. cerevisiae* (figura 7.6) ya que se observó el rompimiento de la pared celular 10 minutos después de haber adicionado los extractos de saponinas de ambas especies de *Agave*. Mientras que *K. marxianus* (figura 7.7) en este mismo periodo de tiempo, sólo presentó pequeñas invaginaciones y partes del protoplasto cuando se agregaron los extractos de saponinas de ambas especies de *Agave*.

Por lo anterior, se optó por trabajar los cultivos en continuo a con una concentración inicial de azúcares de 20 g L^{-1} , con las tasas de dilución que se presentan en la tabla 7.3 y emplear las concentraciones de 0.75, 1.5 y 3 mg mL^{-1} de extracto de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina*.

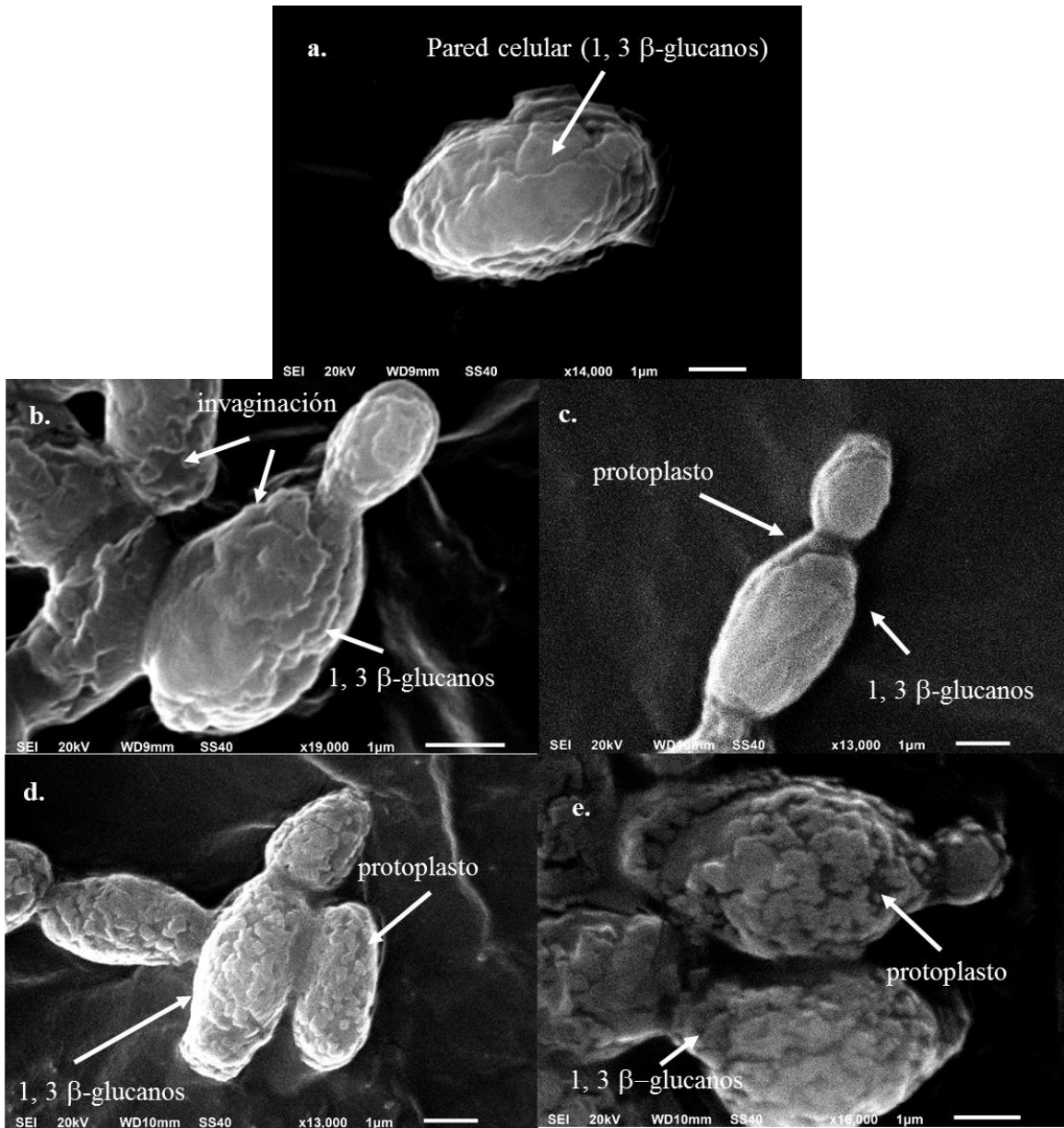


Figura 7.7 Análisis de microscopía electrónica de barrido de *Kluyveromyces marxianus* (a) sin adicionar extracto de saponinas; (b) 10 minutos y (c) 30 minutos después de agregar 3 mg mL^{-1} de extracto de saponinas de *Agave durangensis*; (d) 10 minutos y (e) 30 minutos después de agregar 3 mg mL^{-1} de extracto de saponinas de *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

7.5 Cultivo en continuo

Se realizaron cinéticas en cultivo continuo con el objetivo de conocer el efecto de los extractos de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina* en el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*, así como en la composición de su pared y membrana celular. Por lo anterior, se monitoreó su crecimiento celular empleando técnicas como el conteo al microscopio, se cuantificó la biomasa por peso seco, y se monitoreó el CO₂ producido por la levadura, además de cuantificar los azúcares reductores.

La figura 7.8 muestra el efecto de los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* en el crecimiento de *S. cerevisiae*. Cuando el cultivo alcanzó cinco estados de residencia ($10\text{E}+06 \pm 1.1$ cel mL⁻¹ y 0.27 ± 0.01 g L⁻¹), se realizaron pulsos de extracto de saponinas de *A. durangensis* (0.75, 1.5 y 3 mg mL⁻¹), y se observó una disminución en la población celular, la biomasa y el porcentaje de CO₂ 10 minutos después de haber realizado cada pulso, lo que indica que posiblemente exista una inhibición en el crecimiento de *S. cerevisiae*. Al final del cultivo del cultivo la población celular y la concentración de biomasa fueron de $23.3\text{E}+06 \pm 1.1$ cel mL⁻¹ y 1.0 ± 0.1 g L⁻¹ respectivamente (figura 7.8a). Este mismo fenómeno también se observó con los pulsos de extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina*, que comenzó con un estado estacionario cuya población celular y biomasa fueron de $15.8\text{E}+06 \pm 1.1$ cel mL⁻¹ y 0.7 ± 0.001 g L⁻¹ respectivamente, la concentración final del cultivo alcanzó una población celular de $28.3\text{E}+06 \pm 1.8$ cel mL⁻¹ y de biomasa de 1.1 ± 0.16 g L⁻¹ (figura 7.8b).

Por lo tanto, se prosiguió a calcular el IC₅₀ que es la concentración máxima inhibitoria de ambos cultivos, donde el extracto de saponinas de *A. durangensis* mostró un efecto mayor de inhibición de crecimiento (IC₅₀= 2.4 ± 0.1 mg mL⁻¹) en comparación con el extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* (IC₅₀= 1.6 ± 0.1 mg mL⁻¹) en *S. cerevisiae*. Esta inhibición también se confirma debido a que cuando se adicionó el pulso de 3 mg mL⁻¹ del extracto de saponinas de *A. durangensis*, se observó una acumulación de azúcares residuales (figura 7.8a).

En un reactor en continuo el medio es suministrado continuamente al reactor para sostener el crecimiento de la población celular, y el producto es removido también continuamente del reactor para alcanzar un volumen constante de operación. La velocidad de remoción es caracterizada por la tasa de dilución (D), que es recíproca a los tiempos de residencia del reactor. El efluente de salida del reactor no solo contiene el producto o metabolito de interés, sino que también contiene

sustrato que no fue utilizado por el microorganismo, biomasa celular y varios metabolitos producidos por la célula. El sistema continuo suministrado en el presente trabajo, suministra un flujo constante de medio de cultivo (jugo de *Agave tequilana*), y se esperaba maximizar el estado estacionario de la población celular en ausencia de factores externos que perturben dicho sistema (Henson 2003). No obstante, al adicionar los pulsos de extracto de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* se observa que el sistema sufre una afectación, debido a la disminución en la población celular y biomasa. En algunos reportes, esta disminución en la concentración de biomasa y población celular se observa cuando las células de levadura sufren diferentes tipos de estrés como lo es por un aumento en su temperatura o en la presencia de inhibidores como furfural (Henson 2003; Tibaylenc y col. 2010). Aunque hasta el momento no existen reportes del efecto de las saponinas en un cultivo en continuo, un comportamiento similar se observó cuando cepas de *Candida albicans* fueron tratadas con extracto de saponinas de *Sapindus saponaria*, debido a que 10 minutos después de su tratamiento la cantidad de células en el cultivo batch comenzó a disminuir (Shinobu-Mesquita y col. 2015). Sin embargo, a diferencia de los resultados reportados por Shinobu-Mesquita y col. el cultivo en continuo permitió observar que las levaduras podían recuperarse de dicha inhibición debido a la alimentación continua de azúcares. Lo anterior, se puede observar debido a que en el medio se mantiene una concentración mínima de azúcares, lo que nos hace confirmar que la levadura los está consumiendo para su crecimiento y que la disminución de biomasa, población celular y CO₂ se debe a los pulsos de las saponinas, y no a un posible lavado debido a que las tasas de dilución no fueran las adecuadas. Por lo tanto, se puede concluir que la inhibición por saponinas comienza a partir de los 10 minutos de haber adicionado el extracto en *S. cerevisiae* (figura 7.8).

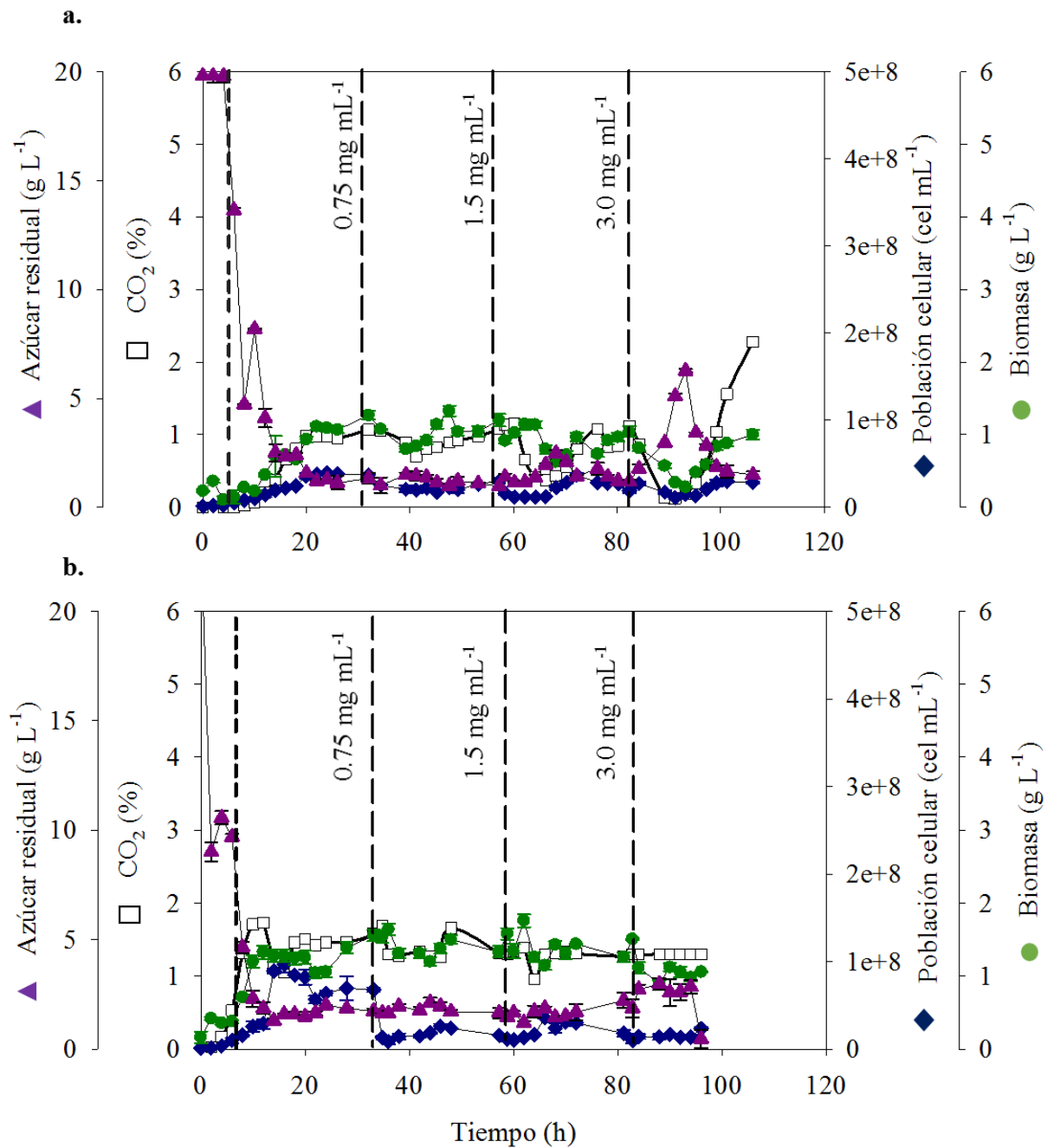


Figura 7.8 Cultivo en continuo de *Saccharomyces cerevisiae*, - - - inicio del cultivo, - - - pulsos de extractos de saponinas (a.) *Agave durangensis* y (b) *Agave salmiana* ssp. *crassispina*; □ CO₂ (%), ◆ población celular (cel mL⁻¹), ● biomasa (g L⁻¹) y ▲ azúcar residual (g L⁻¹)

La figura 7.9 muestra el efecto de los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* en el crecimiento de *K. marxianus*. El cultivo en continuo comenzó cuando la levadura alcanzó una población celular de $19.8\text{E}+06 \pm 0.3 \text{ cel mL}^{-1}$ y una concentración de biomasa de $0.7 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$.

Cuando se adicionó el primer pulso (0.75 mg mL^{-1}) de extracto de saponinas de *A. durangensis*, se observó una disminución en la población celular, biomasa y porcentaje de CO_2 , que se mantuvo sin cambios cuando se adicionaron los otros dos pulsos. Al final del cultivo, la población celular fue de $167.5\text{E}+06 \pm 3.5 \text{ cel mL}^{-1}$ y biomasa de $1.4 \pm 0.29 \text{ g L}^{-1}$ (figura 7.9a). En el caso del extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina*, el cultivo en continuo inició con una población celular y una concentración de biomasa de $20.5\text{E}+06 \pm 1.5 \text{ cel mL}^{-1}$ y $0.6 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente. También se observó una inhibición en el crecimiento cuando se adicionó el primer pulso de extracto (0.75 mg mL^{-1}). Al final del cultivo la población celular fue de $196.3\text{E}+06 \pm 2.4 \text{ cel mL}^{-1}$ y la concentración de biomasa fue de $1.8 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ (figura 7.9b). Lo anterior también demuestra que el extracto de saponinas de *A. durangensis* inhibe ($\text{IC}_{50} = 1.40 \pm 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$) en mayor medida el crecimiento de *K. marxianus* que el extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* ($\text{IC}_{50} = 1.30 \pm 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$).

Finalmente, se observó que *K. marxianus* presentó concentraciones elevadas en su población celular y biomasa. De acuerdo con algunos estudios (Killen y col. 1988; Miyakoshi y col. 2000), la actividad antimicrobiana de las saponinas es inversamente proporcional a la biomasa y a la densidad celular del organismo objetivo; a altas densidades celulares cada célula lleva una concentración baja de saponinas, que puede no cumplir con los requerimientos necesarios para la formación de poros responsable de la inhibición celular. Por lo tanto, *K. marxianus* al presentar una mayor concentración de células y biomasa presentó una mayor resistencia a los pulsos de saponinas en comparación con *S. cerevisiae*.

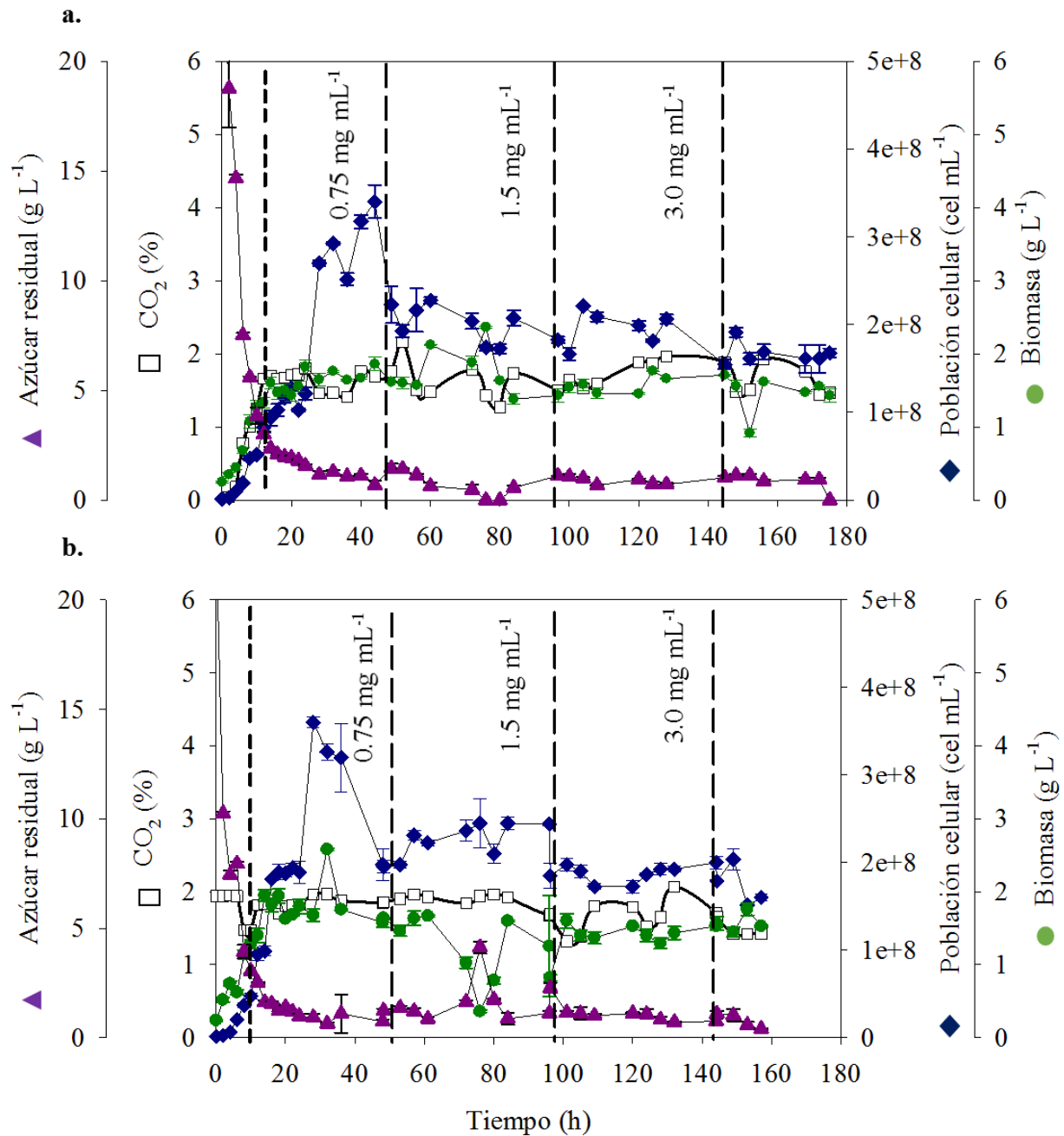


Figura 7.9 Cultivo en continuo de *Kluyveromyces marxianus*, - - - inicio del cultivo, - - - pulsos de extractos de saponinas (a.) *Agave durangensis* y (b) *Agave salmiana* ssp. *crassispina*; □ CO_2 (%), ◆ población celular (cel mL^{-1}), ● biomasa (g L^{-1}) y ▲ azúcar residual (g L^{-1})

Para conocer si existe alguna diferencia en la conformación de la pared y membranas celulares de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* por efecto de los extractos de saponinas de ambas especies de agaves,

se analizaron los polisacáridos de la pared celular y los lípidos de la membrana celular de ambas levaduras.

7.5.1 Composición de la pared celular

El análisis de la pared celular se desarrolló al fraccionar la pared celular de las levaduras en tres partes, al separar los componentes de la pared celular de acuerdo a su solubilidad para un mejor análisis, con el método descrito por Nguyen y col. (1998). La concentración de N-acetilglucosamina (quitina) fue muy baja (menos del 1% w/w) y no presentó ningún cambio significativo en ambas levaduras. Sin embargo, la concentración de 1, 3 β -glucanos, 1, 6 β -glucanos y mananos se vio afectada por la adición de los tres pulsos de los extractos de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

En el experimento control (sin adición de saponinas), se observó que *Kluyveromyces marxianus* contiene una concentración más alta de 1, 3 β -glucanos y mananos que *Saccharomyces cerevisiae*. Ambas cepas presentaron la misma concentración de 1, 6 β -glucanos (figura 7.10).

En *S. cerevisiae* la concentración de 1, 3 β -glucanos y 1, 6 β -glucanos disminuye un 83.3% y un 95% respectivamente cuando se realizó el primer pulso (0.75 mg mL⁻¹) del extracto de saponinas de *A. durangensis*. No obstante, cuando se realizaron los otros dos pulsos la concentración de 1, 3 β -glucanos comenzó a incrementarse, mientras que la concentración de 1, 6 β -glucanos permaneció constante, al igual que la concentración de los mananos (figura 7.10a). Con el primer pulso (0.75 mg mL⁻¹) de extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* la concentración de 1, 3 β -glucanos disminuyó un 46.7 % en *S. cerevisiae* y continuó cayendo un 18.3% al realizarse los otros dos pulsos. La concentración de los 1, 6 β -glucanos cayó un 80% en comparación con el control y se incrementó gradualmente hasta recuperarse en un 55% con el último pulso. En el caso de la concentración de los mananos está se incrementó un 50% con el primer pulso de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina*, pero regresó a su concentración original (control) al final del cultivo (figura 7.10b).

En los cultivos con *K. marxianus* con los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* la concentración de 1, 3 β -glucanos y 1, 6 β -glucanos decrece aproximadamente

un 80% y un 30% respectivamente con el primer pulso (0.75 mg mL^{-1}). Sin embargo, ambos polímeros mantienen su concentración cuando se adicionan los otros dos pulsos (figura 7.10c y figura 7.10d). Aunque, la concentración de mananos cambia de diferente manera con ambos extractos. Con los pulsos de saponinas de *A. durangensis* la concentración de mananos disminuye 66.7% con el primer pulso, pero comienza a incrementarse cuando se agregaron los otros dos pulsos (1.5 y 3 mg mL^{-1}) hasta alcanzar la concentración del control (figura 7.10c). Mientras que con los pulsos del extracto de saponinas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* la concentración de mananos en *K. marxianus* decrece un 33% y se mantiene constante durante todo el cultivo (figura 7.10d).

En ambas cepas de levadura existe una disminución de la concentración de los polisacáridos de la pared celular (figura 7.10) cuando se adiciona el primer pulso de los extractos de saponinas de agave. Sin embargo, cuando se adicionan los otros dos pulsos el comportamiento es las cepas es distinto dependiendo del tipo de extracto que se esté adicionando, lo anterior se puede deber a que la concentración de los polisacáridos de la pared celular en las levaduras puede variar de acuerdo a las condiciones del cultivo, a los procesos de crecimiento o fermentación y/o a los antecedentes de la cepa (Francois, 2016). En este sentido, se podría concluir que las cepas de levadura modificaron la conformación de la pared celular en función de los cambios externos que sufría el medio al adicionar el extracto de saponinas.

Por otro lado, Keukens y col. (1995) observaron que cuando se agregan cadenas de azúcares a las membranas lipídicas la interacción esterol-saponina exhibe una curvatura más pronunciada. En este trabajo la pared celular de ambas levaduras mostró diferencias en su conformación (figura 7.10) al momento de adicionarle los diferentes pulsos de extracto de saponinas. Lo anterior se puede deber a que posiblemente la parte glicosídica de la saponina interactúe con los β -glucanos de la pared celular (anexo 3). Debido a que cuando se realizaron los pulsos de los extractos de saponinas, ambas cepas exhibieron cambios en la conformación manano/ 1, 3 β -glucano y manano/ 1, 6 β -glucano (tabla 7.5). Por lo tanto, se puede suponer un rompimiento entre estos polímeros y por lo tanto una remodelación de la estructura de la pared celular de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* (Cabib y Arroyo, 2013), causando una curvatura más pronunciada en la formación del poro en la célula y por consiguiente su inhibición en el crecimiento.

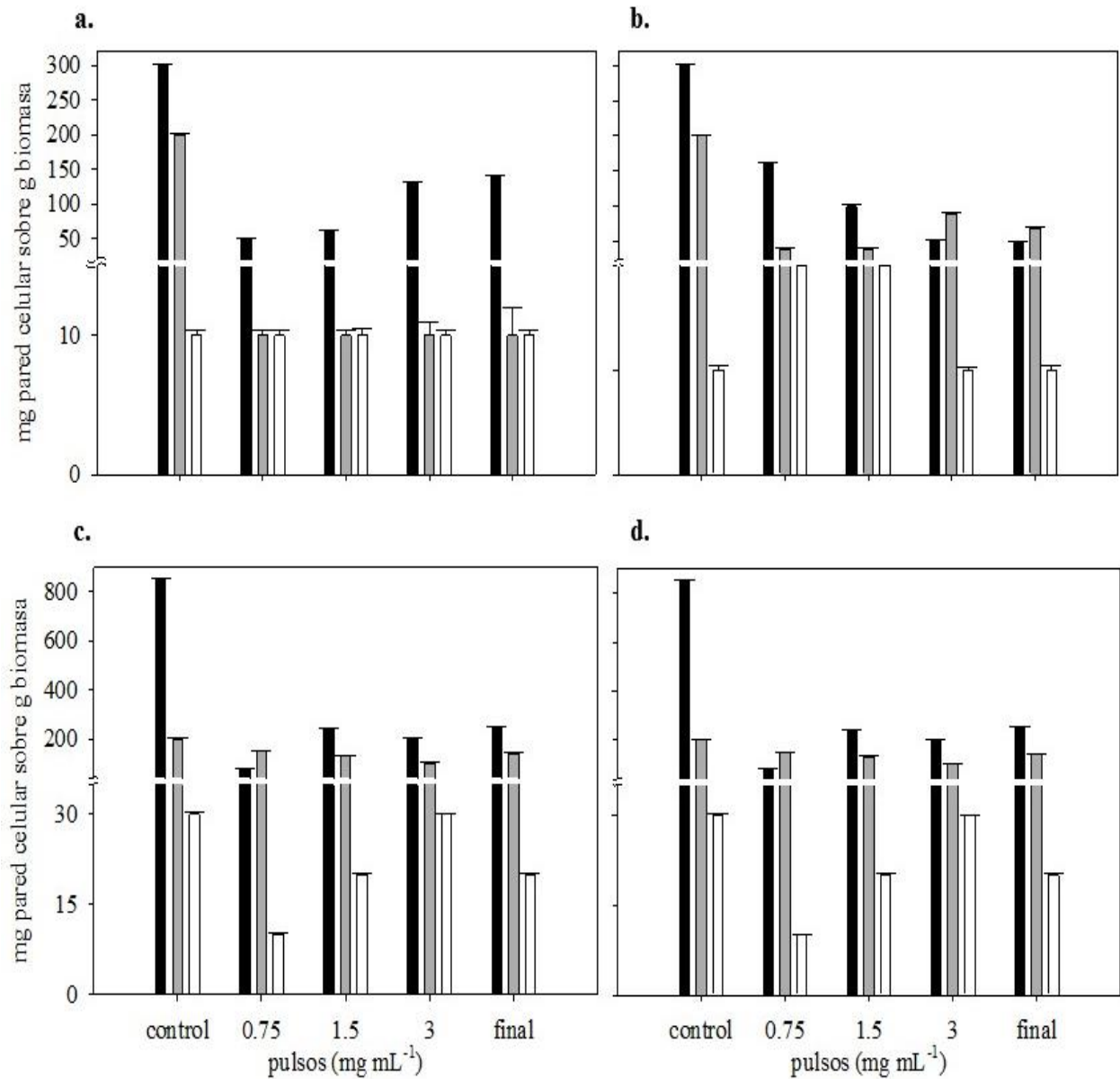


Figura 7.10 Concentración de los polisacáridos de la pared celular ■ 1, 3 β–glucanos, ▨ 1, 6 β–glucanos y □ mananos (mg sobre g de biomasa) en *Saccharomyces cerevisiae* 10 minutos después de haber aplicado los pulsos de (a) *Agave durangensis* y (b) *Agave salmiana ssp. crassispina* y en *Kluyveromyces marxianus* 10 minutos después de haber aplicado los pulsos de (c) *A. durangensis* y (d) *A. salmiana ssp. crassispina*.

Tabla 7.5 Relación de los polisacáridos de la pared celular sin saponinas (control), 10 minutos después de haber realizado los pulsos (0.75, 1.5 y 3 mg mL⁻¹) de los extractos de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, y al final de los cultivos en continuo (*S. cerevisiae* = 100 horas; *K. marxianus* = 175 horas).

| Levadura Pulso (mg mL ⁻¹) | | <i>A. durangensis</i> | | | | | <i>A. salmiana</i> | | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|------|------|------|------|--------------------|------|------|------|------|
| | | control | 0.75 | 1.5 | 3 | fin | control | 0.75 | 1.5 | 3 | fin |
| <i>S. cerevisiae</i> | Manano: 1-3 β glucano | 1:30 | 1:5 | 1:6 | 1:13 | 1:14 | 1:30 | 1:8 | 1:5 | 1:5 | 1:5 |
| | Manano: 1-6 β glucano | 1:20 | 1:1 | 1:1 | 1:1 | 1:1 | 1:20 | 1:4 | 1:4 | 1:9 | 1:7 |
| <i>K. marxianus</i> | Manano: 1-3 β glucano | 1:28 | 1:8 | 1:12 | 1:7 | 1:13 | 1:28 | 1:13 | 1:12 | 1:14 | 1:10 |
| | Manano: 1-6 β glucano | 1:7 | 1:5 | 1:7 | 1:3 | 1:7 | 1:7 | 1:6 | 1:7 | 1:7 | 1:7 |

Se realizó un análisis estadístico para confirmar si las cepas de levadura, la especie de *Agave*, la concentración de extracto de saponinas y la interacción entre ellas afectan la concentración de los β-glucanos y mananos (tabla 7.6). Se observó que existe una diferencia estadística significativa ($p\text{-value}<0.05$) en la conformación de los polisacáridos de la pared celular en relación con el tipo de cepa. También, existe una diferencia estadística significativa ($p\text{-value}<0.05$) en la interacción de la cepa de levadura y la especie de *Agave* en la concentración de mananos, Klis y colaboradores (2006) mencionan que los mananos juegan un papel importante en las funciones sensoriales de la levaduras, que son la identificación de nutrientes o toxinas. En el presente trabajo, se observa que de acuerdo a la especie de *Agave* la concentración de mananos se ve afectada, lo anterior se podría deber a los diferentes tipos de saponinas y otros nutrientes presentes en ambas especies de *Agave*. Finalmente, la especie de *Agave* presenta una diferencia estadística significativa ($p\text{-value}<0.05$) en la producción de 1, 6 β-glucanos. Este polímero es responsable de estabilizar toda la estructura de la pared celular en la levadura (Klis y col. 2006). Por lo tanto, se observó que de acuerdo con la especie de *Agave*, y posiblemente con la estructura de las saponinas, se afecta la concentración y

la conformación de la pared celular de las levaduras, en donde la parte glicosídica de las saponinas juega un importante papel en el efecto antimicrobiano de las saponinas (Yang y col. 2006).

Tabla 7.6 *P-values* registrados obtenidos del análisis de varianza de las cepas de levadura, la especie de *Agave*, la concentración del extracto de saponinas y la interacción entre ellos: AB (levadura-*Agave*), AC (levadura-concentración de extracto) y BC (*Agave*-concentración de extracto), de cómo afectan la concentración de los β -glucanos y mananos de la pared celular.

| Fuente | 1, 3 β -glucanos | Mananos | 1, 6 β -glucanos |
|-------------------------------|------------------------|---------|------------------------|
| A: Levadura | 0.00 | 0.01 | 0.00 |
| B: <i>Agave</i> | 0.83 | 0.88 | 0.01 |
| C: concentración del extracto | 0.07 | 0.25 | 0.18 |
| AB | 0.09 | 0.01 | 0.35 |
| AC | 0.36 | 0.88 | 0.66 |
| BC | 0.69 | 0.46 | 0.08 |

Finalmente, debido a que ambas cepas de levadura presentan diferencias estadísticas en la conformación de los polímeros (tabla 7.6) cuando se les adicionó los pulsos de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina*, aunado al hecho de que existen algunos microorganismos que presentan actividad saponinasa y que dicha actividad puede estar relacionada con la conformación de la pared celular (Bernards y col. 2011). Se realizó un ensayo para determinar si existe actividad saponinasa en ambas cepas de levadura.

7.5.2 Actividad saponinasa

Los pulsos de extracto de saponinas de *Agave durangensis* no generaron actividad saponinasa en el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 7.11a). Sin embargo, se observó actividad

saponinasa al adicionarse los pulsos de *Agave salmiana* ssp. *crassispina* (0.75 y 1.5 mg mL⁻¹) en los cultivos de *S. cerevisiae* (figura 7.11b). En este contexto, existe evidencia de que algunas cepas de *S. cerevisiae* presentan actividad β -glucosidasa en casos y condiciones particulares (Rosi y col. 1994). Por lo tanto, es posible que la cepa de *S. cerevisiae* empleada en este estudio presente este tipo de actividad sólo para algunas saponinas que están presentes en el extracto de *A. salmiana* ssp. *crassispina*.

En el caso de *Kluyveromyces marxianus*, presentó actividad saponinasa con ambos extractos de saponinas, que se incrementó conforme la concentración de extracto de saponinas de *A. durangensis* aumentaba (figura 7.11c) y permaneció constante con los pulsos de extracto de saponina de *A. salmiana* ssp. *crassispina* (figura 7.11d). También en el caso de *K. marxianus* se ha reportado que algunas cepas pueden producir varias enzimas, como las β -glucosidasas (Barron y col. 1995; Lane y Morrissey 2010). En este caso, *K. marxianus* induce actividad saponinasa en los dos extractos de *Agave*; lo que contribuye a reducir el efecto inhibitorio de las saponinas, aunado a las altas cantidades de producción celular que se generaron en los cultivos en continuo.

Es importante mencionar que cuando *S. cerevisiae* y *K. marxianus* presentaron actividad enzimática la concentración de mananos también aumentó. Por lo que, es posible que exista una relación directa entre síntesis de mananos y la actividad saponinasa (figura 7.11).

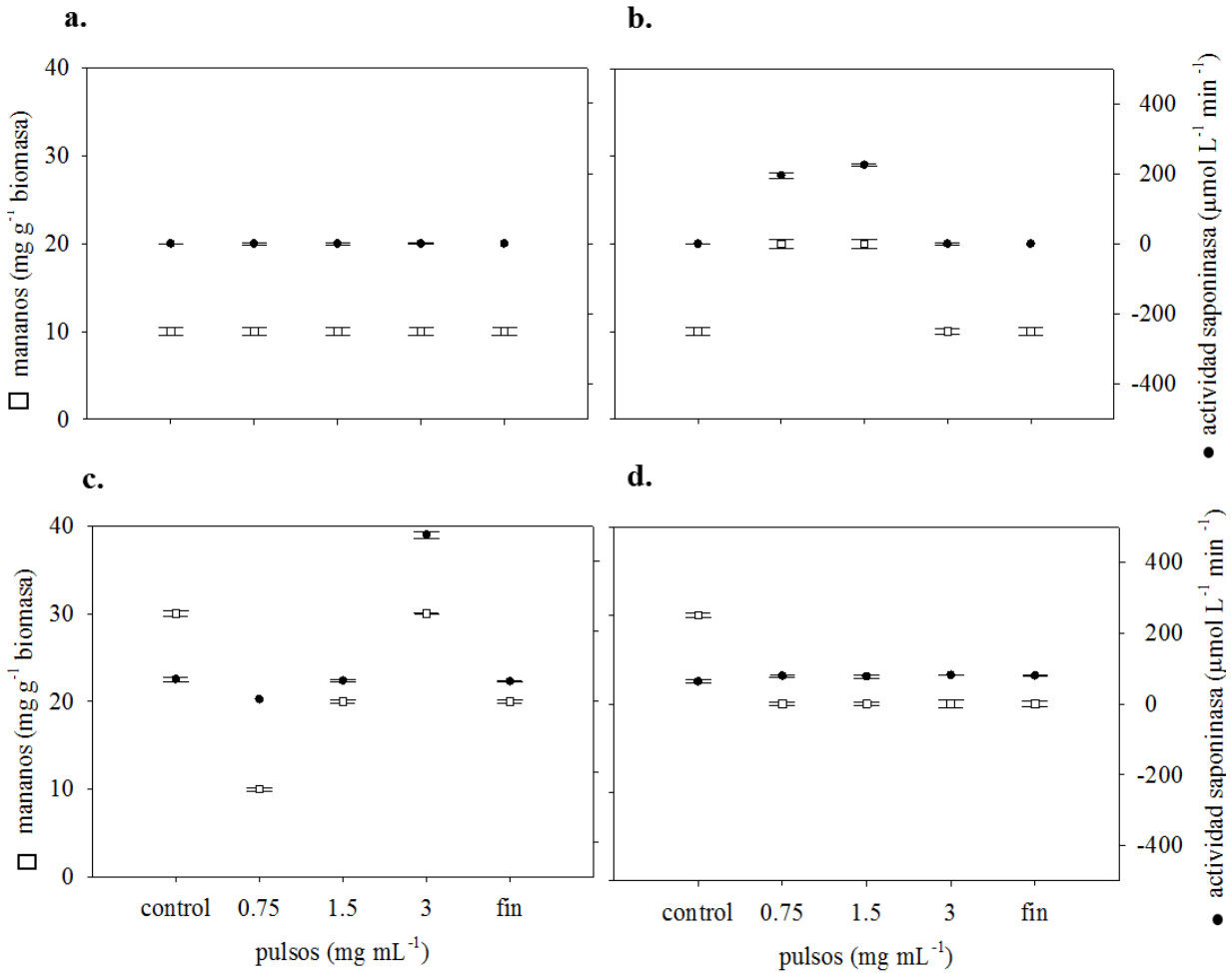


Figura 7.11 Concentración de mananos □ (mg sobre g de biomasa) y actividad saponinasa ● ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) en *Saccharomyces cerevisiae* 10 minutos después de haber aplicado los pulsos de (a) *Agave durangensis* y (b) *Agave salmiana ssp. crassispina* y en *Kluyveromyces marxianus* 10 minutos después de haber aplicado los pulsos de (c) *A. durangensis* y (d) *A. salmiana ssp. crassispina*.

7.5.3 Composición de la membrana celular

Además de los cambios observados en la pared celular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*, también se analizó el efecto del extracto de saponinas de ambas especies de *Agave* en la composición de lípidos de la membrana celular, particularmente en los fosfolípidos, debido a que son las moléculas más adaptables en lo que se refiere a la respuesta a los cambios ambientales, ya que tanto las cadenas de acilo como sus cabezas polares pueden alterar su conformación ayudando a la estabilidad y a la fluidez de la bicapa (Russell y col. 1995).

Se utilizó la espectrometría de masas (Q-TOF) acoplada a cromatografía de líquidos (figura 7.12). Se observó que los ácidos grasos saturados que predominaron en ambas cepas de levadura fueron: el ácido palmítico (C 16:0) y el esteárico (C 18:0), mientras que los ácidos grasos insaturados predominantes fueron el ácido palmitoleico (C 16:1) y oleico (C 18:1). También se encontró en menor proporción el ácido linoleico (C 18:2). Lo anterior, es consistente a estudios previos en donde mencionan que estos son los ácidos mayoritarios en la membrana celular de las levaduras (Ratray y col. 1975; Van der Rest y col. 1995; Blogovic y col. 2001; Xia y Yuan 2009).

Los fosfolípidos mayoritarios encontrados en *S. cerevisiae* fueron: la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE). En el caso de *K. marxianus* además de contar con PC y PE como fosfolípidos mayoritarios, también se observó la presencia de fosfatidilserina (PS) y trazas de ácido fosfatídico (PA).

También se observó que cuando se realizaron los pulsos de ambas especies de *Agave* se redujo la longitud de las cadenas acilo y disminuyó su saturación en ambas cepas de levadura (tabla 7.7). Dichos cambios causan una mayor permeabilidad en las células (Turk y col. 2011).

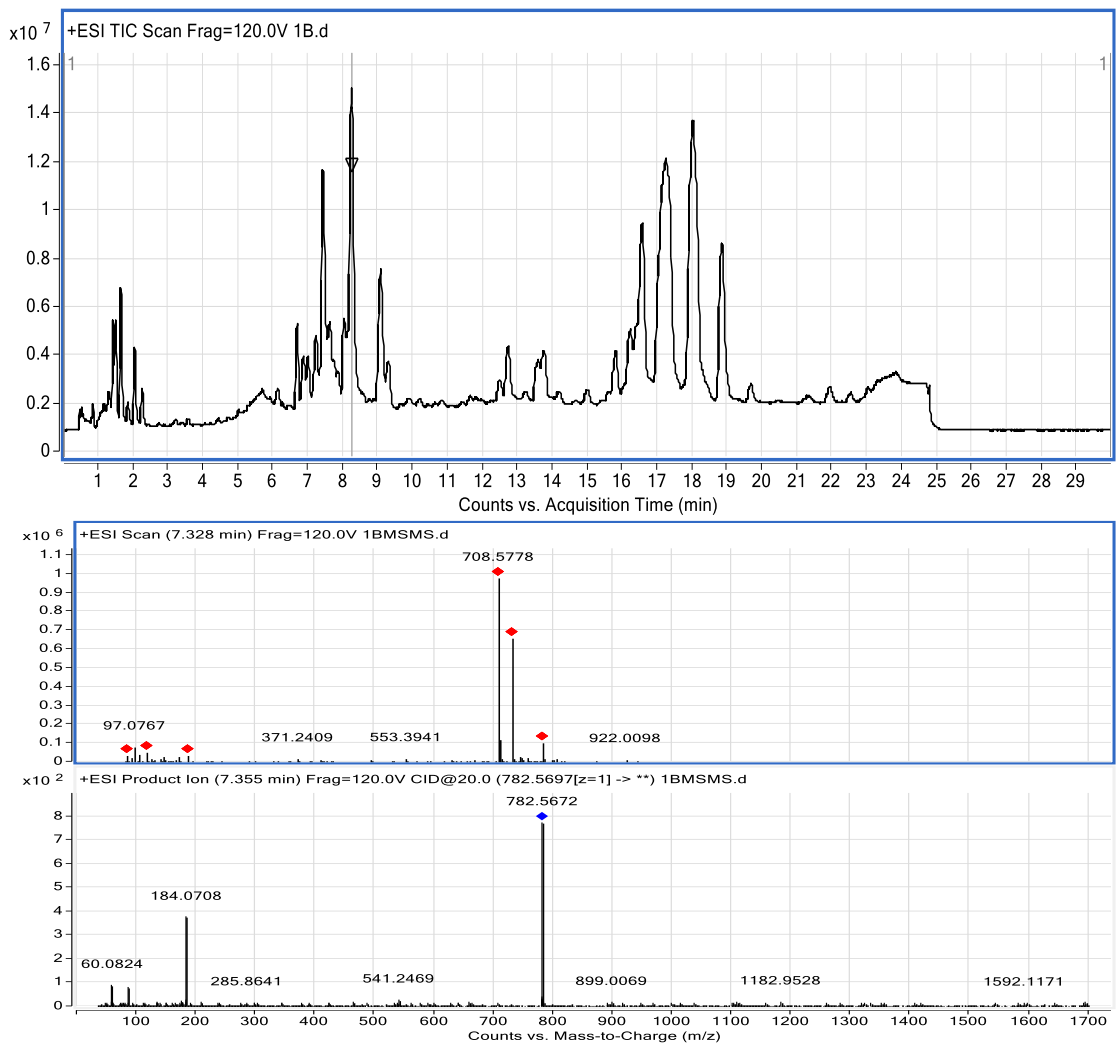


Figura 7.12 Cromatograma y espectro de masas (UPLC Q TOF MS/MS) de *Kluveromyces marxianus* al adicionar el extracto de saponinas de *Agave durangensis* (0.75 mg mL^{-1})

En la tabla 7.7 se presentan la conformación de los fosfolípidos de membrana celular de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* 10 minutos después de haber adicionado los pulsos de los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* (0.75 y 3 mg mL^{-1}). Se observó cambios en la conformación de la membrana celular de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* al adicionar los pulsos de extracto de ambas especies de *Agave*. Aunque se sabe que la interacción saponina-esterol es la causante de la formación de poros en la membrana celular (Glauert y col. 1962; Keukens y col. 1995; Lin y Wang 2010; Augustin y col. 2011), los fosfolípidos de la membrana

celular son un componente importante para la fluidez y permeabilidad de la membrana, y hasta el momento no se ha reportado el efecto de las saponinas en su composición. Sin embargo, comparado con otros estudios en donde demuestran que la levadura al someterse a condiciones estresantes como lo es los cambios de temperatura y la adición de ciertos inhibidores (fenol, furfural, ácido acético) modifican su estructura originando una mayor permeabilidad al acortar las cadenas de hidrocarburos y al aumentar su insaturación (Schneiter y col. 1999; Ejsing y col. 2009; Xia y Yuan 2009; Tronchoni y col. 2012). Estos mismos efectos se pueden observar al adicionar los extractos de saponinas de *A. durangensis* y *A. salmiana* ssp. *crassispina*.

En el caso de *S. cerevisiae* destaca la presencia de cadenas cortas y medianas de hidrocarburos que no se observaron en los reportes previos por efectos de la temperatura o la adición de inhibidores (Ejsing y col. 2009; Xia y Yuan 2009), así como también una mayor insaturación en las cadenas de hidrocarburos y el aumento de PE. En este contexto Var der Rest y col. (1995) encontraron que el aumento de este fosfolípido ocasiona una mayor curvatura en la membrana lo que facilita su fluidez, lo que lleva a suponer que las saponinas de agave de ambos extractos no sólo interactúan con el ergosterol de la membrana, sino que también existe una modificación en la estructura de los carbohidratos de la pared celular, y de los fosfolípidos de la membrana celular que ayudan a favorecer esta interacción y por ende la inhibición en el crecimiento de la levadura (anexo 3).

En el caso de *K. marxianus* se observa la presencia de PS y trazas de PA. Existen reportes que mencionan que la existencia de PS en la membrana de las levaduras es un marcador para decir que esta es tolerante al etanol (Blagovic y col. 2001), y que la presencia de PA de cadenas insaturadas muestra una tolerancia al ácido acético (Xia y Yuan 2009). Por lo que se puede suponer que la presencia de ambos fosfolípidos se pueda deber a una respuesta adaptativa a la presencia de las saponinas, ya que estas moléculas al ser solubles en agua por sus cadenas de azúcares presentan cierto carácter hidrofílico al igual que el etanol y el ácido acético. Por lo tanto, *K. marxianus* no sólo podría ser una levadura tolerante al etanol (Lane y Morrissey 2010), sino que también es tolerante a las saponinas de *Agave* (anexo 4).

Tabla 7.7 Conformación de lípidos de la membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* 10 minutos después de adicionar los pulsos (0.75 y 3 mg mL⁻¹) de extractos de saponinas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina*; monoacilglicerofosfolinas (LPC), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), y diacilglicerol (DG)

| Levadura | <i>Agave</i> | Lípidos | |
|--|--|--------------------------|-----------------------|
| | | 0.75 mg mL ⁻¹ | 3 mg mL ⁻¹ |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>A. durangensis</i> | | DG 16:1-20:1 |
| | | PC 16:1-16:1 | |
| | | PE 16:1-16:1 | |
| | | PE 16:1-18:1 | |
| | | LPC 16:1 | LPC 16:1 |
| | <i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | DG 16:0-18:2 | DG 16:0-18:2 |
| | | | DG 16:1-18:1 |
| | | | DG 16:0-18:1 |
| | | PC 16:1-16:1 | PC 16:1-16:1 |
| | | PC 16:1-18:1 | PC 16:1-18:1 |
| | | | PC 18:1-18:1 |
| | | PE 16:1-16:1 | PE 16:1-16:1 |
| | | PE 16:0-16:1 | |
| | | PE 16:1-18:1 | PE 16:1-18:1 |
| | | | PE 16:0-18:1 |
| | PE 18:1-18:1 | | |
| | LPC 16:1 | | |
| | LPC 18:1 | | |
| | LPC 18:0 | | |
| | DG 16:0-18:2 | | |
| | DG 16:1-18:1 | | |
| <i>K. marxianus</i> | <i>A. durangensis</i> | PA 26:1 | |
| | | PC 16:1-16:1 | |
| | | PC 16:0-18:1 | |
| | | PC 16:1-18:1 | |
| | | PE 17:1-17:1 | |
| | | PE 16:0-18:1 | |
| | | PS 16:1-16:1 | |
| | | PS 16:0-18:2 | |
| | | PS 16:0-18:1 | |
| | | LPC 16:0 | |
| | LPC 16:1 | | |
| | DG 16:0-18:2 | DG 16:0-18:2 | |
| | | DG 16:1-18:1 | |
| | | DG 16:0-18:1 | |
| | | DG 16:1-18:1 | |
| <i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i> | PC 16:1-16:1 | PC 16:1-16:1 | |
| | PC 16:1-18:1 | PC 16:1-18:1 | |
| | | PC 18:1-18:1 | |
| | PE 16:1-16:1 | PE 16:1-16:1 | |
| | PE 16:0-16:1 | | |
| PE 16:1-18:1 | PE 16:1-18:1 | | |
| | PE 16:0-18:1 | | |
| | PE 18:1-18:1 | | |
| | LPC 16:1 | | |
| | LPC 18:1 | | |
| | LPC 18:0 | | |

Conclusiones y Perspectivas

Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo

Albert Einstein

8. Conclusiones

En el presente trabajo se caracterizaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF) tres tipos de saponinas en el extracto de *Agave durangensis*, las cuales fueron: Agavoside A, Agavoside B, *Agave cantala* saponin N. En el caso del extracto de saponinas de *Agave salmiana* ssp. *crassispina* se identificó también la presencia de Agavoside A.

En el extracto de saponinas de *A. durangensis* la aglicona mayoritaria fue la hecogenina que se encuentra en las saponinas Agavoside A y Agavoside B. Ambas saponinas fueron reportadas previamente en extracto de *Agave americana* y fueron identificadas de manera parcial en hojas de *A. durangensis* por cromatografía de líquidos (HPLC) y UV. Sin embargo, es mediante la m/z identificada en el presente trabajo que se puede corroborar la presencia de estas dos saponinas en el *A. durangensis*. En el caso de la saponina de *Agave cantala* saponin N su aglicona es una tigogenina, y sólo se había identificado anteriormente en los extractos de *A. cantala*.

Además, se encontró la saponina Agavoside A en el extracto de saponinas de *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, esta saponina no fue la mayoritaria, sino dos saponinas cuyas agliconas fueron una gentrogenina y una manogenina respectivamente. Ambas saponinas contienen una serie de cadenas de hexosas y pentosas enlazadas, generando una m/z de 1118.81 en el caso de la gentrogenina y una m/z de 550.55 en el caso de la manogenina. Estas m/z no han sido reportadas anteriormente, por lo que podemos suponer que posiblemente sean dos nuevas saponinas que sean sintetizadas por *A. salmiana* ssp. *crassispina*.

La presencia de la hecogenina en ambos extractos, aunado a que las saponinas de *A. durangensis* mostraron un mayor efecto inhibitorio en ambas levaduras, hace concluir que esta aglicona es la responsable de la disminución del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*. Sin embargo, de acuerdo a los cultivos en continuo la cepa *S. cerevisiae* mostró una mayor inhibición, lo que puede deberse a las diferencias en la conformación de la pared y membrana celular, y además de que *K. marxianus* presentó actividad saponinasa con ambos extractos. Por lo tanto, no sólo la interacción de la aglicona con el esteroles, que ya ha sido reportado extensamente, ocasiona la inhibición de los microorganismos, sino que existe una serie de factores que influyen a que se propicia la formación de los poros responsables de la lisis celular. En este contexto, se observó que en el caso de la pared celular los β -glucanos y mananos modificaron su relación cuando se adicionaron los pulsos de ambos extractos de saponinas, lo anterior se puede

deber a que la parte glucídica de las saponinas interactúa con los β -glucanos de las levaduras generando una mayor curvatura que propicie a la formación del poro para la lisis celular. Por lo tanto, se concluye que no solo la aglicona, sino que también la parte glucídica de la saponina juega un papel importante en la actividad antimicrobiana. En la membrana celular se observaron cambios en la conformación de los fosfolípidos, tales como la disminución de sus cadenas acilo y el aumento de la insaturación, dichos cambios también favorecen a que la curvatura de la membrana sea más pronunciada y favorezca a la formación de poros y por consiguiente la inhibición en el crecimiento de la levadura.

Finalmente, se observó tanto en los cultivos batch como en continuo que 10 minutos es tiempo suficiente para observar los efectos realizados por las saponinas en las levaduras, y que existe una relación directa entre la concentración de mananos y la actividad saponinasa en *K. marxianus*. Por lo que, la cepa *K. marxianus* empleada en este trabajo es tolerante a las saponinas, lo que ayudaría a mejorar los procesos de fermentación de las bebidas de *Agave*.

9. Perspectivas

Las saponinas presentes en los *Agave durangensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina* presentaron actividad antimicrobiana que puede ser potencialmente utilizada en la industria farmacéutica y alimentaria.

En el presente trabajo sólo se analizaron los extractos de saponinas por espectrometría de masas, y se identificaron dos posibles nuevas saponinas en *A. salmiana* ssp. *crassispina*. Por lo que se recomienda, que se realice una resonancia magnética nuclear (RMN) para complementar el análisis y la elucidación de estas moléculas.

Además se sugiere realizar el análisis del efecto de las saponinas de manera individual, con el objetivo de conocer si el efecto antimicrobiano es sólo de una saponina o si existe un sinergismo entre ellas. También se sugiere hacer un estudio más profundo en la ruta de la integración de la pared celular (CWI), con el objetivo de conocer si la interacción de las saponinas con la pared celular es sólo un proceso mecánico o si existe algún efecto de carácter bioquímico.

Referencias

El científico no tiene por objeto un resultado inmediato, él no espera que sus ideas sean fácilmente aceptadas, su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino

Nikola Tesla

10. Referencias

- Abdel-Gawad M. M., El-Sayed M. M., Abdel-Hameed E. S. (1999) Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia* 70: 371-381.
- Aguilar-Uscanga B., Arrizon J., Ramirez J., Solis-Pacheco J. (2007) Effect of *Agave tequilana* juice on cell Wall polysaccharides of three *Saccharomyces cerevisiae* strains from different origins. *Antonie van Leeuwenhoek* 91: 151-157.
- Aguirre X., Ruiz R., Altenbach S. (2005) Mezcales y diversidad. *CONABIO*.
- Ahmad V. U., Basha A. (2007) Spectroscopic data of steroid glycosides, Springer. New York.
- Ahumada-Santos Y. P., Montes-Avila J., Uribe-Beltrán M. J., Díaz-Camacho S. P., López-Angulo G., Vega-Aviña R., López-Valenzuela J. A., Heredia J. B., Delgado-Vargas F. (2013) Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products* 49: 143-149.
- Akter R. (2013) Isolation and structural elucidation of bioactive compounds from Bangladeshi medicinal plants with a focus on novel anticancer compounds. Griffith University, School of pharmacy, PhD Thesis.
- Allsopp P., Possemiers S., Campbell D., Saldaña Oyarzabal I., Gill C., Rowland I. (2013) An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe* 22: 38-44.
- Almaraz-Abarca N., Delgado-Alvarado E. A., Hernández-Vargas V., Ortega-Chávez M., Orea-Lara G., Cifuentes-Díaz de León A., Ávila-Reyes J. A., Muñoz-Martínez R. (2009) Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (*Agavaceae*). *American Journal of Applied Sciences* 6 (6): 1076-1085.
- Almaraz-Abarca N., Delgado-Alvarado E. A., Torres-Morán M. I., Herrera-Corral J., Ávila-Reyes J. A., Naranjo-Jiménez N., Uribe-Soto J. N. (2013) Genetic variability in natural populations of *Agave durangensis* (*Agavaceae*) revealed by morphological and molecular traits. *The southwestern Naturalist* 58 (3): 314-324.

- Altunkeyik H., Gülcemal D., Masullo M., Alankus-Caliskan O., Piacente S., Karayildirim T. (2012) Triterpene saponins from *Cyclamen hederifolium*. *Phytochemistry* 73: 127-133.
- Amaral L. S., Murgu M., Rodrigues-Fo E., de Souza A. Q. L., de Moura-Sarquis M. I. (2008) A saponin tolerant and glycoside producer xylariaceous fungus isolated from fruits of *Sapindus saponaria*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1341-1348.
- Amariei C., Machne R., Sasidharan K., Gottstein W., Tomita M., Soga T., Loyd D., Murray D. B. (2013) The dynamics of cellular energetics during continuous yeast culture. *35th Annual International Conference of the IEEE EMBS*, Osaka, Japan.
- Arellano M., Pelayo C., Ramírez J., Rodríguez In (2008) Characterization of kinetic parameters and the fermentation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeast isolated from agave juice. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 835-841.
- Arrizon J., Fiore C., Acosta G., Romano P., Gschaedler A. (2006) Fermentation behavior and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antoine van Leeuwenhoek* 89 (1): 181-189.
- Arrizon J., Gschaedler A. (2007) Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1123-1131.
- Arrizon J., Morel S., Gschaedler A., Monsan P. (2010) Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry* 122: 123-130.
- Arroyo-López F. N., Querol A., Barrio E. (2009) Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36:663-669.
- Arslan I., Celik A. (2013) Saponin rich fractions (SRPs) from soapwort show antioxidant and hemolytic activity. *APCBEE Procedia* 7: 103-108.
- Augustin J. M., Kuzina V., Andersen S. B., Bak S. (2011) Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72: 435-457.

- Avila-Fernandez A., Galicia-Lagunas N., Rodriguez-Alegria M. E., Olvera C., Lopez-Munguia A. (2011) Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry* 129: 380-386.
- Baccou J. C., Lambert F., Sauvaire Y. (1977) Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. *Analyst* 102: 458-465.
- Barnett J. A. (1992) The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen *ex* Reess: a short review of non-taxonomists. *Yeast* 8: 1-23.
- Barraza-Soto S., Domínguez-Calleros P. A., Montiel-Antuna E., Návar-Chaidez J. J., Díaz-Vásquez M. A. (2014) La producción de mezcal en el municipio de Durango, México. *Ra Ximhai* 10 (6): 65-74.
- Barron N., Marchant R., McHale L., McHale A. P. (1995) Partial characterization of b-glucosidase activity produced by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on cellobiose- containing media at 45°C. *Biotechnology letters* 17 (10): 1047-1050.
- Basu N., Rastogi R. P. (1967) Triterpenoid saponins and sapogenins. *Phytochemistry* 6: 1249-1270.
- Bernards M. A., Ivanov D. A., Neculai M. A., Nicol R. W. (2011) Ginsenosides: phytoanticipins or host recognition factors? In *The biological activity of phytochemicals*, Gang D. R. (ed). Springer, New York 13-32 pp.
- Bi L., Tian X., Dou F., Hong L., Tang H., Wang S. (2012) New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of *Aralia taibaiensis*. *Fitoterapia* 83: 234-240.
- Blagovic B., Rupcic J., Mesaric M., Georgiu K., Maric V. (2001) Lipid composition of brewer's yeast. *Food Technology and Biotechnology* 39 (3): 175-181.
- Borchani C., Fonteyn F., Jamin G., Paquot M., Thonart P., Blecker C. (2015) Physical, functional and structural characterization of the cell wall fractions from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry* 194: 1149-1155.

- Boumann H. A., Damen M. J. A., Versluis C., Heck A. J. R., de Kruijff B., de Kroon A. I. P. M. (2003) The two biosynthetic routes leading to phosphatidylcholine in yeast produce different sets of molecular species. Evidence for lipid remodeling. *Biochemistry* 42: 3054-3059.
- Boutaghane N., Voutquenne-Nazabadioko L., Harakat D., Simon A., Kabouche Z. (2013) Triterpene saponins of *Genista ulicina* spach. *Phytochemistry* 93: 176-181.
- Buenrostro J., Rodriguez R., de la Garza H., y col. (2010) Chapter 11: Mexican fermented foods & beverages. *Advances in Food Science and Technology*, Mexico: Nova Science Publishers.
- Cabib E., Arroyo J. (2013) How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in yeast cell wall. *Natural Reviews Microbiology* 11: 648-655.
- Carman G. M., Henry S. A. (1989) Phospholipid biosynthesis in yeast. *Annual Reviews Biochemistry* 58: 635-669.
- Carman G. M., Kersting M. (2004) Phospholipid synthesis in yeast: regulation by phosphorylation. *Biochemistry Cell Biology* 82: 62-70.
- Carter J. P., Spink J., Cannon P. F., Daniels M. J., Osbourn A (1999) Isolation, characterization and avenacin sensitivity of a diverse collection of cereal-root-colonizing fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8): 3364-3372.
- Caspeta L., Caro-Bermúdez M., Ponce-Noyola T., Martinez A (2014) Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy* 113: 277-286.
- Challinor V. L., Parsons P. G., Chap S., White E. F., Blanchfield J. T., Lehmann R. P., De Voss J. J. (2012) Steroidal saponins from the roots of *Smilax* sp.: structure and bioactivity. *Steroids* 77: 504-511.
- Chapagan B. P., Wiesman Z., Lahkim T. (2007) *In vitro* study of antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 26: 109-115.
- Chen Y. F., Yang C. H., Chang M. S., Ciou Y. P., Huang Y. C. (2010) Foam properties and detergent abilities of saponins from *Camellia oleifera*. *International Journal of Molecular Science* 11: 4417-4425.

Cheng Y., Liang Q., Hu P., Wang Y., Jun F. W., Luo G. (2010) Combination of normal-phase medium- pressure liquid chromatography and high- performance counter- current chromatography for preparation of ginsenoside- Ro from panax ginseng with high recovery and efficiency. *Separation and Purification Technology* 73: 397-402.

Cheok C. Y., Salman H. A. K., Sulaman R. (2014) Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International* 59: 16-40.

Choi S. J., Choi J., Jeon H., Bae S. K., Ko J., Kim J., Yoon K. D. (2015) Application of high-performance countercurrent chromatography for the isolation of steroidal saponins from *Liriope plathyphylla*. *Journal of Separation Science* 38: 18-24.

Cira L. A., Gonzalez G. A., Torres J. C., Pelayo C., Gutierrez M., Ramirez J. (2008) Heterologous expression of *Fusarium oxysporum* tomatinase in *Saccharomyces cerevisiae* increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of *Agave tequilana* Weber var. azul and *Agave salmiana* must. *Antoine van Leeuwenhoek* 93: 259-266.

Coleman J. J., Okoli I., Tegos G. P., Holson E. B., Wagner F. F., Hamblin M. R., Mylonakis E. (2010) Characterization of plant- derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chemical Biology* 5 (3): 321-332.

Colunga-GarciaMarin P., Zizumbo-Villarreal D. (2007) Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16: 1653-1667.

Da Silva B. P., de Sousa A. C., Silva G. M., Mendes T. P., Parente J. P. (2002) A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Z. Naturforsch* 57c: 423-428.

Da Silva B. P., Parente J. P. (2013) A new complex triterpenoid saponin from *Calliandra pulcherrima* with haemolytic activity and adjuvant effect. *Phytochemistry Letters* 6: 633-639.

Da Silva Araújo V. B., Ferreira de Melo A. N., Gaspar Costa A., Catro-Gomez R. H., Madruga M. S., de Souza E. L., Magnani M. (2014) Followed extraction of b-glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*Saccharomyces uvarum*) and application of the obtained mannoproteins as a stabilizer in mayonnaise. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 23: 164-170.

Davis S. C., Dohleman F. G., Long S. P. (2011) The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock. *Global Change Biology Bioenergy* 3: 68-78.

Deak T. (2006) Environmental factors influencing yeasts. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*, Rosa C., Petter G (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 155-174pp.

De León-Rodríguez A. Escalante-Minakata P., Barba de la Rosa A. P., Blaschek H. P. (2008) Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology. *Chemical Engineering and Processing* 47: 76-82.

Domizio P., Liu Y., Bisson L. F., Barile D. (2014) Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiology* 43: 5-15.

Doran P. M. (1995) *Bioprocess Engineering Principles*, Great Britain Academic Press.

Dos Santos W. N. L., Dias Cavalcante D., Paranhos da Silva E. G., das Virgens C. F., de Souza Dias F (2011) Biosorption of Pb (II) and Cd (II) ions by *Agave sisalana* (sisal fiber). *Microchemical Journal* 97: 269-273.

Dunkley K. D., Callaway T. R., O'Bryan C., Kundinger M. M., Dunkley C. S., Anderson R. C., Nisbet D. J., Crandall P. G., Ricke S. C. (2009) Cell yields and fermentation responses of a *Salmonella* Typhimurium poultry isolate at different dilution rates in an anaerobic steady state continuous culture. *Antoine van Leeuwenhoek* 96: 537-544.

Dunn J. I., Heinzle E., Ingham J., Prenosil J. E. (2003) Biological reaction engineering dynamic modeling fundamentals with simulation examples. *Wiley-VCH GmlsH & Co KGaA*. Alemania.

Ejsing C. S., Sampaio J. L., Surendranath V., Duchoslav E., Ekroos K., Klemm R. W., Simons K., Shevchenko A. (2009). *PNAS* 106 (7): 2136-2141.

Escalante-Minakata P., Blaschek H. P., Barba de la Rosa A. P., Santos L., De León-Rodríguez A. (2008) Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology* 46: 626-630.

Escalante-Minakata P., Ibarra-Junquera V., Rosu H. C., De León-Rodríguez A., González-García R. (2009) Online monitoring of mezcal fermentation based on redox potential measurements. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32: 47-52.

- Eskander J., Lavaud C., Harakat D. (2010) Steroidal saponins from the leaves of *Agave macroacantha*. *Fitoterapia* 81 (5): 371-374.
- Esposito D., Munafo Jr. J. P., Lucibello T., Baldeon M., Komarnytsky S., Gianfagna T. J. (2013) Steroidal glycosides from the bulbs of Easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb) promote dermal fibroblast migration *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology* 148: 433-440.
- Farkas V. (2003) Structure and biosynthesis of fungal cell walls: methodological approaches. *Folia Microbiology* 48 (4): 469-478.
- Fischer M. J. C., Pensec F., Demangeat G., Farine S., Chong J., Ramirez-Sucro M., Mazet F., Bertsch C. (2011) Impact of *Quillaja saponaria* saponins on grapevine ecosystem organisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 197-206.
- Fleet G. H. (2006) The commercial and community significance of yeast in food and beverage production. In *The Yeast Handbook*, Querol A & Fleet G. H. (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1-12 pp.
- Fonseca G. G., Gombert A. K., Heinzle E., Wittmann C. (2007) Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Research* 7: 422-435.
- Fonseca G. G., Heinzle E., Wittman C., Gombert A. K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 339-354.
- Fonseca G. G., Barbosa de Carvalho N. M., Gombert A. K. (2013) Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 5055-5067.
- Francois J. M. (2016) Cell surface interference with plasma membrane and transport processes in yeasts. In *Yeast membrane transport*, Ramos J., Sychrova H., Kschischo M (eds). Springer International Publishing, Switzerland 11-31 pp.
- Free S. J. (2013) Fungal cell wall organization and biosynthesis. In *Advances in Genetics*, Friedmann T., Dunlap J. C., Goodwin S. F. (eds) Burlington: Academic Press 33-82 pp.

- Friedman M. (2015) Chemistry and anticarcinogenic mechanisms of glycoalkaloids produced by eggplants, potatoes, and tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3323-3337.
- Glauert A. M., Dingle J. T., Lucy J. A. (1962) Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* 196: 953-955.
- Gonzalez-Ramos D., Cebollero E., Gonzalez R. (2008) A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (17): 5533-5540.
- Gonzalez-Valdez L. S., Almaraz-Abarca N., Proal-Najera J. B., Robles-Martinez F., Valencia-del-Toro G., Quintos-Escalante M. (2013) Surfactant properties of saponins of *Agave durangensis*, applications on arsenic removal. *International Journal of Engineering and Applied Sciences* 4 (2): 87-94.
- Guclu-Ustundag O., Mazza G. (2007) Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47: 231-258.
- Heftmann E. (1963) Biochemistry of plant steroids. *Annual Reviews Plant Physiology* 14: 225-248.
- Heng W., Ling Z., Na W., Youzhi G., Zhen W., Zhiyong S., Deping X., Yunfei X., Weirong Y. (2014) Analysis of the bioactive components of *Sapindus saponins*. *Industrial Crops Products* 61: 422-429.
- Henson M. A. (2003) Dynamic modeling and control of yeast cell populations in continuous biochemical reactor. *Computers and Chemical Engineering* 27: 1185-1199
- Hernandez R. (2007) Estudio del efecto de la alimentación continua e intermitente de sustrato en una fermentación por lote alimentado para la producción de tequila 100% agave. Universidad de Guadalajara. Tesis de Licenciatura.
- Hernández-Carlos B., González-Coloma A., Orozco-Valencia A. U., Ramírez-Mares M. V., Andrés-Yeves M. F., Joseph-Nathan P. (2011) Bioactive saponins from *Microsechium helleri* and *Sicyos bulbosus*. *Phytochemistry* 72: 743-751.
- Holtum J. A. M., Chambers D., Morgan T., Tans D. K. Y. (2011) *Agave* as a biofuel feedstock in Australia. *Global Change Biology Bioenergy* 3: 58-67.

Hoskisson P. A., Hobbs G. (2005) Continuous culture- making a comeback? *Microbiology* 151: 3153-3159.

Imaizumi Y., Nagao N., Yusoff F. M., Taguchi S., Toda T. (2014) Estimation of optimum specific light intensity per cell on a high-cell-density continuous culture of *Chlorella zofingiensis* not limited by nutrients or CO₂. *Bioresource Technology* 162: 53-59.

Kaczorek E., Chrzanowski L., Pijanowska A., Olszanowski A. (2008) Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipids and saponins. *Bioresource Technology* 99: 4285-4291.

Kang L., Yu K., Zhao Y., Liu Y., Yu H., Pang X., Xiong C., Tan D., Gao Y., Liu C., Ma B. (2012) Characterization of steroidal glycosides from the extract of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by UPLC/Q TOF MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62: 235-249.

Keukens E. A. J., de Vrije T., van den Boom C., de Waard P., Plasman H. H., Thiel F., Chupin V., Jongen W. M. F., de Kruijff B. (1995) Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta* 1240: 216-228.

Kieran P., Berovic M. (2001) Bioprocess engineering courses notes doctoral/ post-doctoral level. *Slovenia: The European Federation of Biotechnology*, Facultad de Quimica y Tecnologia Quimica. Universidad de Ljubljana.

Killen G. F., Madigan C. A., Connolly C. R., Walsh G. A., Clark C., Hynes M. J., Timmins B. F., James P., Headon D. R., Power R. F. (1998) Antimicrobial saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their *in vitro* properties for their *in vivo* impact. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3178-3186.

Kim J. Y., Park K. W., Moon K. D., Lee M. K., Choi J., Yee S. T., Shim K. H., Seo K. I. (2008) Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by crude saponin from *Platycodi radix* 46: 3753-3758.

Kim S. R., Park Y. C., Jin Y. S., Seo J. H. (2013) Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnology Advances* 31: 851-861.

Kind T., Fiehn O. (2010) Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews* 2: 23-60.

- Kind T., Liu K. H., Lee D. Y., De Felice B., Meissen J. K., Fiehn O. (2013) LipidBlast-in-silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Natural Methods* 10 (8): 755-758.
- King B. C., Donnelly M. K., Bergstrom G. C., Walker L. P., Gibson D. M. (2009) An optimized microplants assay system for quantitative evaluation of plant cell wall- degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering* 102 (4): 1033-1044.
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 239-256.
- Klis F. M., Boorsma A., de Groot P. W. J. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 185-202.
- Kohara A., Nakajima C., Yoshida S., Muranaka T. (2007) Characterization and engineering of glycosyltransferases responsible for steroid saponin biosynthesis in Solanaeous plants. *Phytochemistry* 68: 478-486.
- Kwiatkowski S., Kwiatkowski S. E. (2012) Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) glucan polysaccharides- occurrence, separation and application in food, feed and health industries. In *The complex world of polysaccharides*. Karunaratne D. N. (ed) In Tech Capitulo 2 47-70 pp.
- Lachance M. A. (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antoine van Leeuwenhoek* 68: 151-160.
- Lairini K., Perez-Espinosa A., Pineda M., Ruiz-Rubio M. (1996) Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (5): 1604-1609.
- Landa M., Cottrell M. T., Kirchman D. L., Blain S., Obernosterer (2013) Changes in bacterial diversity in response to dissolved organic matter supply in a continuous culture experiment. *Aquatic Microbial Ecology* 69: 157-168.
- Lane M. M., Morrissey J. P. (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews* 24 (1-2): 17-26.
- Lanzotti V., Barile E., Antignani V., Bonanomi G., Scala F. (2012) Antifungal saponins from bulbs of garlic, *Allium sativum* L. var. Voghiera. *Phytochemistry* 78: 126-134.

- Lanzotti V., Romano A., Lanzuise S., Bonanomi G., Scala F. (2012b) Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry* 74: 133-139.
- Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., Arrizon-Gaviño J., Herrera-Suarez T., Garcia-Mendoza A., Gschaedler-Mathis A. (2008) Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Research* 8: 1037-1052.
- Lara-Avila J. P. (2005) Obtención de la huella genética de agave mezcaleros de San Luis Potosí, por RADD y AFLP. Instituto Postosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., división de Biología Molecular, Tesis de Maestro en Ciencias en Biología Molecular.
- Leal-Díaz A. M., Santos-Zea L., Martinez-Escobedo H. C., Guajardo-Flores D., Gutierrez-Uribe J. A., Serna-Saldivar S. O. (2015) Effect of *Agave americana* and *Agave salmiana* ripeness on saponin content from aguamiel (*Agave* sap). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3924-3930.
- Levin D. E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 (2): 262-291.
- Li R., Zhou Y., Wu Z., Ding L. (2006) ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. *Journal of Mass Spectrometry* 41: 1-22.
- Li N., Zhang L., Zeng K. W., Zhou Y., Zhang J. Y., Che Y. Y., Tu P. F. (2013) Cytotoxic steroidal saponins from *Ophiopogon japonicas*. *Steroids* 78: 1-7.
- Limam Z., Selmi S., Sadok S., El Adeb A. (2011) Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: biological and physicochemical properties. *African Journal of Biotechnology* 10 (4): 640-647.
- Lin F., Wang R. (2010) Hemolytic mechanism of dioscin proposed by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Modeling* 16: 107-118.
- Lipke P. N., Ovalle R. (1998) Cell wall architecture in yeasts: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology* 180 (15): 3735-3740.

- Liu X. Y., Wang Q., Cui S. W., Liu H. Z. (2008) A new isolation method of b-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids* 22: 239-247.
- Lopez M. G., Mancilla-Margalli N. A., Mendoza-Diaz G. (2003) Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7835-7840.
- López-Alvarez A., Díaz-Pérez A. L., Sosa-Aguirre C., Macías-Rodríguez L., Campos-García J. (2012) Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113 (5): 614-618.
- Luévano-Martínez L. A., Kowaltowski A. J. (2015) Phosphatidylglycerol-derived phospholipids have a universal domain-crossing role in stress responses. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 585: 90-97.
- Mari A., Napolitano A., Perrone A., Pizza C., Piacente S. (2012) An analytical approach to profile steroidal saponins in food supplements: The case of *Ruscus aculeatus*. *Food Chemistry* 134: 461-468.
- Martinez-Aguilar J. F., Peña-Alvarez A. (2009) Characterization of five typical agave plants used to produce mezcal through their simple lipid composition analysis by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1933-1939.
- Martinez-Martinez A (2001) Saponinas Esteroidales. *Universidad de Antioquia. Facultad de Quimica Farmaceutica. Medellin* 22 pp.
- Martinez Salvador M., Mata-González R., Morales Nieto C., Valdez-Cepeda R. (2012) *Agave salmiana* plant communities in central Mexico as affected by commercial use. *Environmental Management* 49: 55-63.
- Matteau D., Baby V., Pelletier S., Rodriguez S. (2015) A small-volume, low-cost, and versatile continuous culture device. *Plos One* 10 (7): e0133384.
- Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T. V., Shevchenko A., Schwudke D. (2008) Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research* 49: 1137-1146.

- Meagher L. P., Smith B. L., Wilkins A. L. (2001) Metabolism of diosgenin-derived saponins: implications for hepatogenous photosensitization diseases in ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91: 157-170.
- Melek F. R., Kassem I. A. A., Miyase T., Fayad W. (2014) Caspicaosides E-K, triterpenoid saponins and cytotoxic acylated saponins from fruits of *Gleditsia caspica* Desf. *Phytochemistry* 100: 110-119.
- Miller G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Miyakoshi M., Tamura Y., Masuda H., Mizutani K., Tanaka O, Ikeda T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K. (2000) Antiyeast steroidal saponins from *Yucca schidigera* (Mohave Yucca), a new anti-food deteriorating agent. *Journal of Natural Products* 63: 332-338.
- Mahato S. B., Ganguly A. N., Sahu N. P. (1982) Steroid saponins. *Phytochemistry* 21 (5): 959-978
- Moran-Marroquin G. A., Cordova J., Valle-Rodriguez J. O., Estarron-Espinoza M., Diaz-Montaña D. M. (2011) Effect of dilution rate and nutrients addition on the fermentative capability and synthesis of aromatic compound of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous cultures fed with *Agave tequilana* juice. *International Journal of Food Microbiology* 151 (1): 87-92.
- Moreno-Vilet L., Garcia-Hernandez M. H., Delgado-Portales R. E., Corral-Fernandez N. E., Cortez-Espinosa N., Ruiz-Cabrera M. A., Portales-Perez D. P. (2014) *In vitro* assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *International Journal of Biological Macromolecules* 63: 181-187.
- Morrissey J. P., Etschmann M. M. W., Schrader J., de Billerbeck G. M. (2015) Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavor and fragrance molecules. *Yeast* 32: 3-16.
- Mostafa A., Sudisha J., El-Sayed M., Ito S. I., Ikeda T., Yamauchi N., Shigyo M. (2013) Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. *Phytochemistry* 6: 274-280.

- Narváez-Zapata J. A., Sánchez-Teyer L. F. (2009) Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Recent Patents on Biotechnology* 3: 185-191.
- Narváez-Zapata J. A., Rojas-Herrera R. A., Rodríguez-Luna I. G., Larralde-Corona C. P. (2010) Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Current Microbiology* 61 (5): 444-450.
- Nava-Cruz N. Y., Medina-Morales M. A., Martínez J. L., Rodríguez R., Aguilar C. N. (2015) Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 35 (4): 546-559.
- Nguyen T. H., Fleet G. H., Rogers P. L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 206-212.
- Njeh F., Feki H., Koubaa I., Hamed N., Damak M., Ayadi A., Hammami H., Mezghani-Jarraya R. (2016) Molluscicidal activity of *Solanum elaeagnifolium* seeds against *Galba truncatula* intermediate host of *Fasciola hepatica*: identification of β -solamarine. *Pharmaceutical Biology* 54 (4): 726-731.
- Novak M., Synytsya A., Gedeon O., Slepicka P., Prochazka V., Synytsya A., Blahovec J., Hejlova A., Copikova J. (2012) Yeast β (1-3), (1-6)-D-glucan films: preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydrate polymers* 87: 2496-2504.
- Novel S. P. (1998) Los incomparables Agaves y Cactus. *Trillas (ed)*. Mexico 211 pp.
- Novoveska L., Henley W. J. (2014) Lab-scale testing of two-stage continuous culture system for microalgae. *Industrial Biotechnology* 10 (3): 228-236.
- Oleszek W. A. (2002) Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A* 967: 147-162.
- Oleszek W., Bialy Z. (2006) Chromatographic determination of plant saponins- an update (2002-2005). *Journal of Chromatography A* 62: 1-4.
- Osbourn A. E. (2003) Molecules of interest saponins in cereals. *Phytochemistry* 62: 1-4.
- Osumi M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29 (2-3): 207-233.

- Osumi M. (2012) Visualization of yeast cell by electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 61 (6): 343-365.
- Otero J. M., Cimini D., Patil K. R., Poulsen S. G., Olsson L., Nielsen J. (2013) Industrial systems biology of *Saccharomyces cerevisiae* enables novel succinic acid cell factory. *Plos One* 8 (1): e54144.
- Peña-Alvarez A., Diaz L., Medina A., Labastida C., Capella S., Vera L. E. (2004) Characterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase micro extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1027: 131-136.
- Pérez A. J., Calle J. M., Simonet A. M., Guerra J. O., Stochmal A., Macías F. A. (2013) Bioactive steroidal saponins from *Agave affoyana* flowers. *Phytochemistry* 95: 298-307.
- Pérez-Brito D., Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Larqué-Saavedra A., Lappe P. (2007) Molecular characterization of *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from *Agave fourcroydes* (Lem.) in Yucatan, Mexico. *Molecular Biotechnology* 37: 181-186.
- Pinos-Rodriguez J. M., Zamudio M., Gonzalez S. S. (2008) The effect of plant age on the chemical composition of fresh and ensiled *Agave salmiana* leaves. *South African Journal of Animal Science* 38 (1): 43-50
- Qin X. J., Sun D. J., Ni W., Chen C. X., Hua Y., He L., Liu H. Y. (2012) Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Steroids* 77: 1242-1248.
- Ramírez-Higuera A. (2009) Evaluación del efecto prebiotico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Tesis de Maestría en Ciencias en Bioprocesos.
- Ramírez-Malagón R., Borodanenko A., Pérez-Moreno L., Salas-Araiza M. D., Nuñez-Palenius H. G., Ochoa-Alejo N. (2008) *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94: 201-207.
- Rattray J. B. M., Schibeci A., Kidby D. K. (1975) Lipids of yeast. *Bacteriological Reviews* 39 (3): 197-231.

Richter H., Qureshi N., Heger S., Dien B., Cotta M. A., Angenent L. T. (2011) Prolonged conversion of n-butyrate to n-butanol with *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* in a two-stage continuous culture with *in-situ* product removal. *Biotechnology and Bioengineering* 109 (4): 913-921.

Rodrigues F., Ludovico P., Leao C. (2006) Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Rosa C., Petter G. (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 101-121 pp.

Rosi I., Vinella M., Domizio P. (1994) Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 519-527.

Russell N. J., Evans R. I., ter Steeg P. F., Hellemons J., Verheul A., Abee T. (1995) Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology* 28: 255-261.

Sahu N. P., Banerjee S., Mondal N. B., Mandal D. (2008) Steroidal saponins. In *Progress in the chemistry of organic natural products*. Kinghorn A. D., Falk H., Kobayashi J. (eds). Springer-Verlag/ Wien 45-141 pp.

Sautour M., Miyamoto T., Lacaille-Dubois M. A. (2007) Steroidal saponins from *Asparagus acutifolius*. *Phytochemistry* 68: 2554-2562.

Sáyago-Ayerdi S. G., Mateos R., Ortiz-Basurto R. I., Largo C., Serrano J., Granado-Serrano A. B., Sarriá B., Bravo L., Taberero M. (2014) Effects of consuming diets containing *Agave tequilana* dietary fibre and Jamaica calyces on body weight gain and redox status in hypercholesterolemic rats. *Food Chemistry* 18: 54-59.

Schiavone M., Sieczkowski N., Castex M., Dague E., Francois J. M. (2015) Effects of the strain background and autolysis process on the composition and biophysical properties of the cell wall from two different industrial yeast. *FEMS Yeast Research* 15 (2): 1-11.

Schneider R., Brugger B., Sandhoff R., Zellnig G., Leber A., Lampl M., Athenstaedt K., Hrstnik C., Eder S., Daum G., Paltauf F., Wieland F. T., Kohlwein S. D. (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route of the plasma membrane. *The Journal of cell biology* 146 (4): 741-754.

- Segura-García L. E., Taillandier P., Brandam C., Gschaedler A. (2015) Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *LWT-Food Science and Technology* 60: 284-291.
- Shinobu-Mesquita C. S., Bonfim-Mendonca P. S., Moreira A. L., Ferreira I. C. P., Donatti L., Fiorini A., Svidzinski T. I. E. (2015) Cellular structural changes in *Candida albicans* caused by the hydroalcoholic extract from *Sapindus saponaria* L. *Molecules* 20: 9405-9418.
- Siddhapura S., Maharshi A., Thaker V. (2011) Varietal difference in antifungal activity of some species of *Agave*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44 (2): 135-141.
- Simonin H., Beney L., Gervais P. (2007) Cell death induced by mild physical perturbations could be related to transient plasma membrane modifications. *Journal Membrane Biology* 216: 37-47.
- Simons V., Morrissey J. P., Latijnhouwers M., Csukai M., Cleaver A., Yarrow C., Osbourn A. (2006) Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2732-2740.
- Skhirtladze A., Plaza A., Montoro P., Benidze M., Kemertelidze E., Pizza C., Piacente S. (2006) Furostanol saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 809-814.
- Smith D. A., Steele A., Fogel M. L. (2015) Pigment production and isotopic fractionations in continuous culture: okanone producing purple sulfur bacteria part II. *Geobiology* 13: 292-301.
- Soares E. M., Soares H. M. V. M. (2012) Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 1066-1083.
- Sparg S. G., Light M. E., van Staden J. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 219-243.
- Szakiel A., Paczkowski C., Henry M. (2011) Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews* 10: 471-491.
- Temraz A., El Gindi O. D., Kadry H. A., De Tommasi N., Braca A. (2006) Steroidal saponins from the aerial parts of *Tribulus alatus* Del. *Phytochemistry* 67: 1011-1018.

- Theunis M. H. B. L., Foubert K., Pollier J., Gonzalez-Guzman M., Goossens A., Vlietinck A. J., Pieters L. A. C., Apers S. (2007) Determination of saponins in *Maesa lanceolata* by LC-UV: Development and validation. *Phytochemistry* 68: 2825-2830.
- Tibayrenc P., Preziosi-Belloy L., Roger J. M., Ghommidh C. (2010) Assessing yeast viability from cell size measurements? *Journal of Biotechnology* 149: 74-80
- Toprak E., Veres A., Yildiz S., Pedraza J. M., Chait R., Paulsson J., Kishony R. (2013) Building a morbidostat: an automated continuous-culture device for studying bacterial drug resistance under dynamically sustained drug inhibition. *Nature Protocols* 8 (3): 555-567.
- Torres-Morán M. I., Almaraz-Abarca N., Velasco-Ramirez A. P., Hernandez-Vargas V., Orea-Lara G., Cifuentes-Díaz A., Oliver-Salvador C. (2008) Taxonomic significance of ISTR to discriminate species in *Agavaceae*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3 (4): 661-665.
- Tronchoni J., Rozes N., Querol A., Guillamón J. M. (2012) Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature. *International Journal of food microbiology* 155: 191-198.
- Turk M., Plemenitas A., Gunde-Cimerman N. (2011) Extremophilic yeasts: plasma-membrane fluidity as determinant of stress tolerance. *Fungal Biology* 115: 950-958.
- Valle-Rodriguez J. O., Hernandez-Cortes G., Córdova J., Estarrón-Espinosa M., Díaz-Montaña D. M. (2012) Fermentation of *Agave tequilana* juice by *Kloeckera africana*: influence of amino-acid supplementations. *Antoine van Leeuwenhoek* 101: 195-204.
- Van der Rest M. E., Kamminga A. H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W. N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiological Reviews* 59 (2): 304-322.
- Van Dijken J. P., Weusthuis R. A., Pronk J. T. (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antoine van Leeuwenhoek* 63: 343-352.
- Velazquez-Jimenez L. H., Pavlick A., Rangel-Mendez R. (2013) Chemical characterization of raw and treated agave bagasse and its potential as adsorbent of metal cations from water. *Industrial Crops and Products* 43: 200-206.

- Verastegui A., Verde J., Garcia S., Heredia N., Oranday A., Rivas C. (2008) Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1249-1252.
- Verdugo Valdez A., Segura Garcia L., Kirchmayr M., Ramírez Rodríguez P., González Esquinca A., Coria A., Gschaedler Mathis A. (2011) Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antoine van Leeuwenhoek* 100: 497-506.
- Verstrepen K. J., Chambers P. J., Pretorius I. S. (2006) The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: challenges, opportunities and potential benefits. In *The yeast handbook*, Querol A. & Fleet G. H. (eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 309-444 pp.
- Voutquenne-Nazadabioko L., Gevrenova R., Borie N., Harakat D., Sayagh C., Weng A., Thakur M., Zaharieva M., Henry M. (2013) Triterpenoid saponins from the roots of *Gypsophila trichotoma* Wender. *Phytochemistry* 90: 114-127.
- Walker G. M., van Dijck P. (2006) Physiological and molecular responses of yeasts to the environment. In *Yeast Handbook*, Querol A & Fleet G. H. (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 111-152 pp.
- Wang D., Yu H., Song J., Xu Y., Jin F. (2012) Enzyme kinetics of ginsenosidase type IV hydrolyzing 6-O-multi-glycosides of protopanaxatriol type ginsenosides. *Process Biochemistry* 47: 133-138.
- Weng Y., Yu L., Cui J., Zhu Y. R., Guo C., Wei G., Duan J. L., Yin Y., Guan Y., Wang Y. H., Yang Z. F., Xi M. M., Wen A. D. (2014) Antihyperglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of total saponins extracted for *Aralia taibaiensis* in experimental type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 152: 553-560.
- Wu J., Lin L., Chau F. (2001) Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry* 8: 347-352.
- Wu J., Zhao J., Liu Y., Li X., Xu Q., Feng Y., Khan I. A., Yang S. (2015) Five new triterpenoid saponins from the roots of *Camellia oleifera* C. Abel with cytotoxic activities. *Phytochemistry Letters* 13: 379-385.

- Xia J. M., Yuan Y. J. (2009) Comparative lipidomics of four strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals different responses to furfural, phenol, and acetic acid. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 57: 99-108.
- Yang C. R., Zhang Y., Jacob M. R., Khan S. I., Zhang Y. J., Li X. C. (2006) Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50 (5): 1710-1714.
- Yang F., Shi H., Zhang X., Yang H., Zhou Q., Yu L. L. (2013) Two new saponins from tetraploid jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*), and their anti-inflammatory and α -glucosidase inhibitory activities. *Food Chemistry* 141: 3606-3613.
- Yang Y., Laval S., Yu B. (2014) Chemical synthesis of saponins. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 71: 137-226.
- Yang L., Lu M., Carl S., Mayer J. A., Cushman J. C., Tian E., Lin H. (2015) Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy* 76: 43-53.
- Yokosuka A., Mimaki Y. (2009) Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 70: 807-815.
- Yuan W., Wang P., Su Z., Wang V. S., Li S. (2013) Cytotoxic triterpenoid saponins from husks of *Aesculus californica* (Spach) Nutt. *Phytochemistry* 90: 95-105.
- Zamora F. (2009) Biochemistry of alcoholic fermentation. In *Wine Chemistry and Biochemistry*, Moreno-Arribas M. V. & Polo M. C. (eds). Springer Science & Business 3-26 pp.
- Zamora P. C., Juárez F. B. I., Aguirre R. J. R., Ortiz P. D., Godínez H. C. I., Álvarez F. G. (2010) Variación de la concentración de azúcares y saponinas durante la cocción del maguey mezcalero potosino. *e-Gnosis* 8: 1-11.
- Zamora-Gasga V. M., Bello-Pérez L. A., Ortíz-Basurto R. I., Tovar J., Sáyago-Ayerdi S. G. (2014) Granola bars prepared with *Agave tequilana* ingredients: chemical composition and *in vitro* starch hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology* 56: 309-314.
- Zhang T., Liu H., Liu X. T., Xu D., Chen X., Wang Q. (2010) Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var *yunnanensis* and *P. polyphylla*

var *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 114-124.

Zhang Y., Liu C., Qi Y., Li S., Wang J. (2013) Application of accelerated solvent extraction coupled with counter-current chromatography to extraction and online isolation of saponins with a broad range of polarity from *Panax notoginseng*. *Separation and Purification Technology* 106: 82-89.

Zhang X. X., Ito Y., Liang J. R., Liu J. L., He J., Sun W. J. (2014) Therapeutic effects of total steroids saponin extracts from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright in Freud's complete adjuvant induced arthritis in rats. *International Immunopharmacology* 23 (2): 407-416.

Zhou H., Zhang Wang C., Zhong Ye J., Xia Chen H. (2014) New triterpene saponins from the seed cake of *Camellia oleifera* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry Letters* 8: 46-51.

Zhu J., Guo X., Fu S., Zhang X., Liang X. (2010) Characterization of steroidal saponins in crude extracts for *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53: 462-474.

Zizumbo-Villarreal D., Colunga-GarciaMarin P. (2008) Early coconut distillation and the origins of mezcal and tequila spirits in west-central Mexico. *Genetics Resources of Crop Evolution* 55: 493-510.

Zizumbo-Villarreal D., Gonzalez-Zozaya F., Olay-Barrientos A., Platas-Ruiz R., Cuevas-Sagardi M., Almendros-Lopez L., Colunga-GarciaMarin P. (2009) Archaeological evidence of the cultural importance of *Agave* spp. In Pre-hispanic Colima, Mexico. *Economy Botany* 63 (3): 288-302.