CENTRO DE INVESTIGACIÓN YASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑODEL ESTADO DE JALISCO, A. C.

ESTUDIO DE CAMBIOS FISIOLÓGICOS DE *Kluyveromyces marxianus* PRODUCTORA DE FRUCTANASAS POR EL EFECTO DE TEMPERATURA Y MINERALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA**

PRESENTA

BIOL. GEMA NÚÑEZ LÓPEZ

GUADALAJARA, JALISCO AGOSTO DE 2015.

Guadalajara, Jalisco, a 7 de agosto de 2015.

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante Gema Núñez López, una vez leída y revisada la Tesis titulada "ESTUDIO DE CAMBIOS FISIOLÓGICOS DE *Kluyveromyces marxianus* PRODUCTORA DE FRUCTANASAS POR EL EFECTO DE TEMPERATURA Y MINERALES" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología Productiva durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 7 del mes de agosto del año 2015.

Dra. Anne Gschaedler Mathis	Dra. Lorena Amaya Delgado	Dr. Javier P. Arrizon Gaviño
Tutor en planta	Tutor	Asesor

Guadalajara, Jalisco, a 7 de agosto de 2015.

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante Gema Núñez López, una vez leída y revisada la Tesis titulada "ESTUDIO DE CAMBIOS FISIOLÓGICOS DE *Kluyveromyces marxianus* PRODUCTORA DE FRUCTANASAS POR EL EFECTO DE TEMPERATURA Y MINERALES" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología Productiva durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 7 del mes de agosto del año 2015.

Dr. Melchor Arellano Plaza	Dra. Lorena Amaya Delgado	M.C. Alejandro Arana Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Yo sostendría que el agradecimiento es una de las formas más nobles del pensamiento humano. Dicen que la gratitud es la memoria del corazón, que se puede devolver el oro prestado, pero siempre se estará en deuda con quién te ha mostrado su lado amable.

Quisiera agradecer a los miembros de la Unidad de Biotecnología Industrial que de alguna manera participaron en mi formación durante la maestría, a la Dra. Anne Christine Gschaedler Mathis por haberme dado la oportunidad de realizar la presente tesis, al Dr. Javier Arrizon Gaviño por sus acertados consejos en el desarrollo de este trabajo y de manera especial le agradezco a la Dra. Lorena Amaya Delgado por haber confiado en mí, por su paciencia, su apoyo, por sus consejos y por la dirección de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT por el financiamiento de mis estudios de maestría.

Y por último pero no por esa razón son menos importantes a los miembros de mi familia por apoyarme de manera incondicional siempre. A mi mami por ser el motor que impulsa mis logros. A mi papi por siempre guiarme en el camino del éxito y nunca dudar de mí. A mi hermana Lizeth por haberme apoyado durante todo este proceso y a mi hermanito Samuel porque siempre me hace reír con sus ocurrencias, de verdad mil gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1 RESUMEN 13

2 ANTECEDENTES 14

2.1 Generalidades de las levaduras 14

2.1.1 Clasificación, taxonomía y filogenia 14

2.1.2 Características morfológicas 15

2.1.3 Hábitat y ecología 16

2.2 Fisiología de levaduras 17

2.2.1 Crecimiento 17

2.2.1.1 Requerimientos físicos para el crecimiento 18

2.2.2 Reproducción 19

2.2.3 Nutrición 22

2.2.4 Metabolismo 23

2.2.5 Evaluación de la fisiología celular 24

2.2.5.1 Microscopia de fluorescencia 25

2.2.5.2 Espectroscopia dieléctrica 27

2.2.5.3 Sistema de análisis y conteo de células 28

***2.3 Kluyveromyces marxianus* 30**

2.3.1 Taxonomía y filogenia 31

2.3.2 Características generales 32

2.3.2.1 Termotolerancia 33

2.3.2.2 Metabolismo 33

2.3.2.3 Producción de enzimas 34

2.3.2.4 Importancia y aplicaciones biotecnológicas 35

2.3.3 Fructanasas 36

2.3.3.1 Usos y aplicaciones 37

3 objetivos 38

3.1 Objetivo General 38

3.1.1 Objetivos específicos 38

4 hipótesis **39**

5 justificación **40**

6. metodología **41**

6.1 Materiales **41**

6.1.1 Microorganismo 41

6.1.2 Medios de cultivo 41

6.2 Métodos **43**

6.2.1 Preparación del inóculo 43

6.2.2 Técnicas para evaluar la fisiología 43

6.2.2.1 Cuantificación de la población 44

6.2.2.2 Microscopia de fluorescencia 45

6.2.2.3 Espectroscopia dieléctrica (sonda de capacitancia) 46

6.2.2.4 Unidades formadoras de colonia (UFC) 46

6.2.3 Consumo de sustrato 46

6.2.3.1 Determinación de azúcares totales 46

6.2.3.2 Determinación de azúcares reductores 47

6.2.4 Actividad fructanasa 47

6.2.5 Caracterización del extracto enzimático 47

6.2.6 Efecto de la fuente de carbono y la temperatura 48

6.2.7 Efecto de la temperatura, calcio y magnesio 48

6.2.8 Cultivo en biorreactor para evaluar la fisiología 49

7 resultados y discusión **51**

7.1 Caracterización del extracto enzimático **51**

7.2 Efecto de la fuente de carbono y temperatura en la inducción de actividad fructanasa **52**

7.2.1 Crecimiento 52

7.2.2 Actividad fructanasa 56

7.3 Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y la actividad fructanasa **60**

7.3.1 Crecimiento 60

7.3.2 Actividad fructanasa 62

7.4 Cultivo en biorreactor (batch) 64

7.4.1 Cinética de crecimiento 64

7.4.2 Consumo de sustrato 65

7.4.3 Actividad enzimática 65

7.4.4 Viabilidad 67

7.4.4.1 Actividad metabólica 67

7.4.4.2 Permitividad 69

7.4.5 Diámetro celular 70

7.5 Efecto de la temperatura, calcio y magnesio 72

7.5.1 Crecimiento 72

7.5.2 Consumo de la fuente de carbono 79

7.5.3 Actividad fructanasa 80

7.5.4 Diámetro 82

7.6 Cultivo en biorreactor (continuo) 85

7.6.1 Cinética de crecimiento y consumo de sustrato 86

7.6.2 Actividad enzimática 89

7.6.3 Viabilidad y actividad metabólica 92

7.6.4 Diámetro y Morfología 99

8 CONCLUSIONES 102

9 PERSPECTIVAS 103

10 BIBLIOGRAFÍA 104

11 ANEXOS 114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Curva de crecimiento característica de levaduras. 18

Figura 2. *S. cerevisiae* en gemación, se observan las cicatrices de gemación.....20

Figura 3. Esquema del mecanismo de reproducción sexual en levadura. 21

Figura 4.Células de *S. cerevisiae* marcadas con FUN-1 observadas en microscopia de fluorescencia [24]. 27

Figura 5. Esquema del principio de medición de la viabilidad con espectroscopia dieléctrica.28

Figura 6. Principio de medición del tamaño celular con el CASY® 29

Figura 7. Sistema de análisis y conteo de células (CASY®). 30

Figura 8. Morfología de una colonia de *K. marxianus* en WL. 32

Figura 9. Mecanismo de reacción de las fructanasas.....37

Figura 10.Caracterización de extracto enzimático producido con *K. marxianus*. pH ▼, temperatura ●.....51

Figura 11.Caracterización de extracto enzimático variando la concentración de sustrato. Concentración de fructanos de agave (■).....52

Figura 12.Cinéticas de crecimiento a 22° C con diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).....53

Figura 13.Cinéticas de crecimiento a 30° C con diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).....54

Figura 14.Cinéticas de crecimiento a 37° C con diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).....55

Figura 15.Cinéticas de crecimiento a 40° C con diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).....55

Figura 16.Cinética de actividad fructanasa en cultivos a 22° C utilizando diferentes fuentes de carbono como inductor. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼). 56

Figura 17.Cinéticas de actividad fructanasa en cultivos a 30° C utilizando diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).....58

Figura 18.Cinéticas de actividad fructanasa en cultivos a 37° C utilizando diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).....59

Figura 19.Cinéticas de actividad fructanasa en cultivos a 40° C utilizando diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).....59

Figura 20.Cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas de cultivo en medio mineral sin vitaminas, 20° C (●), 32.5° C (○) y 45° (▼).....60

Figura 21.Cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas de cultivo en el medio químicamente definido, 20° C (●), 32.5° C (○) y 45° (▼). 61

Figura 22.Cinéticas de la actividad fructanasa a diferentes temperaturas de cultivo en medio mineral sin vitaminas, 20° C (●), 32.5° C (○) y 45° (▼).....62

Figura 23.Cinéticas de actividad fructanasa a diferentes temperaturas de cultivo en el medio químicamente definido, 20° C (○), 32.5° C (●) y 45° C (▼).....63

Figura 24.Cinética de crecimiento durante un cultivo en batch a 30º C. Conteo en cámara de Neubauer (●) y densidad óptica (▲).....64

Figura 25.Consumo de sustrato durante el cultivo en biorreactor. Fructanos de agave (■), Población (●).....65

Figura 26.Cinética de actividad fructanasa en el cultivo en biorreactor. Actividad enzimática (●), azúcares reductores (▲).....66

Figura 27. Fotografía de la cepa a las 8 h de cultivo utilizando FUN-1®.....68

Figura 28. Fotografía de la cepa a las 24 h de cultivo utilizando FUN-1®.....68

Figura 29.Cinética de viabilidad cuantificada con la sonda de espectroscopia dieléctrica. Permitividad (▬), población (●).....70

Figura 30.Perfil del diámetro celular durante el cultivo en batch 71

Figura 31.Crecimiento en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de inducción a 20º C.....73

Figura 32.Crecimiento en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de inducción a 28º C. 74

Figura 33.Crecimiento en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de inducción a 37º C. 75

Figura 34.Crecimiento en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de inducción a 45º C. 76

Figura 35. Diagrama de Pareto estandarizado para la velocidad máxima de crecimiento 78

Figura 36.Gráfico de medias para la velocidad máxima de crecimiento en diferentes temperaturas 78

Figura 37. Diagrama de Pareto estandarizado para el consumo de sustrato 79

Figura 38. Graficó de medias para el consumo de sustrato 80

Figura 39. Diagrama de Pareto estandarizado de la actividad fructanasa 81

Figura 40. Gráfico de medias para la actividad fructanasa 82

Figura 41. Diagrama de Pareto estandarizado para el diámetro de *K. marxianus* 83

Figura 42. Gráfica de distribución del diámetro con respecto a la temperatura 84

Figura 43.Gráfica de distribución del diámetro en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio empleadas. 85

Figura 44. Sistema en continuo utilizado en los dos cultivos 86

Figura 45.Cinética de crecimiento y concentración de azúcar residual en el cultivo en continuo I. Población (■), Biomasa (●), Consumo de sustrato (○), ⋮ inicio del continuo, 🡻 pulso de magnesio 87

Figura 46.Cinética de crecimiento y concentración de azúcar residual en el cultivo en continuo II. Población (■), Biomasa (●), Consumo de sustrato (○), ⋮ inicio del continuo, 🡻 pulso de calcio. 88

Figura 47.Cinética de actividad fructanasa durante el cultivo I. Biomasa (●), concentración de azúcar residual (○), actividad fructanasa (▲),⋮ inicio del continuo, 🡻 pulso de magnesio..... 89

Figura 48.Cinética de actividad fructanasa en U/g de biomasa del cultivo I. Biomasa (○), Actividad fructanasa en U/g (▼),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de magnesio. 90

Figura 49.Cinética de actividad fructanasa durante el cultivo II. Biomasa (●), Concentración de azúcar residual (○), actividad fructanasa (▲),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de calcio 91

Figura 50.Cinética de actividad fructanasa en U/g de biomasa durante el cultivo II. Biomasa (●), Actividad fructanasa en U/g (▼),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de calcio.....92

Figura 51.Cinética de viabilidad registrada por espectroscopia dieléctrica en el cultivo I. Biomasa (●), ⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de magnesio. 93

Figura 52.Cinética de viabilidad registrada por espectroscopia dieléctrica en el cultivo II. Biomasa (●), ⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de calcio 94

Figura 53. Colonias formadas después del pulso de calcio en el cultivo II.....95

Figura 54.Capacidad de división celular durante el cultivo I. Biomasa (●), % UFC (□),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de magnesio. 95

Figura 55.Capacidad de división celular durante el cultivo II. Biomasa (●), % cultivavilidad (□),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de calcio 96

Figura 56. Células de *K. marxianus* con microscopia de fluorescencia al inicio del cultivo I..97

Figura 57.Células de *K. marxianus* con microscopia de fluorescencia al inicio del cultivo II 98

Figura 58.Células de *K. marxianus* con microscopia de fluorescencia al finalizar el cultivo I 98

Figura 59.Células de *K. marxianus* con microscopia de fluorescencia al finalizar el cultivo II 99

Figura 60.Morfología de *K. marxianus* al inicio del cultivo en continuo 100

Figura 61.Morfología de *K. marxianus* durante la producción de fructanasas en cultivo en continuo 100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diversidad de morfologías en las levaduras [3] 16
Tabla 2. Propiedades fermentativas de las levaduras 19
Tabla 3. Estudios bioquímicos de producción de enzimas de interés industrial 35
Tabla 4. Composición del YPD 41
Tabla 5. Composición del medio mineral (Arrizon y col.).....42
Tabla 6. Composición del medio químicamente definido 42
Tabla 7. Técnicas para evaluar las diferentes sub-poblaciones celulares.....43
Tabla 8. Experimento para determinar el efecto de la temperatura y el medio de cultivo sobre la actividad fructanasa. 48
Tabla 9. Diseño multifactorial para evaluar el efecto de la temperatura, calcio y magnesio 49
Tabla 10. Mejores condiciones del diseño experimental para la actividad fructanasa.....80

1 RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo principal estudiar la fisiología de la levadura *Kluyveromyces marxianus* por efecto de la temperatura durante el cultivo, así como también evaluar el efecto de diversas concentraciones de calcio y magnesio en el medio de cultivo, teniendo como respuesta de análisis la actividad fructanasa.

Se realizó un primer análisis para observar el efecto de diferentes fuentes de carbono como inductores en la actividad fructanasa obteniendo como resultado que los fructanos de agave fueron el mejor inductor, posteriormente se probaron dos medios químicamente definidos, también se analizaron diferentes temperaturas de cultivo (20-45° C).

Por otro lado se implementaron técnicas para evaluar el estado fisiológico de la cepa, estas técnicas fueron, la microscopia de fluorescencia y la espectroscopia dieléctrica, esto para conocer la viabilidad del cultivo, otras técnicas utilizadas fueron la cuantificación del tamaño celular y el cultivo en placa (UFC).

Una vez establecidas las técnicas de análisis se procedió con la evaluación de la temperatura y las diferentes concentraciones de calcio y magnesio sobre la expresión de fructanasas, para cual se realizó un diseño experimental multifactorial.

Por último se realizó un cultivo en continuo para observar el efecto del calcio y el magnesio durante la producción de la fructanasa, también se observó el efecto del aumento de temperatura sobre la fisiología celular.

2 ANTECEDENTES

Las levaduras han sido usadas extensamente tanto en la biotecnología tradicional como en la moderna para la producción de alimentos, bebidas, enzimas, productos químicos y reactivos farmacéuticos; y más recientemente para investigar los modelos bioquímicos, metabólicos, genéticos de las mismas, es decir su biología celular, indudablemente *Saccharomyces cerevisiae* ha dominado en todos estos aspectos, debido a su importancia en la elaboración de bebidas fermentadas (vinos, cerveza, cidra), sin embargo, la aplicación de la microbiología moderna y los enfoques moleculares han renovado el foco de atención de la biología y el potencial industrial hacia otras levaduras, como por ejemplo, del género *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debarromyces* y *Yarrowia*, las cuales tienen roles biotecnológicos [1].

2.1 Generalidades de las levaduras

Las levaduras constituyen un grupo único de hogos que se reproducen por gemación (fisión) y por la formación de estados sexuales que no están contenidos en cuerpos fructíferos [2], normalmente presentan una morfología oval, esférica o casi cilíndrica [3]. En contraste con la mayoría de los hongos filamentosos las levaduras son unicelulares.

2.1.1 Clasificación, taxonomía y filogenia

Los métodos empleados para la clasificación de las levaduras han ido evolucionando, al principio la clasificación se basaba en características morfológicamente visibles, más tarde se introdujeron pruebas fisiológicas básicas, además se han ido añadiendo datos bioquímicos como los carbohidratos presentes en la pared celular, y más recientemente la secuenciación de genes ribosomales [4].

Como se menciona en el párrafo anterior las levaduras pueden ser clasificadas e identificadas de acuerdo a varios criterios; morfológicos como el mecanismo de división celular y la esporulación, fisiológicos como el tipo de azúcar que fermentan, inmunológicos como la inmunofluorescencia y el aglutinamiento de anticuerpos, y los mecanismos moleculares los cuales han ido incrementando en los últimos años. Entre los métodos moleculares se encuentran por ejemplo, la filogenia del ADN ribosomal, el cariotipo, la amplificación al azar del ADN

polimórfico. Estos análisis de las secuencias moleculares han permitido a los taxomistas categorizar nuevas especies [3].

Desde que se describió por primera vez a *S. cerevisiae* el desarrollo de la taxonomía de las levaduras ha estado en constante controversia y con ello sujeta a continuos cambios de nombres [5], en 1912 Guillermond fue el primero en esbozar un esquema filogenético de las levaduras entre los *Ascomycotas*.

El potencial de la diversidad filogenética de las levaduras es morfológicamente sencilla debido a sus estados sexuales que se pueden clasificar en dos grandes clases de hongos, *Ascomycetos* y *Basidiomycetos* [2],debido a estudios moleculares que han mostrado que derivan de estos dos principales linajes monofiléticos. Sin embargo también existen organismos que se han adaptado al crecimiento levaduriforme, por ejemplo, muchos hongos dimorficos toman la forma de una levadura en ciertas etapas de su vida, incluso algunos *Zygomycetos* pueden forman células de levaduras en condiciones anaerobias.

Análisis filogenéticos de los hongos basados en el ADNr y en otra secuencia de genes indican que ambos linajes comprenden tres clases cada una.

Berbee y Taylor [6] demostraron con análisis del ADNr y de 18s de algunas especies de ascomicetos que éste se clasificaba en dos linajes superiores, *Hemiascomycetes* que incluye levaduras y formas levaduriformes sin cuerpos fructíferos, *Euascomycetes* que comprende hongos filamentosos que producen esporas sexuales en ascos encerrados en cuerpos fructíferos y no hay formas levaduridformes. Otro grupo que comprenden los ascomicetos son los *Archiascmycetes* que hacen referencia a la posición evolutiva temprana de las levaduras y formas levaduriformes [7].

2.1.2 Características morfológicas

De forma práctica, las levaduras han sido descritas como organismos unicelulares que se reproducen de manera asexual.

Usualmente las levaduras son redondeadas, ovoides o cilíndricas (Tabla 2.1). El tamaño de las levaduras puede variar dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento, de 1 a 10 µm, aunque algunas pueden formar filamentos los cuales pueden llegar a medir 30 µm. También

pueden influir en el tamaño de las levaduras su etapa en el ciclo celular y la edad de las células individuales.

Tabla 1. Diversidad de morfologías en las levaduras [3]

Tipo de morfología	**Descripción**	**Genero típico**
Elipsoidal	Ovalada, forma de balón de Rugby	*Saccharomyces*
Esférica	Esferas completas	*Debaryomyces*
Cilíndrica	Cilindros con extremos semiesféricos	*Schizosaccharomyces*
Apiculada	En forma de limón	*Hanseniaspora, Saccharomycodes*
Ojival	Alargada y redondeada en un extremo	*Dekkera, Brettanomyces*
Filamentosa	Presentan hifas o pseudohifas	*Candida albicans, Yarrowia lipolytica*
Triangular	Los brotes están restringidos a 3 ápices	*Trigonopsis*
Curvada	Con forma de media luna	*Cryptococus cereanus Sterigmatomyces*

Se ha encontrado que la temperatura de incubación influye en el tamaño de la levadura, esto dependiendo de la especie, la mayoría de las especies muestran un incremento en el tamaño el cual es dependiente de la temperatura, sin embargo algunas otras como por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe* muestra un incremento de tamaño tanto a temperaturas bajas como altas con respecto al óptimo.

La mayoría de las levaduras exhiben brotes multilaterales y un tipo de división celular en el que la célula hija aparece en una amplia zona de la superficie celular, como el caso de *Saccharomyces*. Por otro lado existen especies en las cuales el brote (célula hija) aparece en los poros de la levadura, lo cual resulta en una morfología tipo limón muy característica.

2.1.3 Hábitat y ecología

Las levaduras han sido usadas por el hombre desde hace milenios, en particular en la fabricación de bebidas alcohólicas y de pan, están implicadas en fenómenos de competición por nutrientes, de antagonismo o de simbiosis en los suelos, las aguas, en los animales y en los vegetales. Su

presencia depende en primer lugar de la disponibilidad de carbono orgánico, temperatura, pH y de la presencia de agua.

Las condiciones del hábitat natural o artificial en los que se encuentran las levaduras determinan su actividad metabólica, crecimiento y supervivencia. Una variedad de factores bióticos y abióticos influyen sobre las levaduras y ejercen condiciones de estrés que deben soportar [7].

Como ya sabemos las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza, algunas especies pueden ser aisladas de ambientes extremos, tales como aquellos con bajo potencial de agua (altas concentraciones de azúcar o sal), bajas temperaturas y baja disponibilidad de oxígeno, como en el caso de levaduras que se encuentran en el tracto intestinal de algunos animales [3].

2.2 Fisiología de levaduras

Las células como unidades funcionales están capacitadas para llevar a cabo diversas funciones, estas funciones son las que constituyen el estado fisiológico de las mismas.

El estado fisiológico de la levadura determina la consistencia y la calidad del producto [8], es por ello que el conocimiento del estado fisiológico es de vital importancia durante un proceso fermentativo.

2.2.1 Crecimiento

El crecimiento se refiere a la manera en que las células transportan y asimilan los nutrientes y como después los integran a las diferentes funciones de los componentes celulares, con el fin del aumento de la masa y finalmente la división celular.

Como en la mayoría de los microorganismos cuando las levaduras son inoculadas en un medio rico en nutrientes y son incubadas en condiciones óptimas, resultará una típica curva de crecimiento en donde la población se representa gráficamente contra el tiempo (Figura 1). Esta curva de crecimiento se compone de una fase lag en donde hay un periodo de no crecimiento, pero de adaptación fisiológica al nuevo entorno, la fase exponencial que es un periodo limitado de duplicaciones logarítmica, la fase estacionaria es el periodo en el cual la levadura se encuentra en reposo con una tasa de crecimiento cero y por último la fase de muerte.

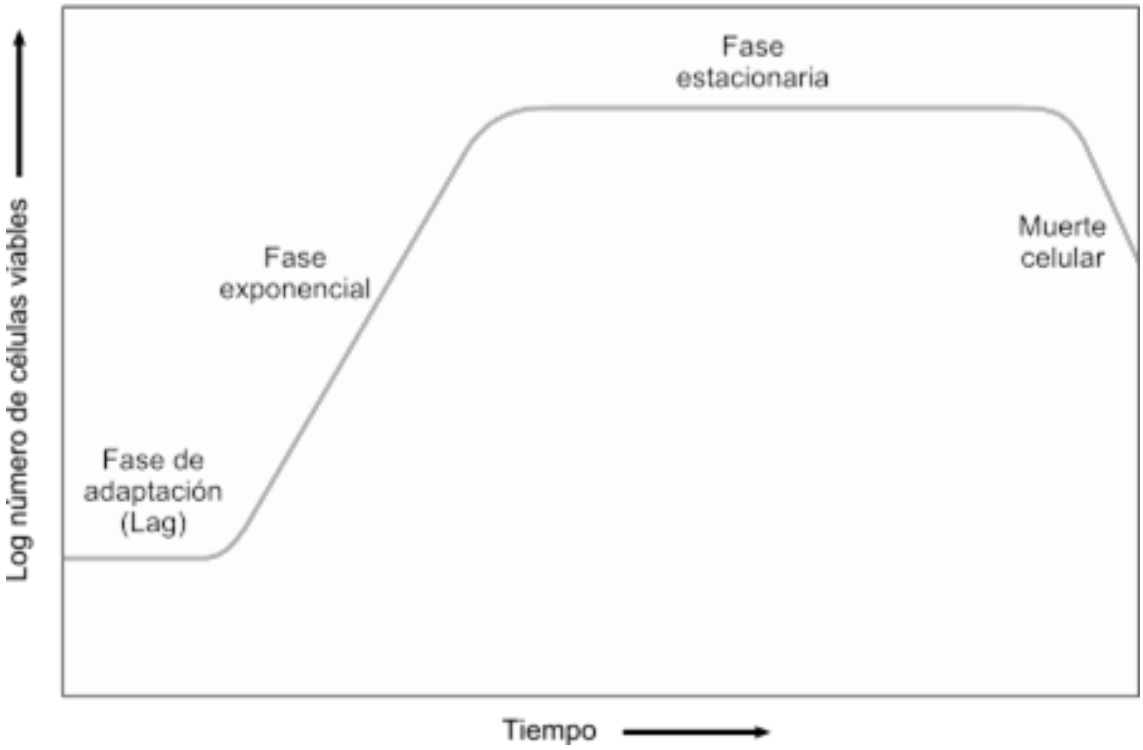

Figura 1. Curva de crecimiento característica de levaduras.

También puede existir el crecimiento diauxico que se caracteriza por presentar dos fases exponenciales y se produce cuando las levaduras están expuestas a dos fuentes de carbono que se utilizan secuencialmente.

2.2.1.1 Requerimientos físicos para el crecimiento

La mayoría de las levaduras crecen en temperaturas cálidas, en ambientes ácidos, ricos en azucares y anaeróbicos, pero de cepas industriales y de laboratorio crecen mejor de 20 a 30º C. La temperatura más baja para el crecimiento de una levadura es alrededor de 20º C, mientras que la más alta oscila en los 50º C [3]. La capacidad de las células para resistir un repentino choque de temperatura letal, se define como termotolerancia, este fenotipo se mide con frecuencia por la transferencia de células creciendo a temperatura normal de 50 a 60° C por un periodo de 5 a 20 minutos [3].

El pH es otro de los factores importantes a considerar en el crecimiento de las levaduras, la gran mayoría de las cepas está adaptada a un pH que va de 4.5 a 6.5, se sabe que medios acidificados con ácidos orgánicos tienden a inhibir el crecimiento, por ejemplo el ácido láctico y el acético,

que medios acidificados con ácidos minerales, como el clorhídrico, debido a que los ácidos orgánicos no disociados pueden bajar e pH intracelular después de su translocación a través de la membrana. El pH intracelular es regulado en un rango muy estrecho, por ejemplo, en *S. cerevisiae* es de 5, y esto se hace principalmente a través de los protones de bombeo de ATPasa de la membrana plasmática.

Las levaduras generalmente son aerobias, son incapaces de crecer de manera adecuada en condiciones completamente anaerobias porque, además de proporcionar el aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria, el oxígeno es necesario como un factor de crecimiento y para biosíntesis de los ácidos grasos que están presentes en la membrana. En la tabla 2 se muestra una categorización de las levaduras de acuerdo a sus propiedades fermentativas y su respuesta al crecimiento dependiendo de la disponibilidad de oxígeno.

Tabla 2. Propiedades fermentativas de las levaduras

Clase	Ejemplo	Descripción
Fermentativo obligatorio	*Candida pintolopesis*	Solo son capaces de fermentar, incluso en presencia de oxígeno
Fermentativo facultativo, Crabtree positivo	*Saccharomyces cerevisiae*	Fermentan en medios que contienen altos nivel de azúcar en presencia de oxígeno
Crabtree negativo	*Candida utilis*	No produce etanol en condiciones aeróbicas y no crece e condiciones anaeróbicas
No fermentativo	*Rhodotorula rubra*	No produce etanol, ya sea en ausencia o presencia de oxígeno

2.2.2 Reproducción

El modo más común de reproducción es vegetativo (gemación) y es típica de los ascomicetos, por ejemplo *S. cerevisiae*. La reproducción inicia cuando la célula madre alcanza un tamaño crítico el cual coincide con el inicio de la síntesis de ADN. Esto es seguido por el debilitamiento

de un parte de la pared celular, junto con la tensión ejercida por la turgencia, permitiendo la extrusión del citoplasma en una zona delimitada por el nuevo material de la pared celular. Tanto la célula madre como la hija se encuentran contiguas en la pared durante el desarrollo de la yema. En *S. cerevisiae* el tamaño de la célula en división es asimétrico, la yema es más pequeña que la madre cuando se separa de ella. El tejido cicatricial en la pared de las levaduras permanece en ambas células, madre e hija (Figura 2).

Figura 2. *S. cerevisiae* en gemación, se observan las cicatrices de gemación.

Otra forma de reproducción es la fisión y es típico de levaduras que pertenecen al género *Schizosaccharomyces*, en la cual se forman dos células hijas de igual tamaño de una célula madre; las células hijas recién divididas crecen longitudinalmente en una forma monopolar durante un tercio de su ciclo celular, posteriormente cambian a un crecimiento bipolar hasta que se inicia la mitosis.

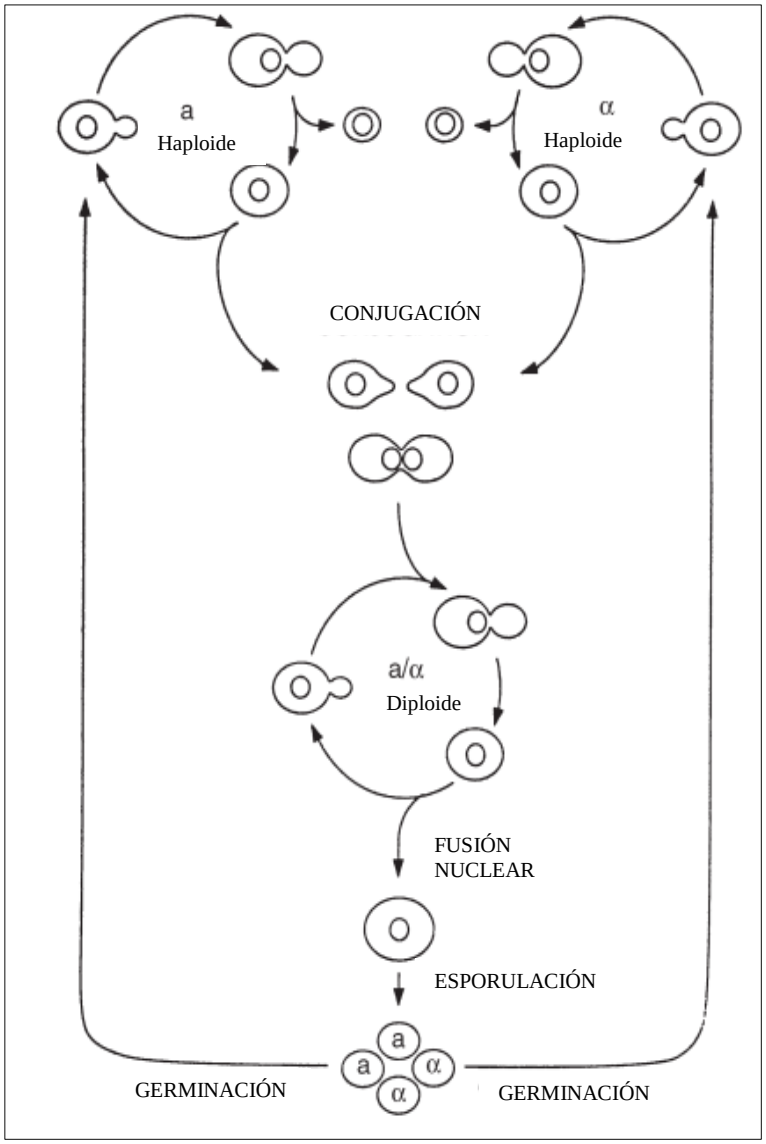

Figura 3. Esquema del mecanismo de reproducción sexual en levadura.

Muchas levaduras tienen la capacidad de reproducirse sexualmente, teniendo la capacidad de aparearse, realizar la meiosis y esporular. El desarrollo de las esporas de levadura representa un proceso de diferenciación morfológica, fisiológica y bioquímica de células sexuales.

El apareamiento de *S. cerevisiae* involucra la conjugación de dos células haploides (Figura 3), a y α. Estas células se sincronizan en respuesta a las feromonas de apareamiento. La conjugación de las células de apareamiento se produce por la superficie de la pared celular seguido por la fusión de la membrana para formar un citoplasma común. Posteriormente la fusión nuclear, resultando un núcleo diploide.

2.2.3 Nutrición

Un medio de cultivo debe de tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se deben tener en cuenta los requerimientos nutricionales del microorganismo con el cual se va a trabajar. La formulación del medio es esencial para la etapa de la fermentación [9]. Las levaduras son organismos heterótrofos que son capaces de utilizar una gran variedad de nutrientes para apoyar el crecimiento y la generación de energía [10].

Las necesidades nutricionales de las levaduras, buscan medios de cultivo que aporten los elementos necesarios para la síntesis de los tejidos celulares y para cubrir las necesidades energéticas de las mismas [11].

Es de relevancia en la fermentación la asimilación de carbohidratos y compuestos nitrogenados, así como también son importantes elementos como el S, P, Mg y K y elementos traza como el Cu, Fe, Zn, Mn, Co, Mo y B que son requeridos en pequeñas cantidades. Algunos microorganismos no pueden sintetizar nutrientes específicos como aminoácidos, vitaminas y nucleótidos

Los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono. El nitrógeno es cuantitativamente el segundo constituyente aportado por el medio de cultivo, todas las levaduras, asimilan el nitrógeno en forma de ión amonio. El fósforo es asimilado por la célula en forma de iones. El potasio es el elemento mineral cualitativamente más importante en las levaduras, ya que a pH ácido el potasio estimula la fermentación y la respiración, además actúa como efector de numerosas enzimas entre otros [11].

Como se muestra en algunos estudios la inhibición de crecimiento de las levaduras por el etanol, también inhabilita el transporte de nutrientes a través de la membrana plasmática, lo cual no

resulta de la acumulación de este compuesto en las células, sino por la deficiencia de algunos nutrientes como el calcio y el magnesio [9].

Los iones calcio incrementan la estabilidad de la membrana plasmática, ya sea por la disminución de protones pasivos o se estabiliza por la influencia de la ATPasa que inhibe la actividad del etanol [12]. El magnesio es necesario para algunas actividades enzimáticas en la glucólisis y la biosíntesis de ácidos grasos de las levaduras, como para la activación de la hexoquinasa, fosfofructoquinasa, fosfoglicerato quinasa, la enolasa y la piruvato quinasa [13], y se sabe que protege a la levadura del estrés causado por el etanol, la temperatura y la presión osmótica [14]); una carencia de magnesio en la fermentación alcohólica conlleva a la producción de ácido acético [11].

2.2.4 Metabolismo

Las actividades metabólicas de las levaduras causan cambios físicos, químicos y sensoriales, los cuales están relacionados con la descomposición de los alimentos [7]. Fleet [15] hizo hincapié en la importancia de comprender las propiedades bioquímicas y fisiológicas de las levaduras en sus actividades de descomposición.

Al igual que otros hongos, las levaduras son organismos aeróbicos que metabolizan los nutrientes por oxidación, aunque la fermentación es la característica más notable de algunas levaduras. Contrario a lo que se cree, solo la mitad de todas las especies de levaduras pueden fermentar los azúcares, las cuales son conocidas como facultativas anaerobias [3].

Las levaduras tienen diferentes capacidades metabólicas. Se pueden utilizar una amplia gama de sustratos bajo una variedad de condiciones ambientales. La glucosa representa la principal fuente de energía y carbono para las levaduras, la absorción es el primer paso en el catabolismo de los azúcares. El transporte se lleva a cabo a través de la membrana plasmática por portadores específicos.

La vía más común para el metabolismo de los azúcares es la glucólisis, la cual consiste en 10 reacciones enzimáticas dando como resultado dos moléculas de ATP por una de glucosa. La glucólisis no solo proporciona energía, sino que también proporciona productos intermediarios para biosíntesis de aminoácidos [7]. Bajo condiciones anaeróbicas el piruvato formado durante

la glucólisis es descarboxilado a acetaldehído el cual será reducido a etanol. Además de etanol se producen una variedad de compuestos que da un aroma característico de la fermentación.

2.2.5 Evaluación de la fisiología celular

Las condiciones fisiológicas de las levaduras pueden evaluarse por la determinación de los componentes de la misma célula que son específicamente importantes para la actividad fermentativa o por la producción de metabolitos [8].

El objetivo de lograr la máxima producción de estos metabolitos durante un cultivo microbiano, depende de la información que se tenga acerca del microorganismo en cuestión. Es por ello que en la actualidad el conocimiento del estado fisiológico de las levaduras ha tomado gran importancia, ya que dicho estado puede afectar la producción de los metabolitos de interés, tanto en velocidad como en rendimiento [16]. Conocer el estado fisiológico de las levaduras es esencial para poder tomar decisiones correctivas rápidamente en caso de ser necesario [11].

En diversos experimentos en la industria cervecera han determinado que inocular el medio de fermentación con cultivos en diferentes estados fisiológicos puede llevar a diferentes resultados en la producción de metabolitos.

Como ya se mencionó con anterioridad conocer el estado fisiológico de las levaduras es de gran importancia en los diferentes procesos industriales en el que puedan estar involucradas. Por ejemplo el desempeño de las levaduras en las fermentaciones alcohólicas depende directamente de la actividad de la misma, la cual puede ser vista como una función de viabilidad, así como el estado fisiológico de las células viables [11].

Existen diversas metodologías que se pueden seguir para determinar el estado fisiológico en el que se encuentra la levadura, de las cuales la mayoría se realiza fuera de línea.

Uno de los aspectos más interesantes para determinar la fisiología de las células es la viabilidad, la cual está definida como la capacidad que tienen las células para reproducirse y es determinado frecuentemente por el recuento en placa, pero este método cuenta con la desventaja de que el tiempo necesario para formar las colonias es demasiado como para reaccionar a tiempo [11], por lo que métodos de análisis más rápidos se hacen necesarios.

La tinción con azul de metileno es el método rápido más usado comúnmente [17], aunque esta metodología sobreestima la población de células viables [18].

2.2.5.1 Microscopia de fluorescencia

Otra metodología de tinción son los fluorocromos, los cuales son susceptiblemente rápidos y más aún cuando son utilizados en conjunto con citometría de flujo. La microscopia de fluorescencia es del rango de UV-visible, consiste en la excitación de las moléculas por un láser a niveles mayores de energía y posteriormente caen a niveles bajos emitiendo radiación (fluorescencia), involucrando transiciones en los estados electrónicos.

Existen dos tipos de fluorocromos que pueden ser utilizados, los que señalan la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y los que pueden detectar la actividad como la respiración o la actividad enzimática (actividad metabólica).

A) Funcionalidad e integridad de la membrana plasmática

El principio general de estos colorantes es que las células viables cuyas membranas están intactas (integridad de la membrana) no presentaran tinción alguna, pero en las células con membranas alteradas, los colorantes pueden entrar resultando en la tinción de la célula. Se han realizado diversos estudios con yoduro de propidio para observar la viabilidad de microorganismo. Gant y col. [19] lo utilizaron para observar la viabilidad en *E. coli* a diversos antibióticos, posteriormente Jepras y col. [20] demostraron que un porcentaje significativo de calor mataba a *E. coli*, esto debido a que la florescencia que presentaban con yoduro de propidio fue muy pobre. Muchos autores han reportado el uso de yoduro de propidio para evaluar la viabilidad de levaduras que han sido dañadas [11,21].

Tanto el potencial de la membrana plasmática como la membrana interna de la mitocondria son afectados por los fluoroforos catiónicos o aniónicos. Se han utilizado los colorantes de cianina, rhodamine 123 (catiónicos) y oxonol (aniónico) para observar la viabilidad de las levaduras. Dinsdale y Lloyd [22] monitorearon la viabiliad de *S. cerevisiae* durante la fermentación de sidra con dos fluorocormos, rhodamine 123 y oxonol, la asimilación de estos dos colorantes se basa en el potencial de la membrana, rhodamine 123 es absorbido y retenido en células viables y por el contrario el oxnol es expulsado de la células viables, así las células que fluorescen están muertas.

B) Actividad metabólica

En el caso de la respiración celular se puede utilizar colorantes de tetrazolio el cual será reducido a sus respectivos productos de formazán.

Desde 1966 Rotman y Papermaster [23] reportaron el uso de fluorescencia con diacetato, un producto no fluorescente, el cual es procesado por una enzima intracelular dando como resultado un producto fluorescente, la fluoresceína, esto está basado en que las células que presentan una membrana intacta además de actividad esterasa son capaces de acumular el producto fluorescente.

En los últimos años se han realizado estudios utilizando DAPI o bromuro de propidio como marcadores de fluorescencia, el primero es un fluorocromo nuclear que se excita con la luz ultravioleta para producir una fuerte fluorescencia azul cuando se encuentra unido al ADN, por lo general es utilizado para marcar células vivas, el otro fluorocromo es utilizado para el marcaje de células que se encuentran en la etapa final de la apoptosis, ya que estas presentan membranas más permeables y se intercala en el ADN dando un color rojo-naranja fluorescente.

Otras investigaciones se han dedicado a desarrollar marcadores más efectivos, como el FUN-1® desarrollado por Millard y col. [24], el cual es permeable a la membrana plasmática, el cual puede ser metabolizado y transportado a la vacuolas por células que presentan actividad metabólica, mientras que la células que no tienen esta actividad no lo transportan. Una vez en las vacuolas, el FUN-1 es compactado en estructuras cilíndricas. Las células marcadas con este fluorocromo pueden ser analizadas exponiéndolas a un haz de luz verde (480 nm), obteniendo una fluorescencia verde como respuesta, las células con actividad metabólica presentaran una fluorescencia tenue, mientras que las células muertas florecerán con mayor intensidad; si son expuestas a una luz azul (540 nm) se observaran las estructuras intravacuolares de las células vivas, las cuales florecerán de color rojo intenso (figura 4).

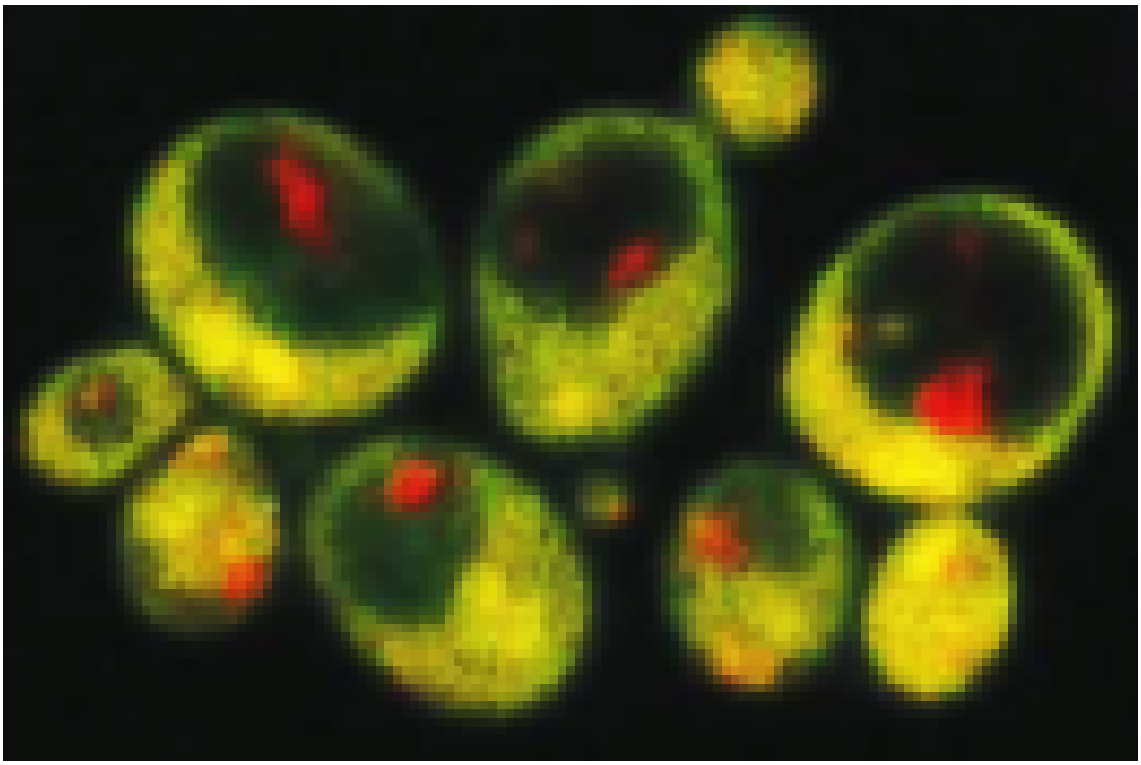

Figura 4. Células de *S. cerevisiae* marcadas con FUN-1 observadas en microscopia de fluorescencia [24].

2.2.5.2 Espectroscopia dieléctrica

La espectroscopia dieléctrica, a veces llamada de impedancia, mide las propiedades dieléctricas de un medio como función de la frecuencia, se basa en la interacción de un campo externo con un momento dipolar eléctrico de la muestra, normalmente expresado como permitividad. La permitividad está determinada por la tendencia de un material a polarizarse ante la aplicación de un campo eléctrico, en este contexto, las células vivas en un cultivo líquido, dependiendo de la frecuencia del campo eléctrico y decrece en una serie de pasos llamados dispersión, conforme la frecuencia incrementa.

La cuantificación de biomasa y la viabilidad por medio de espectroscopia dieléctrica ha sido establecida como una técnica estándar para el monitoreo y control de procesos en la industria cervecera [25], y también es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para el monitoreo de la células viables durante las fermentaciones con *S. cerevisiae* [26].

El equipo de espectroscopia dieléctrica consta de una sonda en línea que incorpora una serie de electrodos con cuatro terminales, dos terminales externas generan un campo eléctrico de radio frecuencia y las otras dos internas lo miden. El campo eléctrico produce iones suspendidos en el medio y ocasiones que algunos metabolitos que ese encuentra en el citoplasma de las levaduras se muevan hacia uno de los electrodos; debido a que la membrana plasmática no es conductora los iones no pueden moverse de manera libre a través de ella, ocasionando una acumulación de cargas que polarizan la célula, de esta manera las células actúan como pequeños capacitores dentro del medio de cultivo (figura 5), a esta capacidad que presentan las células para acumular carga eléctrica se le conoce como capacitancia [27–30].

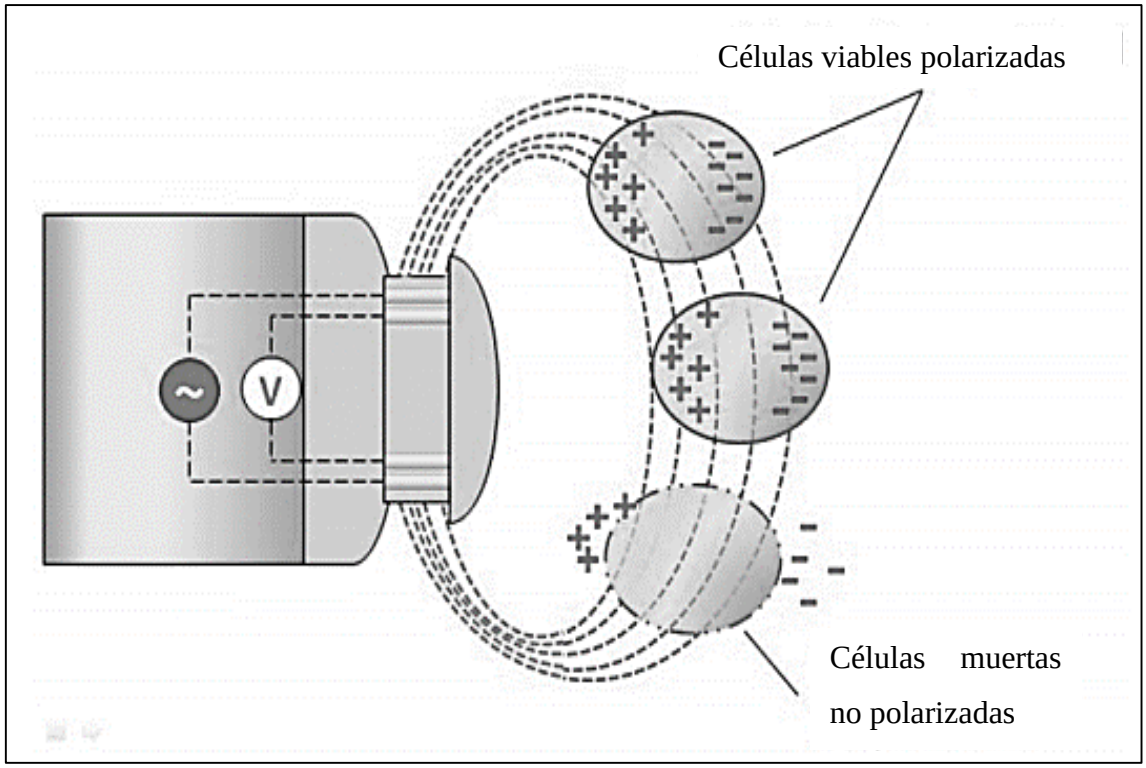

Figura 5. Esquema del principio de medición de la viabilidad con espectroscopia dieléctrica.

2.2.5.3 Sistema de análisis y conteo de células

Esta tecnología combina una técnica de medición de partículas, denominado principio de medición de resistencia, el cual consiste en exponer a la célula a un campo de baja tensión, la cual no permite el paso de la corriente eléctrica a través de su membrana cuando esta se encuentraz intacta; con el análisis de pulso de área, cuando las células son alineadas una por una

a través de un poro de medida preciso y se exponen a un campo eléctrico, la información de cada una de ellas puede ser analizada, como la concentración del cultivo, tamaño y viabilidad.

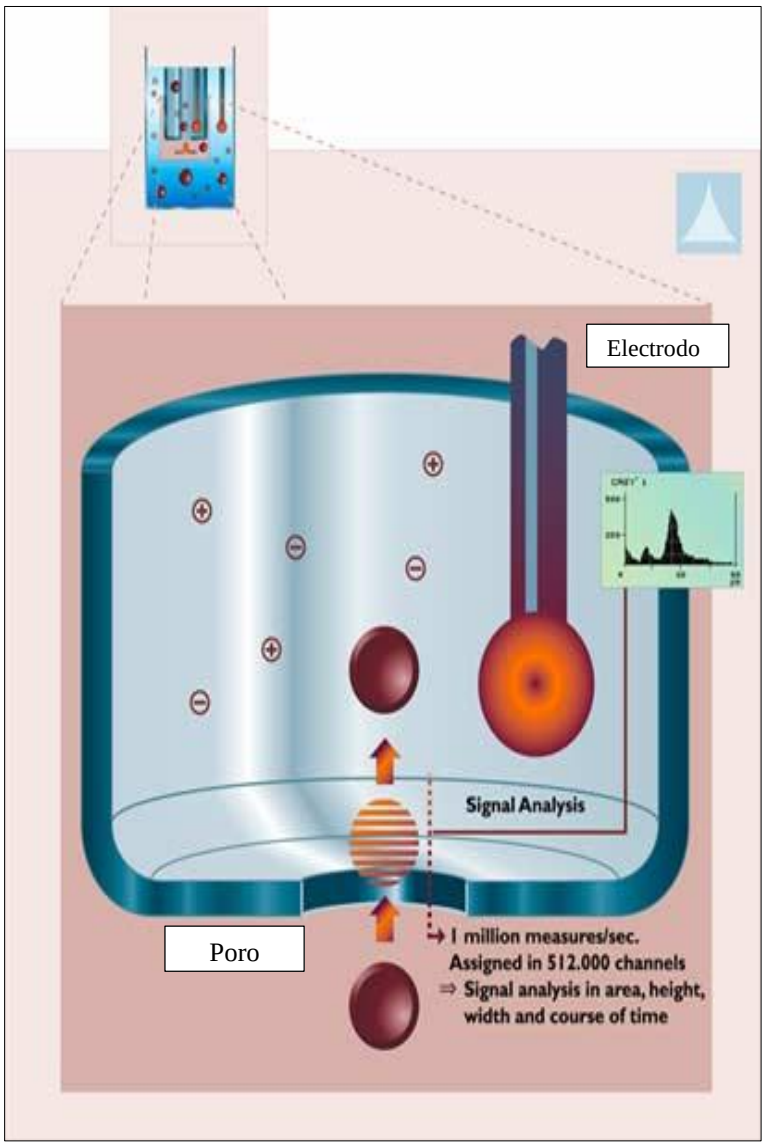

Figura 6. Principio de medición del tamaño celular con el CASY®

Estos datos se van acumulando y se asignan a un analizador multicanal calibrado con 500 000 canales, por lo tanto, la tecnología CASY® puede presentar los datos de cada celda como un gráfico de distribución de tamaño.

Figura 7. Sistema de análisis y conteo de células (CASY®)

2.3 Kluyveromyces marxianus

Mientras las aplicaciones en el sector de la biotecnología continúan desarrollándose, existe también un incremento en el interés por la aplicación de herramientas moleculares modernas para entender y mejorar algunos aspectos de las llamadas levaduras “no convencionales” [1]; y para fines de este trabajo muy particularmente de *Kluyveromyces marxianus*.

A diferencia de otras levaduras, *K. marxianus* es un microorganismo que tiene la capacidad de asimilar distintas fuentes de carbono a altas temperaturas [31], y de crecer por arriba de los 45° C. Varios autores han reportado que la cepa tiene la capacidad de crecer a temperaturas alrededor de 40° C, pero el tiempo de duplicación celular disminuye [32,33].

Esta especie tiene la capacidad de secretar enzimas. Una de estas enzimas es la fructanasa, su expresión es inducida por la inulina o sacarosa, y la cual puede ser secretada al medio de cultivo o permanecen asociadas a la pared celular [32,34] *K. marxianus* ha sido estudiada ampliamente en la producción de fructanasas, destinado a la producción de jarabe de fructosa a partir de

inulina. Las fructanasas de *K. marxianus* son consideradas exoinulinas debido a que presentan alta actividad enzimática en sacarosa que en inulina.

En un estudio realizado por Arrizon y col. [35] se observó que las cepas *K. marxianus* aisladas de la microbiota del mezcal en Oaxaca presentaron actividad fructanasa con sacarosa, fructanos de agave e inulina como inductores. Se observó que para el caso de la inulina la inducción fue mayor con respecto a los otros sustratos. La mayoría de los estudios referentes a *K. marxianus* apuntan hacia las aplicaciones biotecnológicas de la cepa, y no hacia lo que sucede a nivel intracelular de la levadura [36].

La cepa ha sido descrita como una levadura homotálica y perteneciente a la división *Ascomycota*, y usualmente es encontrada en productos lácteos, pero ha sido aislada de distintos hábitats [15] y esta filogenéticamente relacionada con *S. cerevisiae*, y es mejor conocida como la hermana de *Kluyveromyces lactis*.

2.3.1 Taxonomía y filogenia

Kluyveromyces marxianus fue descrita por primera vez en 1888 por E. C. Hansen, llamándola *Saccharomyces marxianus*, la cual se aisló de mostos de uva. Posteriormente en 1952 Marx describe en su monografía diez cepas de *S. marxianus*, las cuales presentaban diferencias con respecto a la formación de pseudomicelio, la capacidad de asimilación y fermentación de lactosa, esto debido a los diferentes hábitats de los cuales había sido aislada.

En 1956 Since Van der Walt propone el género *Kluyveromyces*, reportando sobre sus aspectos taxonómicos y las variedades dentro del género.

Puesto que el concepto biológico de especie no se puede aplicar a los organismos homtálicos, como la mayoría de las levaduras, en el taxón *Kluyveromyces* la clasificación está basada en criterios arbitrarios, que han ido cambiando a los largo del tiempo. En la actualidad se emplea el estudio multigenético de secuencias para dilucidar la filogenia de las diferentes cepas [37]. Utilizando esta estrategia, Kurtzman y Robnett [38] mostraron que las especies descritas por Lachance [39] en el género Kluyveromyces en realidad están distribuidas en seis clados, lo cual indica la polifilia de este grupo de levaduras. Esto se debe principalmente a que los anteriores criterios de clasificación, como la morfología asca, son insuficientes para describir la filogenia de una especie.

La relación filogenética de *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* se aprecia cuando se relaciona la genética y el metabolismo de la levadura dentro de estos dos géneros. Ambos géneros son parte del "complejo" *Saccharomyces*, en sí una subclase dentro de las saccharomycotinas o hemiascomicotas [40]. El "complejo" *Saccharomyces* se divide debido a una duplicación del genoma (WGD), la cual ocurrió hace unos 100 millones de años. Los géneros y las especies pertenecientes al "complejo" *Saccharomyces* se definen pre o post WGD. Las especies del género *Saccharomyces* son post WGD y las del género *Kluyveromyces* son pre WGD. Los genes que fueron sometidos al WGD presentaron flexibilidad para evolucionar nuevas funciones, característica que se cree que ha sido muy importante en la evolución de *Saccharomyces cerevisiae*. De ello se deduce que los genes homólogos entre *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* pueden haber divergido funcionalmente. Esto puede ser importante cuando se trata de comprender los procesos y vías metabólicas de las células [41].

2.3.2 Características generales

Ésta levadura es particularmente interesante debido a que a sus características que la hacen especialmente adecuada para la aplicación industrial, las cuales incluyen la rápida velocidad de crecimiento, su termotolerancia, la capacidad para asimilar una extensa gama de sustratos, secreción de enzimas líticas y la producción de etanol por medio de la fermentación [1].

Figura 8. Morfología de una colonia de *K. marxianus* en WL.

2.3.2.1 Termotolerancia

Las cepas pertenecientes a la especie *K. marxianus* han sido aisladas de una gran variedad de hábitats, dando como resultado una enorme diversidad metabólica y características distintas entre las cepas [37]. A diferencia de otras levaduras, *K. marxianus* es un microorganismo que tiene la capacidad de asimilar distintas fuentes de carbono a altas temperaturas [31], y de crecer por arriba de los 45° C [32].

Esta especie puede producir etanol y biomasa a temperaturas muy elevadas, en comparación con las demás cepas [42] y es una de las levaduras más termotolerantes con las que se disponen.

Varios autores han reportado que la cepa tiene la capacidad de crecer a temperaturas alrededor de 40° C, pero el tiempo de duplicación celular disminuye, esto podría ser muy importante desde el punto de vista industrial, ya que reduciría los costos en cuanto a la regulación de la temperatura de los biorreactores durante las fermentaciones a gran escala [32,33].

2.3.2.2 Metabolismo

Dada la diversidad de los hábitats de los que ha sido aislada la cepa, en consecuencia presentan una variedad metabólica, reportando la capacidad de asimilar distintas fuentes de carbono, secreción de diversas enzimas, así como la producción de etanol. La mayoría de los estudios referentes a *K. marxianus* apuntan hacia las aplicaciones biotecnológicas de la cepa, y no hacia lo que sucede a nivel intracelular de la levadura [1].

Al considerar el metabolismo, es notable que *K. marxianus* tiene una de las tasas más rápidas de crecimiento de cualquier otro microorganismo eucariota.

Aunque los componentes centrales de la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos están muy conservadas, la regulación difiere considerablemente entre las especies de levaduras [43]. Estas diferencias en los mecanismos de regulación dan lugar a una serie de particularidades como, los efectos Crabtree, Kluyver, Pasteur y Custer. Es cierto que estos efectos a un no se comprenden totalmente, pero generan una visión más compleja del metabolismo de los azúcares [5].

Las levaduras pueden ser clasificadas como aeróbicas, facultativas (respirofermentativas) o fermentativas en función a su status de oxígeno [44]. La cepa *K. marxianus* es una levadura

respirofermentativa que puede generar energía ya a través del ciclo del TCA por la fosforilación oxidativa o por fermentación a etanol. En el caso de *S. cerevisiae*, cuando el concentración de azúcar es alta, el metabolismo es dirigido hacia la fermentación, aunque la energía neta rendimiento es más bajo del que se podría generar en el ciclo de TCA. Este fenómeno se denomina el efecto Crabtree y es postulado para ofrecer una ventaja competitiva en ciertos nichos ecológicos [45]. Aunque *K. marxianus* están generalmente clasificada como Crabtree negativo, es portadora de los genes necesarios para la producción de etanol y bajo ciertas condiciones adoptará el estilo de vida, pero es necesario resaltar que existe conflicto en cuanto a esta clasificación se refiere, ya que en algunos estudios se ha reportado como Cabtree positivo [44].

Una de las características más notables de esta especie es su capacidad de consumir lactosa como fuente de carbono, un rasgo ausente en *S. cerevisiae*. La utilización de lactosa ha sido ampliamente estudiada en *K. lactis* y se asume que los aspectos fundamentales se conservan en *K. marxianus* [46]. La capacidad para utilizar lactosa es conferida por dos genes, LAC12, que codifica una permeasa de lactosa que es requerida para la absorción de lactosa en la célula, y LAC4, que codifica a una ß-galactosidasa que hidroliza la lactosa a monómeros de glucosa y galactosa. Al igual que en *S. cerevisiae*, la galactosa se metaboliza a glucosa-6-P a través de la vía de Leloir.

2.3.2.3 Producción de enzimas

En términos de estudios bioquímicos sobre las enzimas que tienen interés industrial, K. marxianus se ha utilizado como una fuente de producción de inulinasas, ß-galactosidasas, ß-glucosidasas, y endopoligalacturonasas como se muestra en la tabla 1.

Tabla 3. Estudios bioquímicos de producción de enzimas de interés industrial

ENZIMA	APLICACIÓN	CEPA	REFERENCIA
Inulinasa	Producción de fructosa de jarabe de inulina	CBS 6397, CBS 6556	Workman and Day (1984); Rouwenhorst et al. (1988, 1990)
ß-galactosidasa	Reducción de lactosa en alimentos	NCYC 11, ATCC 10022, IMB3 CBS 6556,	Mahoney et al.(1975); Gonçalves and Castillo (1982); Bacci Júnior et al.(1996); Brady et al. (1995); Martins et al. (2002)
ß-glucosidasa	Hidrólisis de celulosa	*K. fragilis* ATCC 12424	Raynal and Guerineau (1984); Leclerc et al. (1987)
Endopoligalacturonasas	Reducción de viscosidad en procesamiento de frutas	CCT 3172, CCT 3172 mutante	Jia and Wheals (2000
Fosfatasas	Modificaciones en la elaboración de queso, cualidades de caseína	No identificada	Jolivet et al. (2001)
Carboxypeptidasas	Reducción del amargor de las proteínas contenidas en alimentos	Propia	Ramírez-Zavala et al. (2004b)
Aminopeptidasas	Envejecimiento de lácteos y cárnicos	Propia	Ramírez-Zavala et al. (2004a)

2.3.2.4 Importancia y aplicaciones biotecnológicas

El desarrollo de aplicaciones biotecnológicas con *K. marxianus* ha sido motivada por una serie de ventajas que tiene en comparación con *K. lactis*. Estos incluye por lo menos el hecho de que puede crecer en una amplia variedad de sustratos y a temperaturas más altas, presenta mayores tasas de crecimiento y la tendencia para producir etanol que tiene cuando se expone a un exceso de azúcar [37].

El hecho de que varias cepas de *K. marxianus* han obtenido la denominación GRAS, de manera similar a *S. cerevisiae* y *K. lactis* [47] indica que en este aspecto no se impone ninguna desventaja para el anterior, cuando se compara con estas levaduras, en términos de proceso de aprobación de agencias de regulación.

K. marxianus posee la capacidad natural para excretar enzimas. Esta es una propiedad deseada para procesamiento rentable de las enzimas de bajo y mediano valor [33].

Se informó de que sólo aproximadamente el 2% de las especies de levaduras son capaces de fermentar la lactosa [5], entre las cuales se encuentran las del género *Kluyveromyces*. En un cribado realizado con cepas de levaduras que pertenecen a géneros distintos, sólo dos cultivos de *K. fragilis* y *Ferrissia fragilis* mostró actividad β-galactosidasa [48]. La lactosa es considerada la principal inductor de la síntesis de β-Dgalactosidase [49] y la producción de lactasa de *K. marxianus* utilizando suero de queso como fuente de alimento ha sido investigado por varios autores [50].

Otra de las enzimas es la Inulinasa, la cual es una enzima que rompe moléculas de fructosa a partir de inulina. Su expresión es inducida por la inulina o sacarosa, y la enzima puede ser excretada al medio de cultivo o permanecen asociadas a la pared celular [34,51]. *K. marxianus* ha sido estudiada ampliamente en la producción de inulinasa, destinado a la producción de jarabe de fructosa a partir de inulina [52]. Pessoa y Vitolo [53] obtuvieron la mayor actividad inulinasa con la cepa DSM 70106 *K. marxianus*, utilizando inulina como fuente de carbono.

2.3.3 Fructanasas

Estas enzimas son producidas por diversos microorganismos, de los más estudiados se encuentra las levaduras que pertenece al género *Kluyveromyces*, ya que como se mencionó con anterioridad se pueden encontrar en diversos ambientes, son termotolerantes, además de que presentan una alta tasa de crecimiento [54].

Las fructanasas pertenecen a la familia 32 de las glicosilhidrolasas, llamadas invertasas debido a que invierten la sacarosa, son enzimas que también presentan actividad transfructosilante, es decir que pueden transferir un grupo fructosil de un donador a un aceptor [55].

Las fructanasas son las enzimas responsables de hidrolizar enlaces β-2-1 o β-2-6 de los fructanos para liberar fructosa [56]. Dentro de este grupo de enzimas podemos encontrar a las que hidrolizan fructanos desde su extremo reductor β-2-1 o β-2-6, algunos ejemplos de este tipo son, las exo-β-fructosidasas (exoinulinasas y exolevansas) y β-2-6-fructano-6-levanobiohidrolasas. Estas enzimas también incluyen a las endoinulinasas, las cuales hidrolizan específicamente los enlaces internos β-2-1 de la inulina. Finalmente las endolevansas que hidrolizan específicamente los enlaces β-2-6 en el levano.

En la estructura tridimensional que presenta la familia 32, ll núcleo de la estructura consiste de cinco hojas-β-hélice añadida a una β-sandwich, que consta de dos láminas de seis β-hebras. A pesar de la baja similitud en la secuencia dentro de los módulos de sándwich, todos los miembros de la familia 32 contienen un módulo [57].

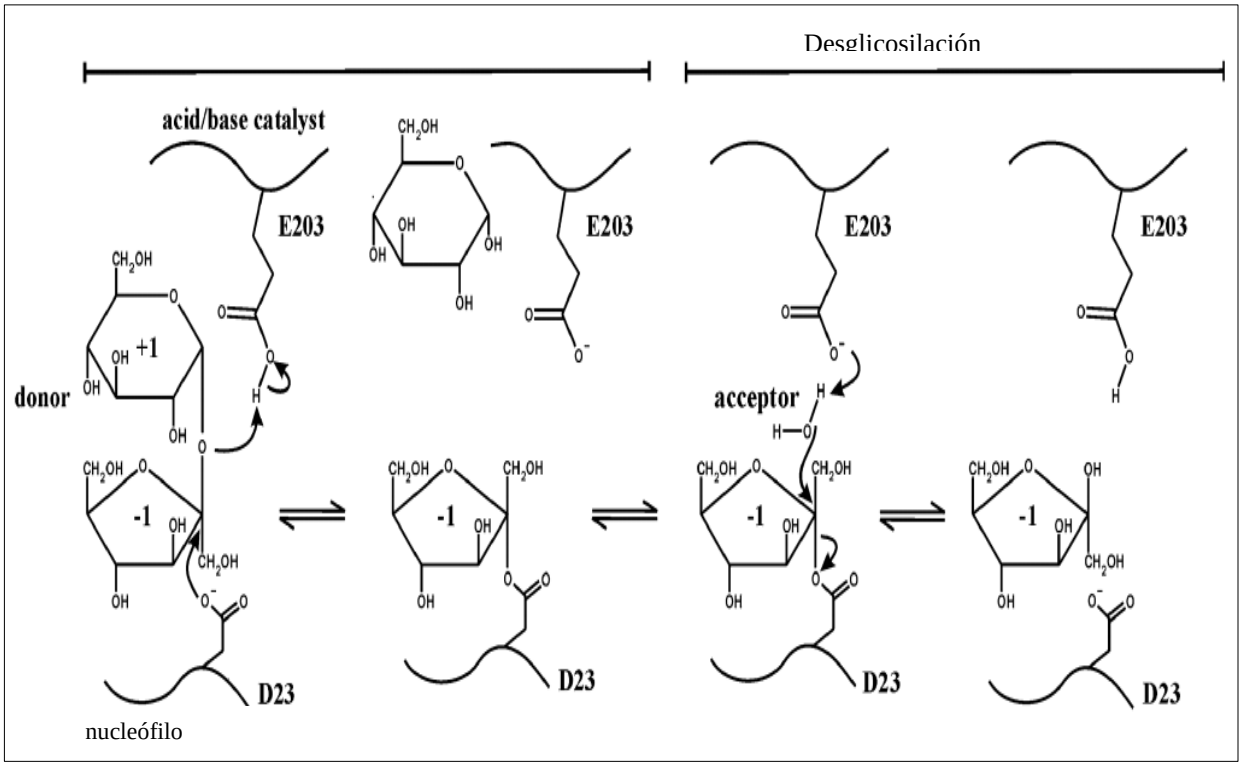

Figura 9. Mecanismo de reacción de las fructanasas.

2.3.3.1 Usos y aplicaciones

Este tipo de enzimas pueden ser utilizadas para la producción de jarabes de alta fructosa y de oligofructanos, estos últimos han despertado el interés debido a su aplicación funcional [58].Para su aplicación en la industria de alimentos y bebidas en la industria alimenticia, las enzimas microbianas requieren un cierto grado de purificación, este proceso a partir de un medio de fermentación por lo general implica una combinación de técnicas que separan las enzimas de acuerdo a su tamaño, carga o capacidad de unirse a otros compuestos.

Se han realizado estudios para la optimización de la hidrólisis de fructanos de agave, realizando estudios desarrollando procesos enzimáticos para reducir el consumo de energía y para aumentar la recuperación de azúcar [56].

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudiar la fisiología de *Kluyveromyces marxianus* evaluando el efecto de la temperatura, calcio y magnesio en la producción de fructanasas.

3.1.1 Objetivos específicos

- Observar el efecto de distintas fuentes de carbono y de la temperatura en la inducción de la actividad fructanasa a nivel matraz.
- Evaluar el efecto del medio de cultivo y la temperatura en la inducción de la actividad fructanasa a nivel matraz
- Montar técnicas analíticas para evaluar el estado fisiológico de la cepa.
- Evaluar el efecto de la temperatura, calcio y magnesio sobre la producción de fructanasas mediante un diseño experimental a nivel matraz.
- Realizar un cultivo en continuo para evaluar los cambios fisiológicos de *K. marxianus* en la producción de fructanasas.

4 HIPÓTESIS

Los cambios de temperatura y la adición de distintas concentraciones de calcio y magnesio al medio de cultivo afectarán el estado fisiológico de *Kluyveromyces marxianus*, lo cual se verá reflejado en la producción de fructanasas.

5 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la mayoría de los estudios referentes a *K. marxianus* están dirigidos hacia explorar las posibles aplicaciones industriales que presenta esta especie, sin investigar lo que sucede a nivel intracelular, y debido a esto poco se conoce acerca de su bioquímica, metabolismo y fisiología celular.

Aunado a lo anterior y a que no se tienen muchos reportes del estado fisiológico de *K. marxianus* este trabajo estará enfocado a estudiar los cambios que sufre la levadura cuando es sometida a temperaturas elevadas y a lo que sucede con la expresión de las fructanasas en estas condiciones, así como también el efecto que tienen el calcio y el magnesio en la expresión de la enzima de interés.

6. METODOLOGÍA

Se estudiaron los cambios fisiológicos de *Kluyveromyces marxianus* durante el cultivo a distintas temperaturas y diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de cultivo para observar las repercusiones sobre la secreción de una fructanasa.

6.1 Materiales

6.1.1 Microorganismo

Se trabajó con una levadura de la especie *Kluyveromyces marxianus* denominada SLP1, la cual pertenece a la colección de la Unidad de Biotecnología industrial de CIATEJ, esta levadura fue aislada de la fermentación del mezcal en San Luis Potosí, México.

6.1.2 Medios de cultivo

Durante el desarrollo de la experimentación se utilizaron diferentes medios de cultivo de acuerdo con las necesidades del experimento.

El YPD fue utilizado para la etapa de proliferación de la cepa, tanto liquida como sólida, cuya composición se describe en la Tabla 4, fue ajustado a un pH de 4.5 ± 0.5 y esterilizado por 15 min a 121° C.

Tabla 4. Composición del YPD

Compuesto	Concentración [g/l]
Glucosa	20
Extracto de levadura	10
Bactopectona	20
*Agar	20

Para la inducción de la enzima y el análisis del estado fisiológico de la cepa fueron utilizados dos medios de cultivo de composición mineral. En la tabla 5 se describe la formulación del medio mineral descrito por Arrizon y col. (), las sales son esterilizadas por separadas, este medio fue utilizado en la etapa de inducción de la enzima y para la caracterización de la misma.

Tabla 5. Composición del medio mineral (Arrizon y col.)

Compuesto	Concentración
Fuente de carbono	50 g/l
Urea	1.0 g/l
K_2HPO_4	3.0 g/l
$MgSO_4$	2.0 g/l
$CaCl_2$	0.002 M
$MnCl_2$	0.002 M

En la etapa del estudio fisiológico se utilizó el medio químicamente definido que se describe en la tabla 6, tanto las vitaminas como los oligoelementos se esterilizan por filtración con una membrana de 0.2 µm y por separado, las sales se esterilizaron por calor.

Tabla 6. Composición del medio químicamente definido

SALES		**OLIGOELEMENTOS**		**VITAMINAS**	
Compuesto	[g/l]	Compuesto	[g/l]	Compuesto	[g/l]
KH_2PO_4	3	$MgCl_2$, $6H_2O$	0.41	Ácido aminobenzoico	0.001
$(NH_4)2SO_4$	3	$ZnCl_2$	0.019	Myo-inositol	0.125
Na_2HPO_4, $2H_2O$	1.49	$CuCl_2$, $2H_2O$	0.0006	Ácido nicotínico	0.005
Glutamato de sodio	1	$MnCl_2$, $4H_2O$	0.0044	Ácido pantoténico	0.005
		$CoCl_2$, $6H_2O$	0.0005	Piridoxina	0.005
		$CaCl_2$	0.0173	Tiamina HCl	0.005
		$FeCl_2$, $4H_2O$	0.0116	Biotina	0.000012
		$(NH_4)6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$	0.0003		
		H_3BO_3	0.003		
La fuente de carbono dependerá del experimento a realizar (50 g/l)					

6.2 Métodos

6.2.1 Preparación del inóculo

Para la etapa de propagación se partió de un criovial siguiendo los siguientes pasos:

1. Se activó la cepa en un medio YPD líquido
2. Posteriormente se pasó a un medio mineral

Tanto el YPD como el medio mineral tuvieron las mismas condiciones de cultivo, 250 rpm, pH 5 y una concentración de glucosa de 20 g/l. La etapa de propagación en YPD duró entre 12 y 24 h, la siguiente etapa tuvo una duración de 8 a 12 h, esto para garantizar que la cepa se encontrará en la velocidad máxima de crecimiento.

Una vez hecho esto, se procedió a inocular los distintos experimentos a una concentración de $1x10^6$ cel/ml en las etapas de nivel matraz y en la fase de biorreactor con $10x10^6$.

6.2.2 Técnicas para evaluar la fisiología

Se realizaron diferentes técnicas analíticas para la determinación del estado fisiológico de la cepa, las cuales dividieron de acuerdo al aspecto que evalúan (Tabla 7) ya que en un cultivo se encuentran diferentes sub-poblaciones de células.

Tabla 7. Técnicas para evaluar las diferentes sub-poblaciones celulares

	Sub-población	**Técnica**
	Totales	DO Conteo al microscopio CASY® Peso seco
	Muertas	Fluorescencia
	Viables	Fluorescencia Capacitancia
	Cultivables	UFC

A demás de la evaluación de las diferentes sub-poblaciones del cultivo se analizó el diámetro de las células y se determinó el consumo de sustrato durante la cinética de cultivo, así como también se cuantifico la actividad enzimática.

6.2.2.1 Cuantificación de la población

I. Conteo en cámara de Neubauer

Esta técnica se utilizó para cuantificar el crecimiento de la población celular, para lo cual se tomó una muestra y se depositó en la cámara, posteriormente se observó la muestra al microscopio en el objetivo de 40x. Para realizar el cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

Población celular ($x10^6$ cel/ml) = (T(C)*0.25) /D

En donde:

T: total de células contadas

C: cuadros que se contaron

D: dilución utilizada

II. Densidad óptica (DO)

Para observar el perfil de crecimiento se cuantificó la absorbancia de las muestras a través del tiempo, la medición fue realizada a 600 nm en un espectrofotómetro de microplacas, se depositaron 200µl en uno de los pozos de la microplaca considerando que la absorbancia no pasara de 1, para lo cual se realizaron las diluciones pertinentes, las mediciones se realizaron por duplicado.

III. Peso seco

Esta medición se realizó para conocer la biomasa producida durante la cinética de crecimiento. Se utilizaron mirotubos de 2ml a peso constante, se agregaron 1.5 ml de muestra y posteriormente se centrifugo a 13000 rpm durante 5 minutos para separar las células del medio, se realizaron dos lavados de la pastilla resuspendiendola en 1ml de agua destilada, una vez terminados los lavados las muestra fueron colocadas en un horno de secado a 50° C por 72 h.

Una vez secas las muestras se colocaron en un desecador por 24 h y posteriormente se pesaron. Los datos fueron obtenidos restando el peso del microtubo con muestra del microtubo sin muestra.

IV. Sistema de análisis y conteo de células (CASY®)

Se utilizó un contador de partículas de la marca Innovatis modelo CASY Model® TT para determinar el diámetro y la población celular durante la cinética de crecimiento. Se tomó un muestra la cual se resuspendió en 10 ml de buffer (CASYton®) en un recipiente libre de partículas (CASYcup®) para que no interfiera en la medición, se realizaron las diluciones pertinentes para tener una concentración máxima de $1x10^5$ cel/ml, las diluciones también fueron realizadas con el buffer especial.

Posteriormente la muestra fue colocada en el equipo para realizar la medición, el equipo realiza tres mediciones succionando cada vez 200µm, los datos arrogados por el equipo fueron visualizados en el programa CASY Excel®.

6.2.2.2 Microscopia de fluorescencia

Se utilizó un fluorocromo de *Life technologies* FUN®1, el cual diferencia células metabólicamente activas de las que no lo están, por medio de fluorescencia.

El reactivo debe de estar a una concentración de 10 mM en dimetilsulfóxido anhidro (DMSO), el cultivo celular debe tener entre 10^7 o 10^8 cel/mL de concentración. Se realizó el siguiente procedimiento: centrifugar la muestra y retirar el sobrenadante, después resuspender la patilla en 1 mL de buffer Na-HEPES (2% glucosa y 10 mM de Na_2HPO_4), para posteriormente agregarle 2 µl de FUN1®, homogenizar la mezcla e incubar a 30°C en oscuridad y con agitación (700 rpm) por 30 minutos, por último observar al microscopio de fluorescencia.

Para observar las muestras se utilizaron dos longitudes de onda, 480 nm (luz azul) para observar las células que no se encontraban metabólicamente activas (muertas) emitiendo una fluorescencia verde, y 540 nm (luz verde) para observar las células metabólicamente activas, la cual emite fluorescencia roja. Se fotografiaron las muestras con una cámara acoplada al microscopio y fueron visualizadas con el software Image-Pro® Plus.

6.2.2.3 Espectroscopia dieléctrica (sonda de capacitancia)

Esta técnica se implementó para determinar la viabilidad del cultivo a nivel biorreactor utilizando la sonda FOGALE® nanotech de espectroscopia dieléctrica. La sonda fue colocada en un puerto de la tapa del reactor antes de ser esterilizado, para después ser conectada a su terminal EVO® Box y se utilizó el software EVO® 400 para registrar en línea los datos generados por la sonda.

6.2.2.4 Unidades formadoras de colonia (UFC)

Se utilizó esta técnica para determinar la cultivavilidad de las células, esta técnica consiste en crecer las células en un medio rico en nutrientes

Primero se tomó una muestra del cultivo en condiciones estériles, después se realizaron las diluciones seriadas pertinentes para obtener de 500 a 1000 células en la muestra, después se colocaron 100 µl de la muestra en la caja petri y se extendió sobre la placa. La incubación duró entre 2 y 3 días, posteriormente se hizo el recuento de las colonias formadas.

6.2.3 Consumo de sustrato

6.2.3.1 Determinación de azúcares totales

El método utilizado fue el de Antrona en ácido sulfúrico concentrado, el ácido hidroliza los enlaces glucosídicos obteniéndose así monosacárido, los cuales son deshidratados a furfural y sus derivados, los productos formados reaccionan con la antrona (10-ceto-9,10-dihidroantraceno), dando como resultado un color azul verdoso que se analiza espectrofotométricamente.

La determinación se realiza colocando 100µl de la muestra previamente diluida para que quede en una concentración entre 0.1 a 0.0125 g/l de azucares, posteriormente se le agregan 200µl del reactivo, se homogeniza la muestra y la reacción es llevada a cabo en baño de agua en ebullición durante 10 minutos, inmediatamente se detienen la reacción en baño de hielo, por último se realiza la medición colocando 200µl del resultado en una microplaca, la cual es leída a 620 nm.

Se realiza una curva de calibración que va de 0.1 a 0 g/l de sacarosa para cuantificación de los resultados, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

6.2.3.2 Determinación de azúcares reductores

Se utilizó la Técnica de Miller (DNS). Esta técnica se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalisílico en ácido 3-amino-5 nitrosalisílico, cuando los grupos aldehídos son oxidados por los grupos carboxilos.

La medición de los azúcares reductores se realizó de la siguiente manera; se centrifugaron las muestras para retirar las células por 5 minutos a 13000 rpm y se diluyó la muestra para obtener una concentración de azucares de 0.5 a 2 g/l. Posteriormente en tubos se colocaron 100 µl de muestra y se añadieron 100 µl de reactivo de DNS, se homogenizó la mezcla y después se colocaron en baño de agua a ebullición durante 5 min. Terminada la incubación se colocaron en baño de hielo por 5 min para detener la reacción y se añadió 1 ml de agua destilada. Las muestras se leyeron a 540 nm.

Para la cuantificación de los resultados se realizó una curva de calibración de 0.5 a 2 g/l de concentración de glucosa o fructosa.

6.2.4 Actividad fructanasa

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizará un ensayo indirecto en donde los productos de reacción son detectados espectrofotométricamente tras su conversión en derivados coloreados. Para la cuantificación se realizará una curva de calibración con fructosa.

1. Colocar en tubo de 1.5 ml 50 µl del sustrato y posteriormente añadir 50 µl del extracto enzimático previamente diluido (si fuese necesario).
2. Homogenizar la mezcla para después incubarla por 15 minutos a 50°C
3. Una vez terminada la incubación añadir 200 µl del reactivo DNS
4. Agregar al blanco los 50 µl de extracto enzimático
5. Posteriormente seguir la metodología para cuantificar azúcares reductores

6.2.5 Caracterización del extracto enzimático

Para la caracterización del extracto enzimático se utilizaron fructanos de agave como fuente de carbono a 50 g/l en medio mineral, las condiciones del cultivo fueron 30º C y 250 rpm, la actividad fructanasa fue determinada usando fructanos de agave como sustrato.

Primero se verifico el tiempo óptimo de reacción que fue de 15 a 30 minutos, después el pH óptimo variándolo de 4.5 a 7, así como también la temperatura (35 a 60º C) y concentración de sustrato, que varió de 0.20 a 1.20%.

6.2.6 Efecto de la fuente de carbono y la temperatura

Para evaluar el efecto de las diferentes fuentes de carbono y de la temperatura sobre la inducción de la actividad fructanasa se realizaron fermentaciones en lote a nivel matraz, las cuales se hicieron por duplicado. Se varió la temperatura en 22, 30, 37 y 40º C, además de la fuente de carbono (50 g/l), fructosa, glucosa y fructanos de agave. El medio de cultivo utilizado fue el mineral, la agitación fue de 250 rpm y pH 5.

Posteriormente una vez determinada la fuente de carbono inductora de la enzima se realizó un experimento (Tabla 8) en donde se variaron la temperatura y el medio de cultivo, estos experimentos también fueron realizados a nivel matraz a las mismas condiciones anteriores.

Tabla 8. Experimento para determinar el efecto de la temperatura y el medio de cultivo sobre la actividad fructanasa.

Temperatura °C	Medio de cultivo
20	Mineral
20	Químicamente definido
32.5	Mineral
32.5	Químicamente definido
45	Mineral
45	Químicamente definido

En estos dos experimentos anteriores se siguió una cinética durante 72 h, se cuantificó la actividad enzimática y el crecimiento celular.

6.2.7 Efecto de la temperatura, calcio y magnesio

Para a evaluación del efecto de la temperatura y minerales (calcio y magnesio) sobre la producción de la actividad fructanasa se realizó un diseño experimental multifactorial con dos

bloques y dos puntos al centro por cada bloque (Tabla 9). Se realizaron 36 experimentos por duplicado a nivel matraz.

Tabla 9. Diseño multifactorial para evaluar el efecto de la temperatura, calcio y magnesio

Factor	Bajo	Alto	Niveles
Temperatura (°C)	20	45	4
Calcio (mg/l)	1	1500	3
Magnesio (mg/l)	5	250	3

Los experimentos se realizaron a las mismas condiciones de cultivo del diseño anterior, utilizando como fuente de carbono fructanos de agave (50 g/l). Se cuantifico la actividad enzimática, consumo de azucares, el crecimiento y el diámetro celular.

6.2.8 Cultivo en biorreactor para evaluar la fisiología

Se realizaron dos cultivos a nivel biorreactor, primero un cultivo en batch para la implementación de todas las técnicas analíticas y posteriormente un cultivo en continuo para evaluar el estado fisiológico de la cepa. Para ambos cultivos se utilizó un biorreactor Applikon® con capacidad de 3 l y se conectaron los electrodos para monitorear y/o controlar pH, oxígeno disuelto, temperatura y capacitancia, los electrodos fueron previamente calibrados a la esterilización. Se colocaron mangueras Masterflex® L/S 16 para alimentar las soluciones para controlar el pH, para tomar muestra, para la entrada y salida de aire, también se colocaron filtros de 0.22µm a cada una de las mangueras, excepto a la toma de muestra, esto para mantener la esterilidad. Para ambos cultivos se utilizaron 1.5 l de medio químicamente definido, el reactor fue esterilizado por calor a 121° C por 15 minutos.

Después del ciclo de esterilización el reactor se enfrió antes de ser conectado a todos los aditamentos del biocontrolador Applikon® ADI 1030. Una vez conectado el reactor se polarizó el controlador de oxígeno disuelto mínimo durante 12 h antes de iniciar con la fermentación y por último se conectó la sonda de capacitancia. Las condiciones de cultivo para ambos reactores fueron 30° C, pH 5, la aireación fue de 1 vvm y con agitación de 500 rpm.

Para el cultivo en batch se utilizaron fructanos de agave como fuente de carbono a una concentración de 50 g/l, se monitoreo el cultivo durante 48 h y se tomaron muestras cada hora hasta alcanzar la fase exponencial, durante la fase estacionaria los muestreos fueron más espaciados. Se realizaron las técnicas para evaluar la fisiología, se cuantificó el consumo de sustrato y la actividad enzimática.

Para el cultivo en continuo se utilizó como fuente de carbono glucosa a 25 g/l, primero se realizó un cultivo en batch y una vez alcanzada la fase exponencial se dio inicio con el continuo. El flujo de alimentación fue de 140 ml/h, se realizaron pulsos de cloruro de calcio y magnesio, posteriormente se cambió la temperatura de cultivo a 37° C, el combio de temperatura se mantuvo durante un estado de residencia y luego que se dejaron correr 5 estados de residencia para permitir que la levadura regresara al estado fisiológico de las condiciones de cultivo inicial. Al igual que en el cultivo en batch se realizaron las mediciones para evaluar la fisiología de la cepa durante el cultivo y la producción de la enzima.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del extracto enzimático

Para conocer las mejores condiciones de reacción en la actividad fructanasa, Se realizó la caracterización del extracto enzimático. El extracto enzimático se obtuvo retirando la biomasa del medio de cultivo por centrifugación, se utilizó como inductor fructanos de agave a 50 g/l, las condiciones del cultivo fueron 30º C, 250 rpm y pH 4.7.

Primero se realizaron reacciones enzimáticas con diferentes tiempos de reacción, en un rango de 15 a 30 minutos con intervalos de 5 minutos, se observó que 15 minutos es tiempo suficiente para que la enzima lleve a cabo la hidrolisis enzimática.

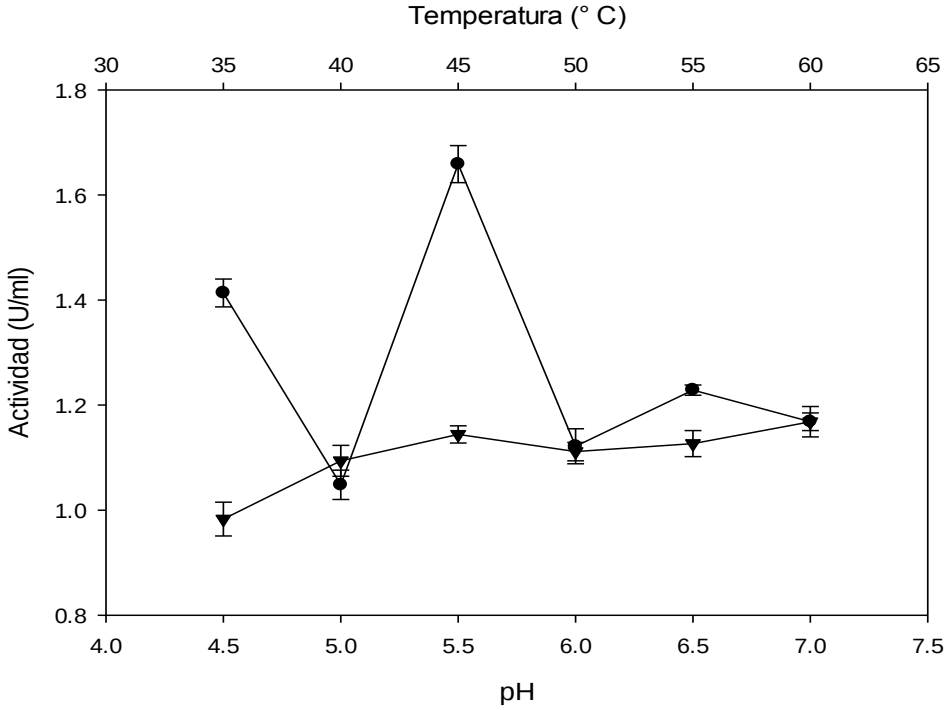

Figura 10. Caracterización de extracto enzimático producido con *K. marxianus*. pH ▼, temperatura ●

Posteriormente se evaluaron distintos pH, una vez que se obtuvo la mejor condición se procedió con la cuantificación a diferentes temperaturas, los resultados obtenidos se muestra en la Figura 10.De acuerdo a lo reportado el óptimo de temperatura se encuentra a los 50º C lo cual difiere de lo obtenido en este trabajo ya que el óptimo de temperatura se presenta a 45º C; para el caso

del pH observamos que la actividad enzimática se mantiene constante alrededor de 1 a 1.2 U/ml en los pH probados.

Por último se evaluó la concentración de sustrato, como podemos observar en la Figura 11 el 1% de sustrato resultó la mejor condición.

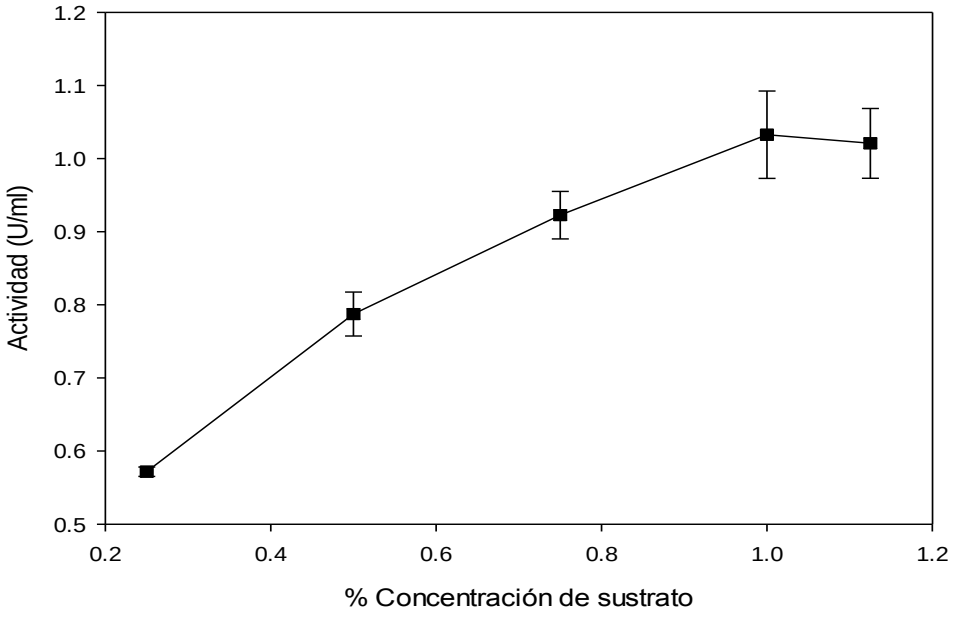

Figura 11. Caracterización de extracto enzimático variando la concentración de sustrato. Concentración de fructanos de agave (■)

7.2 Efecto de la fuente de carbono y temperatura en la inducción de actividad fructanasa

Se realizaron diferentes cultivos con tres diferentes fuentes de carbono con 50 g/l (glucosa, fructosa y fructanos de agave) para observar el efecto que tenían sobre la inducción de la actividad fructanasa, así como también se probaron diferentes rangos de temperatura de 22° a 40° C.

7.2.1 Crecimiento

En las siguientes gráficas (Figura 12 a 15) se observan las cinéticas de crecimiento obtenidas durante los cultivos a diferentes condiciones. Las gráficas están presentadas por condición de temperatura, de este modo en la figura 12 observamos el crecimiento de la cepa en tres distintas

fuentes de carbono a una temperatura de cultivo de 22° C apreciando que la mayor población se obtuvo utilizando fructanos de agave como fuente de carbono, llegando por arriba de $500x10^6$ cel/ml, para el caso de la glucosa y la fructosa observamos que la cepa tuvo un comportamiento similar, se obtuvo una población máxima de aproximadamente $100x10^6$ cel/ml. En las tres condiciones la fase exponencial se presentó después de las 12h de cultivo.

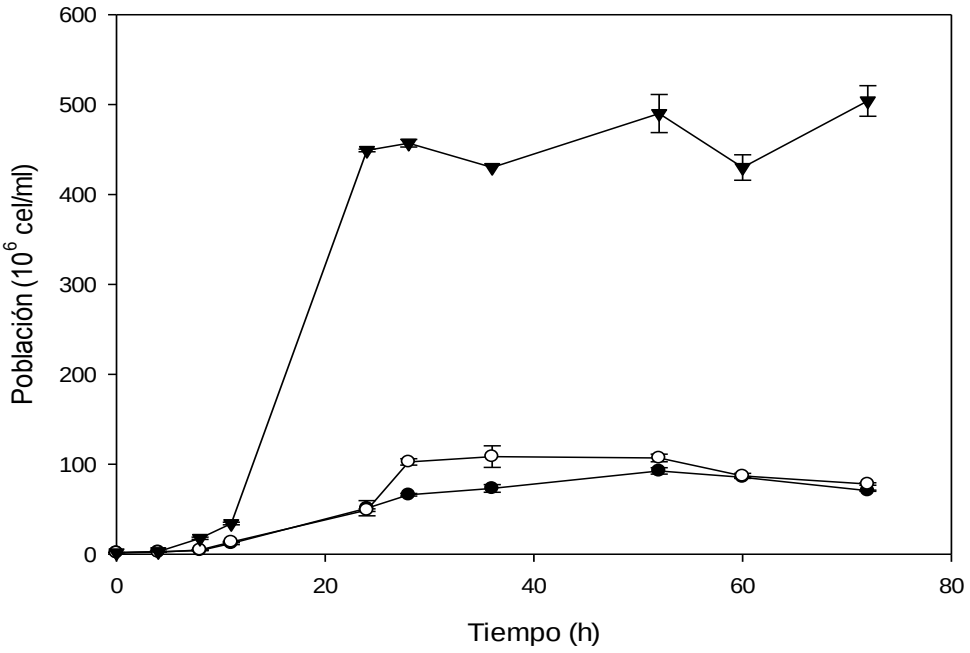

Figura 12. Cinéticas de crecimiento a 22° C con diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼)

Existen diversos reportes sobre la capacidad de *Kluyveromyces marxianus* para asimilar distintos sustratos a elevadas temperaturas (en un rango de 37 a 45°C), es decir es una especie termotolerante [1,36,37], pero resulta interesante que el mayor crecimiento se haya presentado a 22°C utilizando fructanos de agave como fuente de carbono, lo cual difiere de lo reportado hasta el momento.

Para el caso de los cultivos realizados a 30° C (Figura 13) observamos el mismo comportamiento presentado en la figura 12, solo que en este caso la población máxima estuvo por debajo de los $450x10^6$ cel/ml; de igual manera, en la glucosa y la fructosa se obtuvo un comportamiento muy parecido.

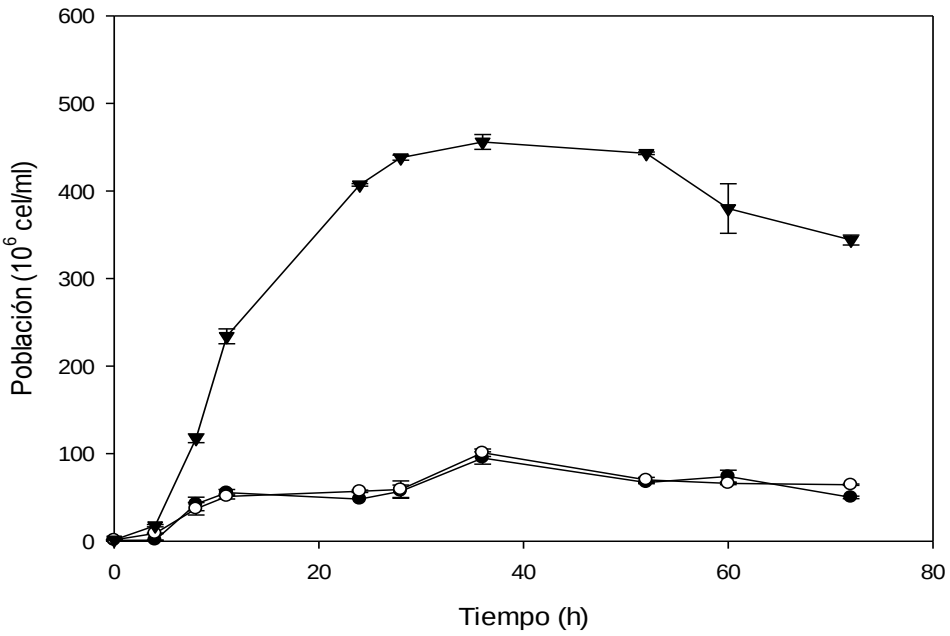

Figura 13. Cinéticas de crecimiento a 30° C con diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).

Uno de los aspectos importantes a resaltar es que existe un mayor crecimiento de la cepa en fructanos de agave con respecto a las otras fuentes de carbono utilizadas, de la figura 12 a la 15 se observa que el mayor crecimiento se presenta cuando la cepa es inoculada en un medio con fructanos de agave como fuente de carbono independientemente de la temperatura del cultivo. Esto se puede deber a que los fructanos de agave resultan ser una fuente de carbono compleja, la cual es rica en minerales, lo cuales pueden proporcionar un beneficio para el crecimiento de la cepa en presencia de ellos.

Rocha y col.[60] realizaron un estudio entre cepas de *K. marxianus* para determinar la diversidad fisiológica que existe entre ellas, utilizaron glucosa, sacarosa y lactosa como fuente de carbono, estableciendo que las cepas evaluadas no presentaban ninguna preferencia por alguno de estos azúcares, caso contrario a lo observado en estos resultados, además observaron que la mayor producción de biomasa se presentó en 30 y 37º C con diferentes fuentes de carbono empleadas en sus experimentos.

De acuerdo a los resultados mostrados en las gráficas anteriores se puede inferir que conforme va aumentando la temperatura el crecimiento de la cepa va disminuyendo.

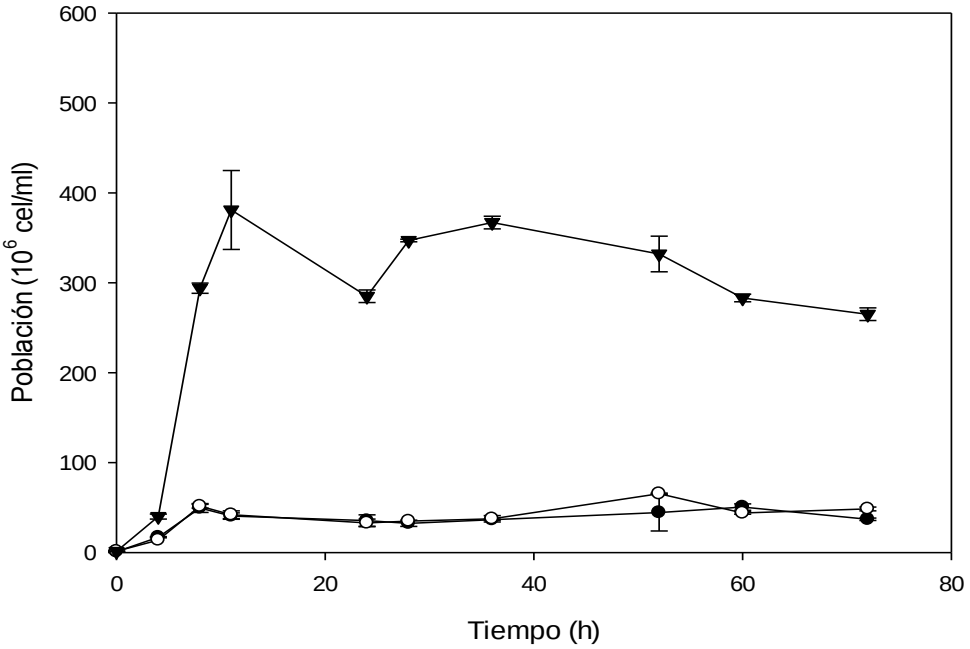

Figura 14. Cinéticas de crecimiento a 37° C con diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).

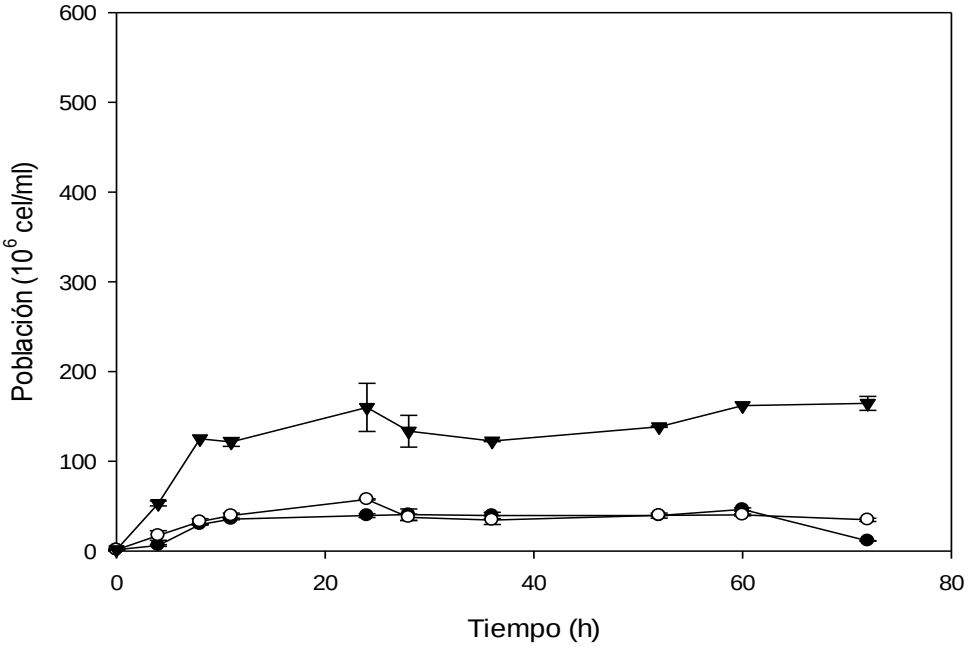

Figura 15. Cinéticas de crecimiento a 40° C con diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼)

7.2.2 Actividad fructanasa

Como podemos observar en la siguientes gráficas (Figura 16 a 19) se presentan las cinéticas de actividad fructanasa con respecto a las diferentes temperaturas y las distintas fuentes de carbono empleadas, en donde se aprecia que la actividad fue más elevada utilizando fructanos de agave como fuente de carbono en todas las temperaturas con respecto a la fructosa y la glucosa. Debido a que la cepa utilizada en este estudio fue aislada de la fermentación del agave para la producción artesanal del mezcal puede que haya evolucionado, expresando enzimas específicas para hidrolizar los fructanos de agave, en este caso las fructanasas [59].

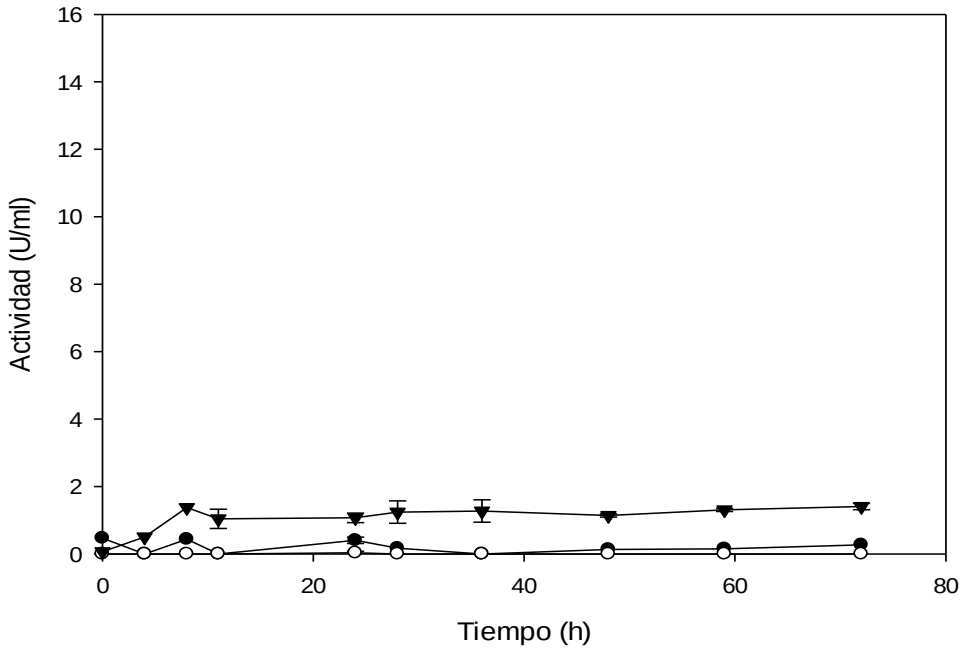

Figura 16. Cinética de actividad fructanasa en cultivos a 22° C utilizando diferentes fuentes de carbono como inductor. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).

En estudios anteriores se ha reportado que la glucosa presenta un efecto represor sobre la expresión de las fructanasas [61,62], la represión catabólica es un fenómeno en el cual la glucosa y azúcares relacionados reprimen la transcripción de genes que codifican enzimas necesarias para la utilización de fuentes alternativas de carbono; algunos de estos genes también son reprimidos por otros azúcares tales como galactosa [63].

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en estos experimentos, donde se puede observar claramente qué la glucosa no es inductor para la fructanasa; Gupta et al., (1994) observaron que la fructosa inducía la actividad inulinasa con *K. fragilis,* pero en menor medida que la inulina. Estos resultados se asemejan a los datos obtenidos en este trabajo, la actividad fructanasa se induce con fructosa pero se presenta una mayor actividad enzimática con fructanos de agave como inductor.

Los azucares represores, como en este caso fue la glucosa, producen señales que modifican la conformación de ciertas proteínas que, a su vez, directamente o a través de una cascada de regulación afecta a la expresión de los genes sujetos a represión catabólica. Estos genes no son controlados por un único conjunto de proteínas reguladoras, pero hay diferentes circuitos de represión para los diferentes grupos de genes [64]. Aunque el conocimiento de la represión catabólica es todavía muy incompleta, es posible en ciertos casos proponer un modelo parcial de la forma en el que los diferentes elementos que intervienen en la represión catabólica puedan integrarse.

Existen dos mecanismos por los cuales la glucosa puede afectar la tasa de transcripción de ciertas proteínas, pueden interferir con activadores de la transcripción, o que facilitar la acción de las proteínas con un efecto negativo sobre la transcripción. En las levaduras la glucosa no actúa directamente sobre las proteínas de unión al ADN, pero produce señales que se trasmiten a través de una serie de proteínas a los promotores de los genes correspondientes [63].

En la figura 17 observamos que igual que en los resultados obtenidos a 30° C, la máxima actividad se presentó utilizando fructanos de agave como inductor, se puede apreciar que existe un pico máximo alrededor de las 24 h de cultivo por arriba de las 8 U/ml; Singh y col. [65] realizaron un estudio para observar el efecto de diferentes fuentes de carbono en la inducción de la actividad inulinasa, el cual mostró que la inulina fue el mejor inductor para esta enzima, resultados similares a lo obtenido en estos experimentos, aunque no sean la misma fuente de carbono, los dos resultan ser polisacáridos de fructosa. Por otro lado cabe señalar que en este trabajo se obtuvieron mejores resultados en cuanto a actividad se refiera, mientras que en el hecho por Singh y col. lograron producir 3.4 U/ml hasta las 60 h.

En la figura 16 se observa la cinética de actividad fructanasa obtenida durante el cultivo a 22° C utilizando diferentes fuentes de carbono, glucosa, fructosa y fructanos de agave, como se

aprecia en la gráfica, en los medios con glucosa y fructosa se obtuvieron mediciones por debajo de las 0.4 U/ml, lo que podría considerarse como actividad basal secretada por la cepa, para el caso del medio con fructanos de agave la actividad máxima se presentó alrededor de las 8h de cultivo con 1.3 U/ml.

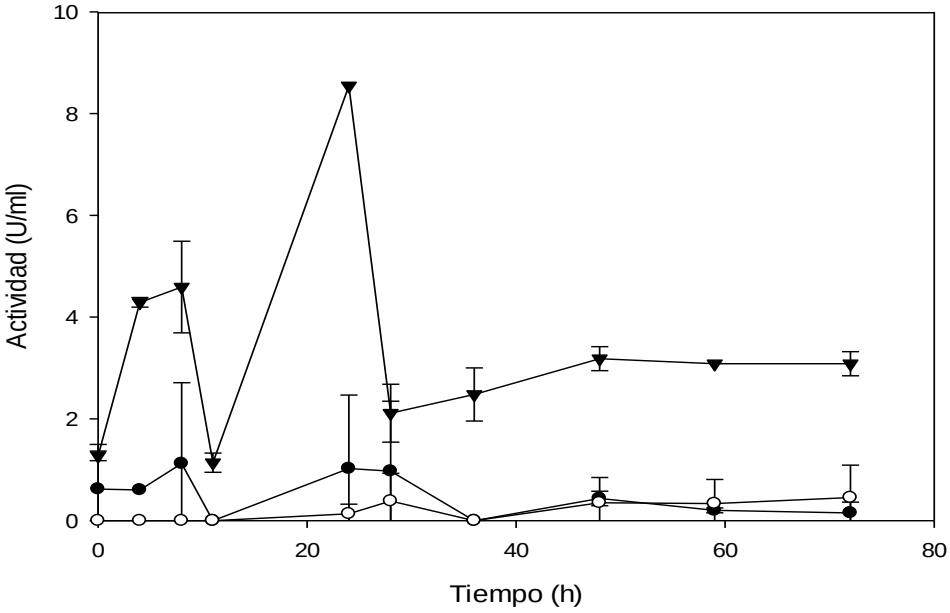

Figura 17. Cinéticas de actividad fructanasa en cultivos a 30° C utilizando diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).

Para el caso de los resultados obtenidos en los cultivos realizados a 37° C observamos que el mayor pico de actividad se presentó a las 60 h de cultivo con alrededor de 14 U/ml, Al-Dagal y Bazaraa [66] reportaron que la síntesis de inulinasa de *K. marxianus* está asociada al crecimiento, además de que la fase óptima para la producción de la enzima se alcanzó cerca de la fase estacionaria, estos resultados son muy similares a los obtenidos en esta condición, debido a que la actividad máxima se observó durante la fase estacionaria del cultivo.

En la figura 19 se observa la cinética de producción a 40° C, en donde apreciamos un comportamiento similar al obtenido en los experimentos anteriores, se obtuvo una actividad máxima de 8.3 U/ml. La producción de este tipo de enzimas se reporta a una temperatura de 30° C [67,68], algunos autores reportan que la actividad enzimática se reduce conforme aumenta la

temperatura, esto debido a que generalmente la temperatura afecta la actividad metabólica de las células [65].

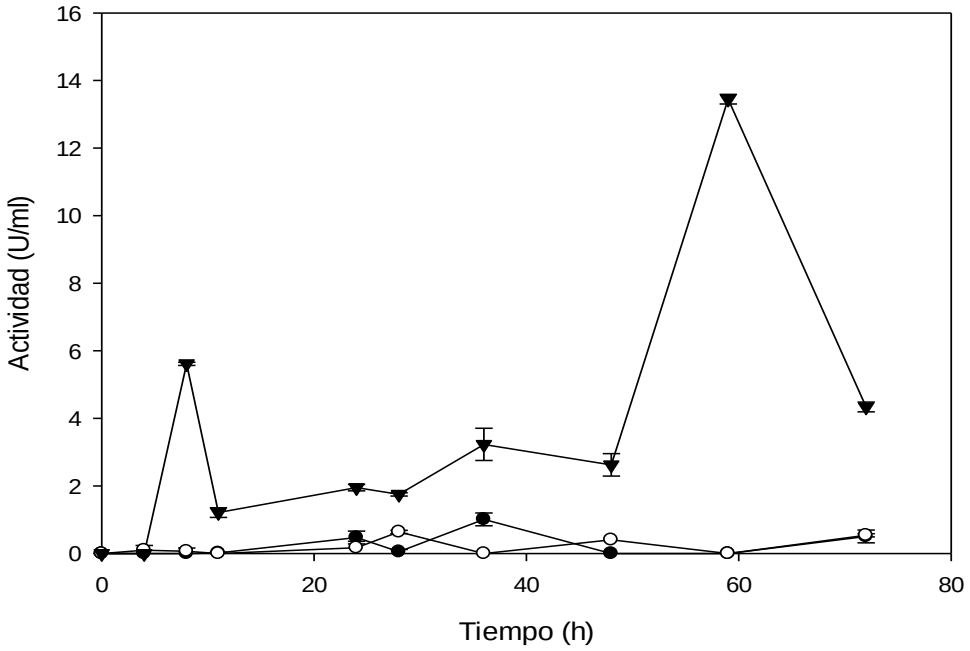

Figura 18. Cinéticas de actividad fructanasa en cultivos a 37° C utilizando diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).

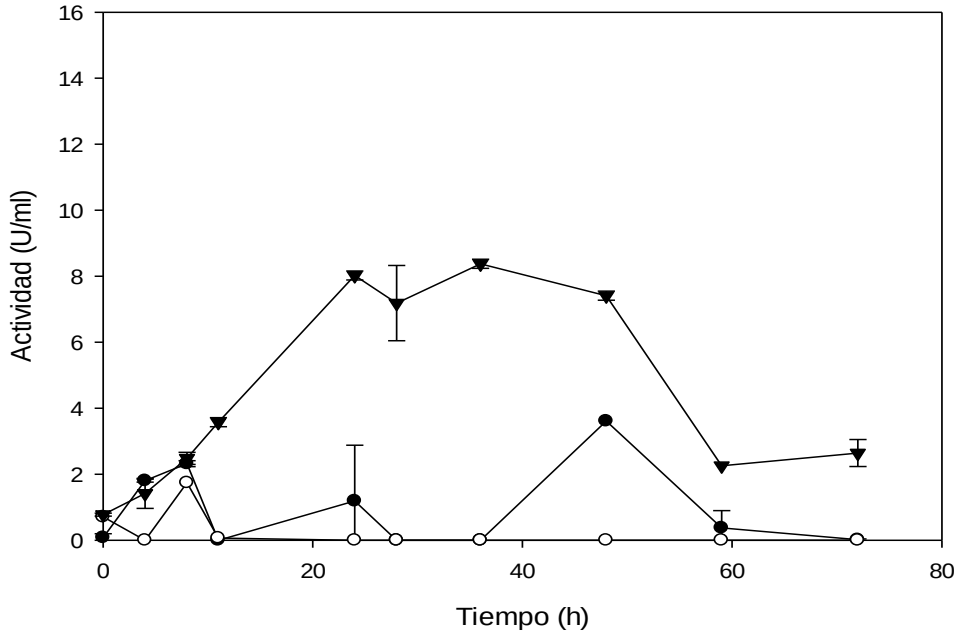

Figura 19. Cinéticas de actividad fructanasa en cultivos a 40° C utilizando diferentes fuentes de carbono. Glucosa (●), fructosa (○) y fructanos de agave (▼).

7.3 Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y la actividad fructanasa

Una vez que se seleccionó la fuente de carbono a utilizar (fructanos de agave), se procedió a evaluar dos medios de cultivo, el primero un medio mineral de composición simple y el otro un medio mineral más complejo, cuya composición está descrita en la metodología. Se planteó un diseño muy sencillo en el que los factores a evaluar fueron la influencia del medio de cultivo y la temperatura en el crecimiento y la actividad enzimática, tanto el pH, la agitación y concentración de fuente de carbono se mantuvieron constantes, 4.5, 250 rpm y 50 g/l respectivamente.

7.3.1 Crecimiento

En la figura 20 observamos el comportamiento de la cepa en el medio mineral en diferentes temperaturas de cultivo, se observa que a 20° C la fase lag tiene una mayor duración con respecto a 32.5 y 45° C, para estas dos últimas temperaturas la fase exponencial da inicio entre las 4-8 h de cultivo, y en 20° C da inicio después de las 12 h, esto puede deberse a que a esta temperatura el metabolismo de la levadura se ve afectado por la baja temperatura.

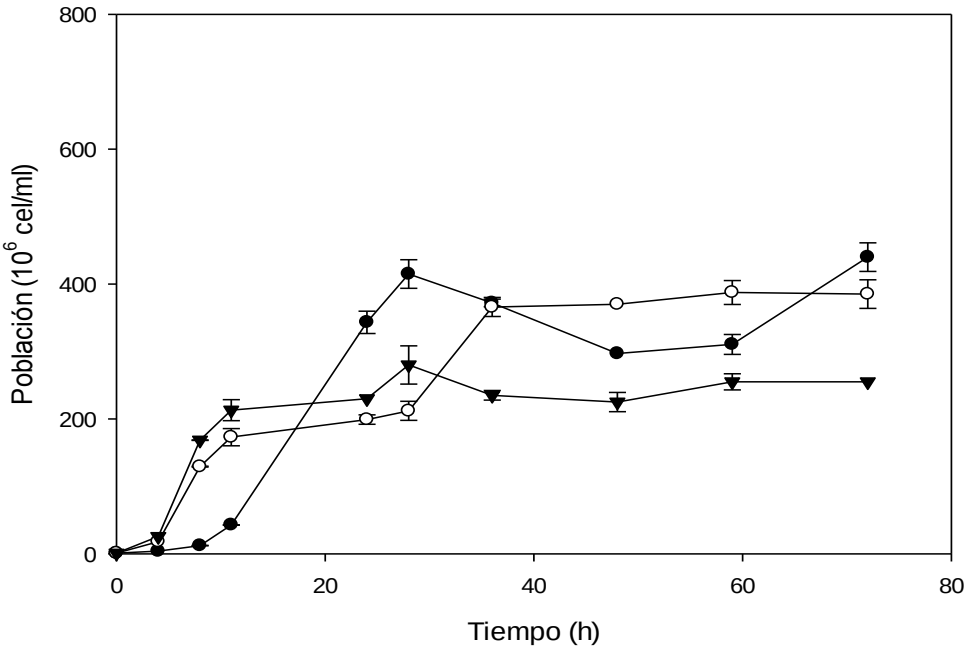

Figura 20. Cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas de cultivo en medio mineral sin vitaminas, 20° C (●), 32.5° C (○) y 45° (▼).

Se observa que el máximo crecimiento se presenta en 20° C a las 24 h del cultivo con aproximadamente 400x10^6 cel/ml y el mínimo de obtuvo a 45° C.

Como ya sabemos, la temperatura es un factor importante en el crecimiento de los microorganismos, en un estudio realizado por Urit y col. [69] se observó que la máxima velocidad de crecimiento se obtuvo a una temperatura de 40° C, esto utilizando lactosa como fuente de carbono, en nuestros experimentos a 45° C se observó un menor crecimiento con respecto a las otras dos temperaturas empleadas.

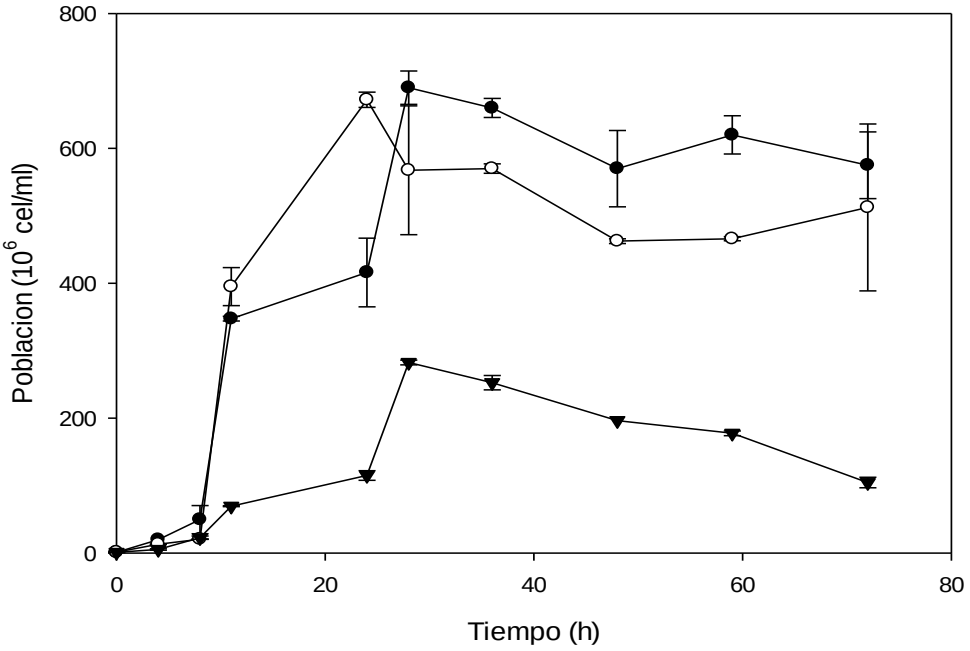

Figura 21. Cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas de cultivo en el medio químicamente definido, 20° C (●), 32.5° C (○) y 45° (▼).

En la figura 21 observamos los experimentos realizados con el medio químicamente definido, se observa que existe un mayor crecimiento con respecto al medio mineral, la población creció por arriba de lo 600x10^6 cel/ml en 20 y 32.5° C, esto se puede deber a la adición de elementos traza al medio de cultivo.

Los metales son muy importantes en varias áreas de la fisiología celular, por ejemplo, las células necesitan metales para el mantenimiento y la integridad estructural de los organelos, así como también para las interacciones célula-célula, para la división celular y el crecimiento. Metales,

tales como potasio y magnesio, se requieren generalmente para el crecimiento de las levaduras en el intervalo de concentración milimolar, y los metales traza tales como calcio, manganeso, zinc, hierro, y cobre se requieren en el rango micromolar [70].

Algunas paradas de fermentación parecen estar relacionadas con una falta de vitaminas en el mosto [71] aunque es poco común. La vitamina más estudiada es la tiamina cuyos rangos de concentración en el mosto están entre 150 y 750 g/l. En un estudio realizado por Parrondo y col. [75] observaron el efecto de la adición de algunas vitaminas a un medio de cultivo a base de suero de leche para la producción de etanol con *K. marxianus*, observaron que el ácido pantoténico aumento la producción de biomasa un 15%.

7.3.2 Actividad fructanasa

En la siguiente gráfica podemos observar las cinéticas de actividad fructanasa durante el cultivo con medio mineral a distintas temperaturas, se aprecia que la menor actividad se obtiene en 20° C, con una actividad máxima para esta condición menor a 1 U/ml, mientras que para los cultivos realizados en 32.5 y 45° la actividad máxima supera las 2 U/ml, además cabe resaltar que fue obtenida durante la fase estacionaria del cultivo similar a lo reportado por otros autores [65,66].

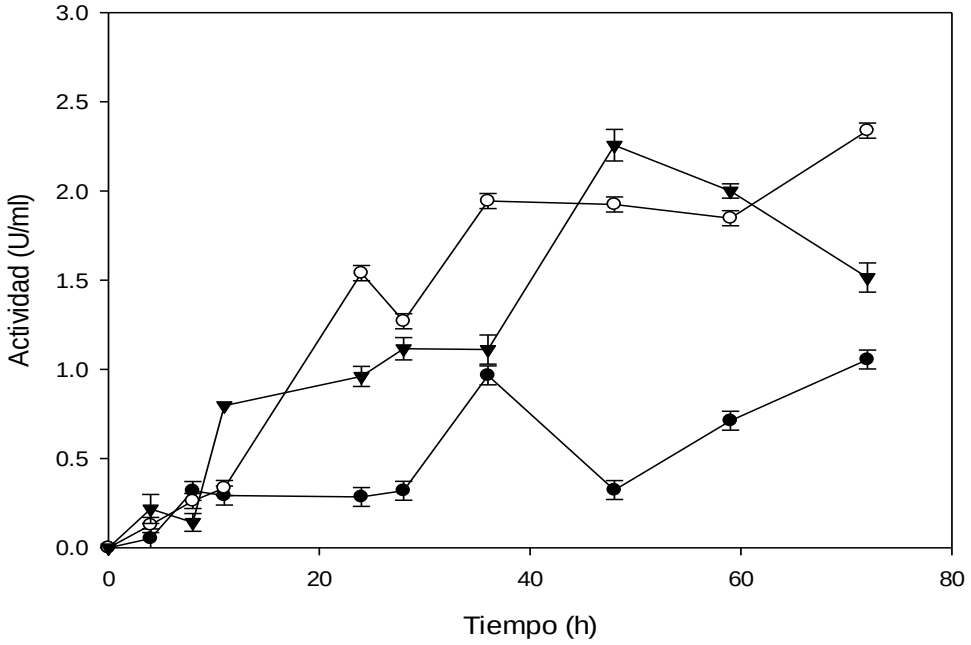

Figura 22. Cinéticas de la actividad fructanasa a diferentes temperaturas de cultivo en medio mineral sin vitaminas, 20° C (●), 32.5° C (○) y 45° (▼).

Tanto en el medio mineral como en el químicamente definido se observa que a 32.5° C la máxima actividad, varios autores han usado 30° C para la producción de inulinasas [67,68,72].

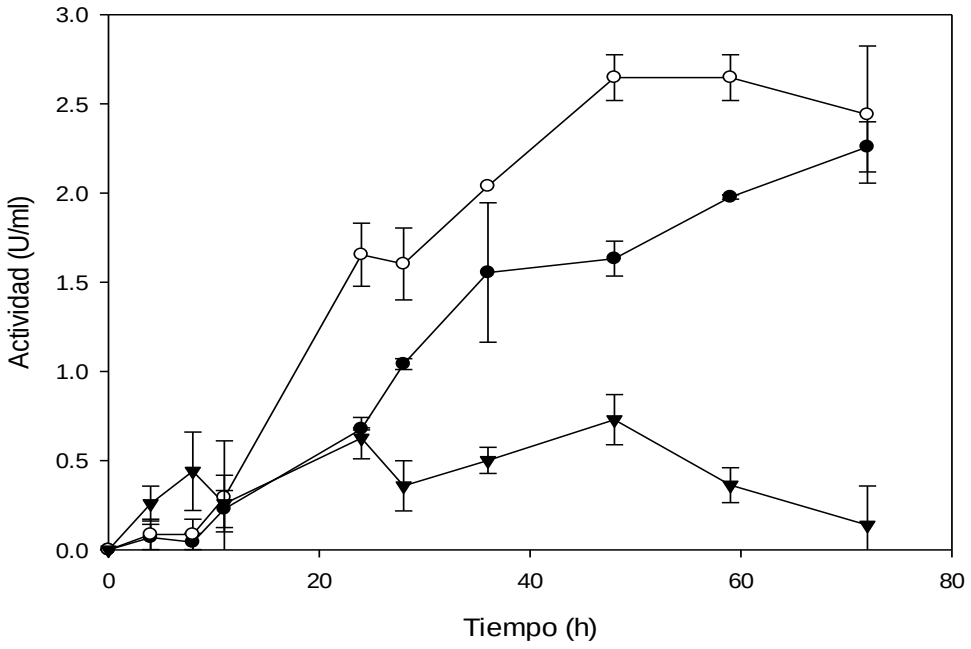

Figura 23. Cinéticas de actividad fructanasa a diferentes temperaturas de cultivo en el medio químicamente definido, 20° C (●), 32.5° C (○) y 45° (▼).

Se ha demostrado que las vitaminas extracelulares presentan un efecto estimulante sobre el crecimiento y en general para los procesos fermentativos.

Para el caso de la producción de enzimas se han publicado diversos artículos sobre la influencia de la composición del medio de cultivo sobre el comportamiento de *K. marxianus* tanto en cultivos continuos como discontinuos [73,74], por ejemplo, en el caso de suero de leche como fuente de carbono se ha reportado que existe un mejor rendimiento en la fermentación cuando éste es adicionado con ácido nicotínico y Fe^{3+} que son dos de los componentes del medio químicamente definido. El ácido nicotínico está implicado en la biosíntesis de cofactores de la fermentación, y en la biosíntesis del NAD.

7.4 Cultivo en biorreactor (batch)

Una vez que se determinó el medio de cultivo y la fuente de carbono con los experimentos anteriores, se realizó un cultivo en biorreactor, durante este cultivo se implementaron diversas técnicas para la conocer la fisiología de la cepa durante el cultivo, así como también se monitoreo el crecimiento y la actividad fructanasa.

Las condiciones del cultivo fueron 50 g/l de fructanos de agave, pH 4.5, 700 rpm, 30º C y un vvm de aireación. Se inoculó a una concentración de $1x10^6$ cel/ml.

7.4.1 Cinética de crecimiento

En la siguiente figura podemos observar la cinética de crecimiento de la cepa durante un cultivo en batch, obtenida con diferentes técnicas de cuantificación. El cultivo tuvo una duración de 48 h, a 30° C utilizando fructanos de agave como fuente de carbono, se observa que la fase exponencial comenzó a las 8 h.

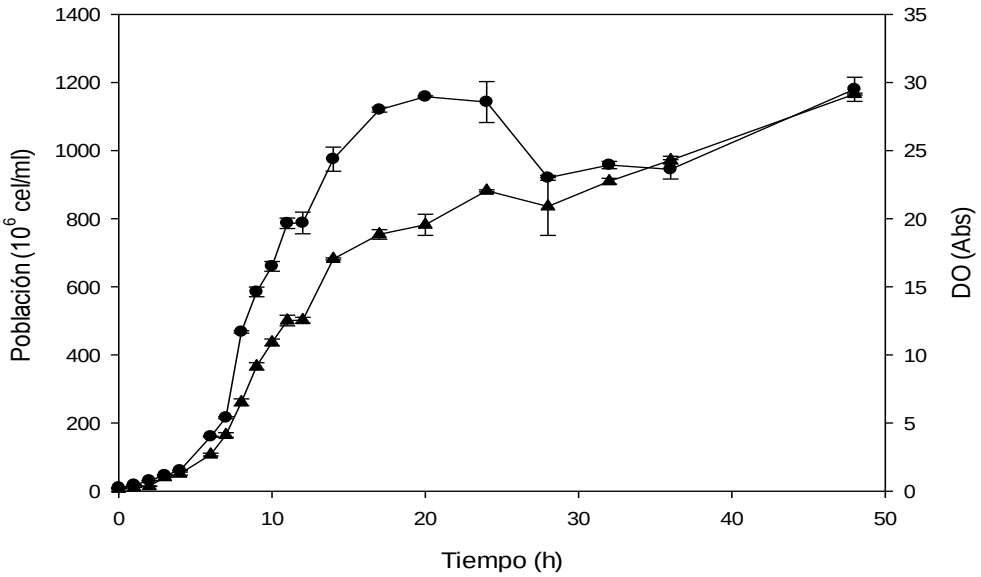

Figura 24. Cinética de crecimiento durante un cultivo en batch a 30º C. Conteo en cámara de Neubauer (●) y densidad óptica (▲).

7.4.2 Consumo de sustrato

En la figura 25 observamos el consumo del sustrato durante el cultivo que se inició con una concentración de 50 g/l de fructanos de agave. Alrededor de las 24h la cepa ya había consumido la totalidad de este.

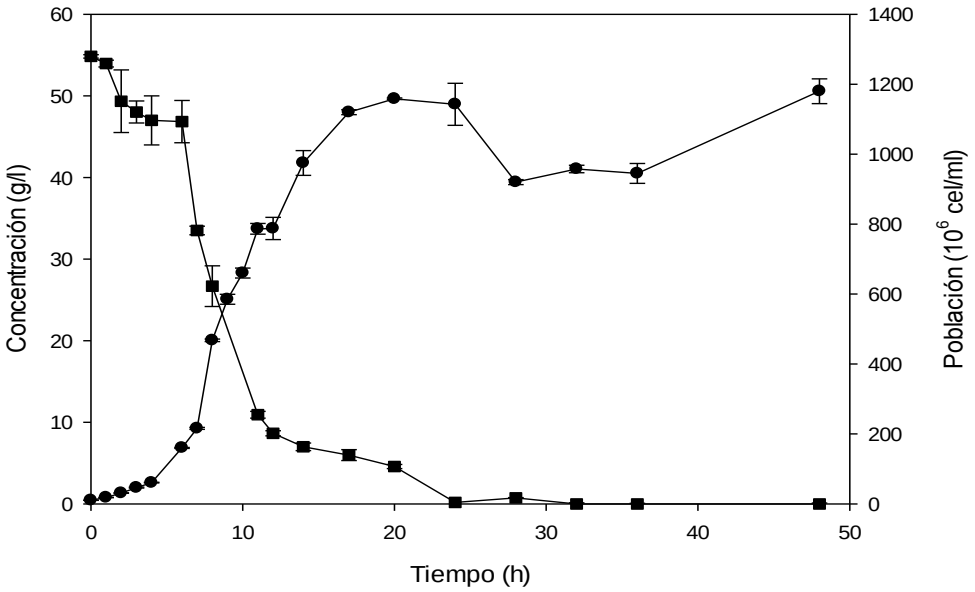

Figura 25. Consumo de sustrato durante el cultivo en biorreactor. Fructanos de agave (■), Población (●).

7.4.3 Actividad enzimática

En la figura 26 observamos la cinética de actividad enzimática durante el cultivo, así como también los azúcares reductores presentes en el medio. Se observa que hay aproximadamente un 12% de azúcares reductores al inicio de la fermentación, los cuales son consumidos rápidamente por la cepa en las primeras 8 h de cultivo. Una vez que se terminaron los azucares reductores se observa el inicio de la secreción de la enzima, esto se debe a que los azucares reductores resultan ser un sustrato muy fácil de asimilar por las levaduras, ya que no necesitan una enzima para que los transporte al interior de ella, es por ello que la cepa prefiere consumir los azúcares reductores primero.

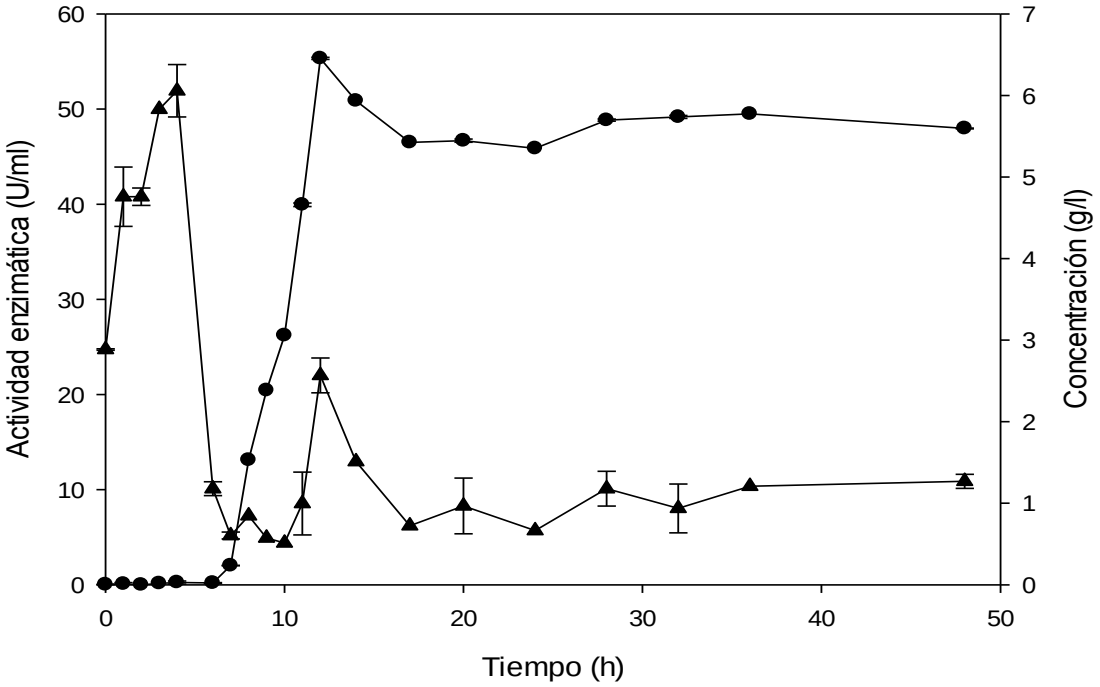

Figura 26. Cinética de actividad fructanasa en el cultivo en biorreactor. Actividad enzimática (●), azúcares reductores (▲).

El máximo de actividad se presenta a las 12 h con 55 U/ml y se observa que también hay un aumento de los azucares reductores, esto debido a la hidrólisis de los fructanos por la enzima secretada al medio. En un estudio realizado por Singh y col. [65] observaron una producción de 55 U/ml de actividad inulinasa a las 60 h de incubación, un mayor tiempo al obtenido en nuestros resultados, también observaron un incremento de 10 U/ml de sus experimentos en matraz con respecto al biorreactor, en nuestro caso se observó un incremento considerable de más de 40 U/ml, además, de que se redujo el tiempo de producción con respecto a los resultados obtenidos en matraz, esto puede deberse a que en matraz el control de pH no se puede llevar a cabo y en el biorrector el control de este parámetro es mucho más sencillo.

Como se sabe el pH es uno de los principales factores que afecta la producción de las enzimas, esto es debido a que el pH influye sobre la ionización de los grupos funcionales de los aminoácidos que conforman a la proteína. Mojdeh y col. [76] estudiaron la influencia de diversos parámetros sobre la producción de inulinasas con *A. niger*, uno de ellos fue el efecto del pH inicial en el medio de cultivo en la producción de la enzima, observando que éste

representa un gran efecto sobre su producción, demostrando que pH por debajo de 4 causan una disminución en la producción de la enzima.

7.4.4 Viabilidad

Uno de los aspectos más importantes para la evaluación de la fisiología de un microrganismo sin duda alguna es que tan viable es durante un cultivo. Para la evaluación de la viabilidad durante el cultivo en batch se utilizaron dos técnicas.

Durante un cultivo la población celular va cambiando, de las células totales existen diferentes subpoblaciones, por ejemplo de las células viables puede haber algunas que se encuentren metabólicamente activas y puedan reproducirse o ser cultivadas y otras en las que su membrana se encuentre integra, pero no sean capaces de reproducirse, lo cual es de gran importancia debido a que esto hace referencia al estado fisiológico en que se encuentra la célula.

7.4.4.1 Actividad metabólica

Se evaluó la viabilidad de *Kluyveromyces marxianus* utilizando un fluoróforo denominado FUN1, el cual diferencia células metabólicamente activas y células que no lo están, y que al parecer funciona bien con todos los géneros y especies de levaduras [24].

El FUN1 libre no fluoresce en solución acuosa, este fluoróforo tiñe los ácidos nucleicos que producen una fluorescencia difusa en solo verde y amarillo-verde en las células que tienen la membrana dañada. Las células que presentan poca o ninguna actividad metabólica, pero con la membrana intacta también presentan una fluorescencia citoplasmática en verde, en cambio las levaduras que se encuentran metabólicamente activas presentan cuerpos cilíndricos intravasculares de color rojo-anaranjado cuando es excitada a 470 a 590 nm [77].

En la figura 27 observamos un fotografía obtenida con microscopia de fluorescencia a las 8 h del cultivo, se aprecia que existe alrededor del 50% de células que presentan actividad metabólica.

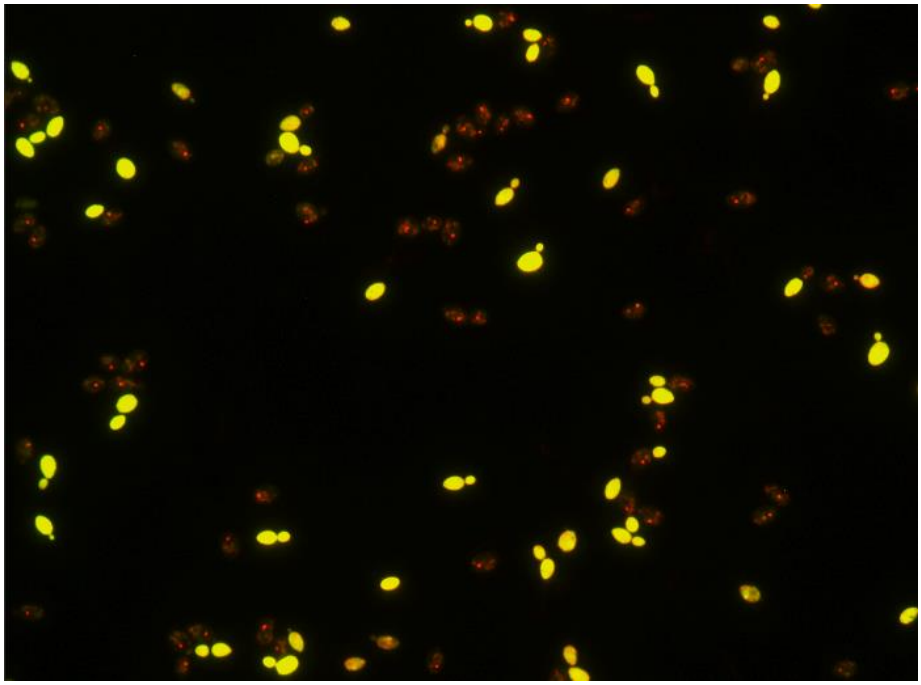

Figura 27. Fotografía de la cepa a las 8 h de cultivo utilizando FUN-1®

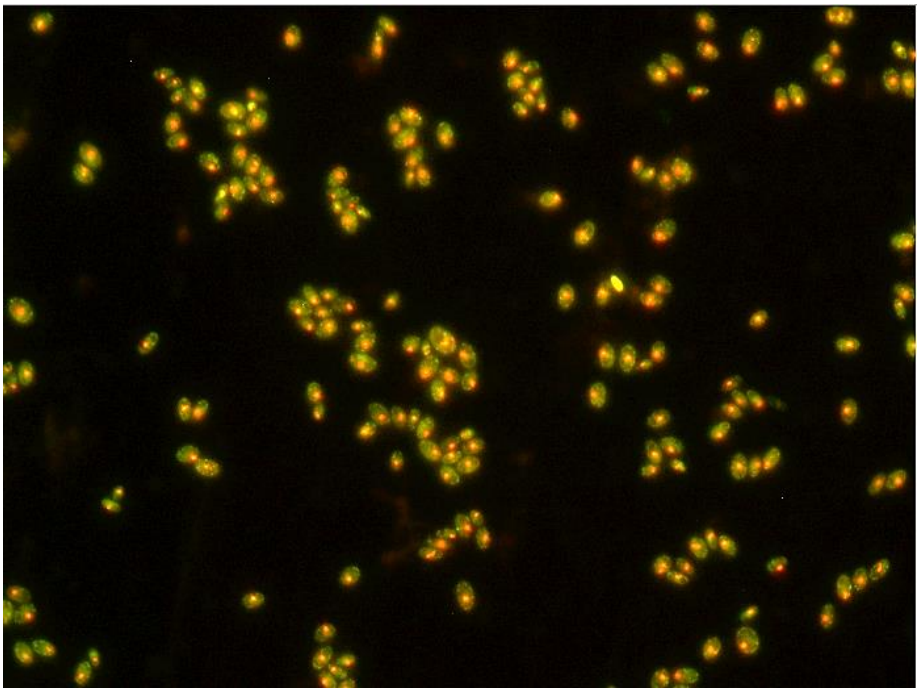

Figura 28. Fotografía de la cepa a las 24 h de cultivo utilizando FUN-1®.

El transporte del FUN1 desde el citosol a la vacuola no se produce en células no viables y los cuerpos intravacuolares por lo tanto, no son vistos en ellas. La formación de estos cuerpos requiere tanto de la integridad de la membrana plasmática como de la capacidad metabólica que presente la célula [24,78].

En la figura 28 observamos un fotografía obtenida a las 24 h del cultivo, como se aprecia en ella el 100% de las células presentaron actividad metabólica.

Millard y col.[24] utilizaron el FUN1® para monitorear la intensidad de la fluorescencia del color rojo en una fermentación por lote conforme avanzaba la fermentación, ellos encontraron que al finalizarla la emisión del color rojo fue más pequeña en comparación con la emisión de la fluorescencia verde. Contario a lo ocurrido en este experimento, en donde conforme van avanzando las horas de fermentación la intensidad de la fluorescencia rojo se hace más fuerte, así al finalizar la fermentación tenemos un porcentaje superior al 98% de células metabólicamente activas.

Una explicación a que el cultivo haya presentado una viabilidad superior al 95% al finalizar la fermentación a pesar de que no había azúcar residual en ese momento, como se observa a la figura 25; este fenómeno pudo ser causado por un crecimiento diauxico, la cepa pudo comenzar a consumir productos secundarios como el etanol, el cual puede ser empleado como fuente de carbono y energía, si se restablece la capacidad respiratoria de la levadura, en este caso el etanol es transformado a acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa y luego a acetato por la acetaldehÌdo deshidrogenas, para que finalmente la acetil-CoA sintasa lo convierta en acetilCoA [79]. Es por ello que aun en estas condiciones se sigue detectando actividad metabólica.

7.4.4.2 Permitividad

Se utilizó una sonda de espectroscopia dieléctrica para el monitoreo de la viabilidad de la cepa durante el cultivo, el uso de esta técnica ya ha sido utilizada para el monitoreo de otras levaduras [80]. En la figura 29 observamos la cinética obtenida por la sonda de permitividad, contrastándola con la cinética de crecimiento de la cepa, observamos que la cinética de permitividad da inicio con valores negativos, esto puede deberse que al principio del cultivo existe una baja concentración celular. Conforme avanza la fermentación los valores de permitividad van en aumento hasta llegar a 4 pF/cm, el rápido incremento de la permitividad

coincide con la fase exponencial del cultivo, lo cual es de esperarse, ya que en la fase exponencial es cuando las levaduras se encuentran con un porcentaje de viabilidad elevado.

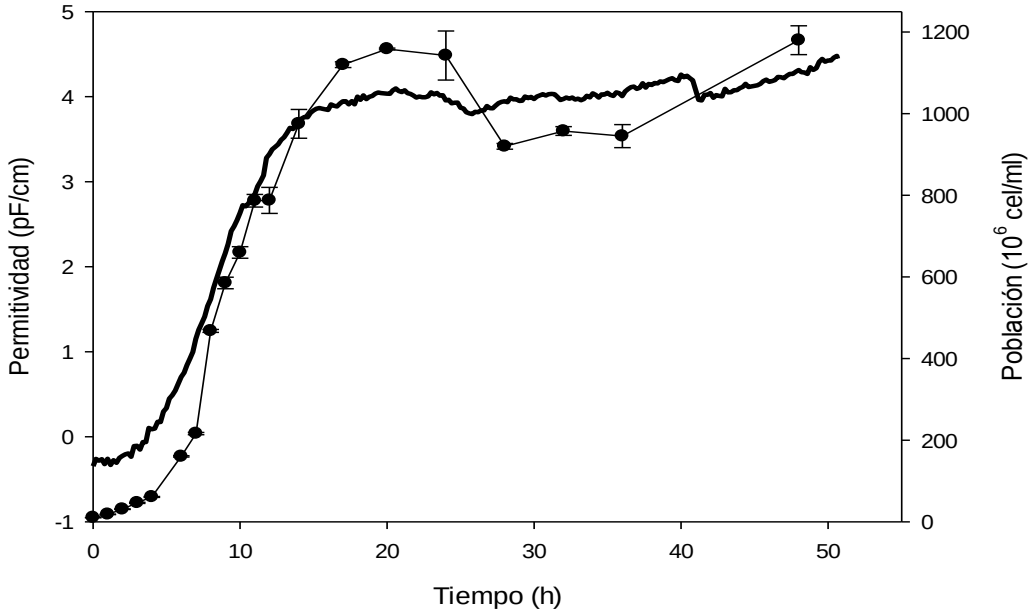

Figura 29. Cinética de viabilidad cuantificada con la sonda de espectroscopia dieléctrica. Permitividad (▬), población (●).

También se puede observar en la figura 29 que los datos obtenidos con la sonda de capacitancia concuerdan con los obtenidos en microscopia de fluorescencia, además de que se aprecia que el correlaciona con el crecimiento de la cepa durante el cultivo.

Los resultados obtenidos con microscopia de fluorescencia concuerdan perfectamente con los datos arrogados por la sonda de capacitancia, la cual como ya se mencionó solo cuantifica las células viables del cultivo.

7.4.5 Diámetro celular

El tamaño de la cepa fue monitoreada durante el cultivo con el sistema de conteo y análisis de células (CASY®). En la figura 30 observamos la distribución del diámetro de la levadura durante la fermentación. Se observa que el diámetro no fluctuó durante el cultivo, permaneciendo en 4.5 µm desde el inicio de la fermentación, lo cual nos hace suponer que la cepa no estuvo estresada durante el cultivo.

Así mismo es evidente que el diámetro de la cepa no se ve afectado durante la producción de la enzima, además de que como se observa en las fotografías obtenidas por microscopia de fluorescencia no se parecía ningún cambio en la morfología de la cepa. Hasta ahora no se han realizado estudios enfocados a los cambios morfológicos que sufre *K. marxianus* en la producción de fructanasas.

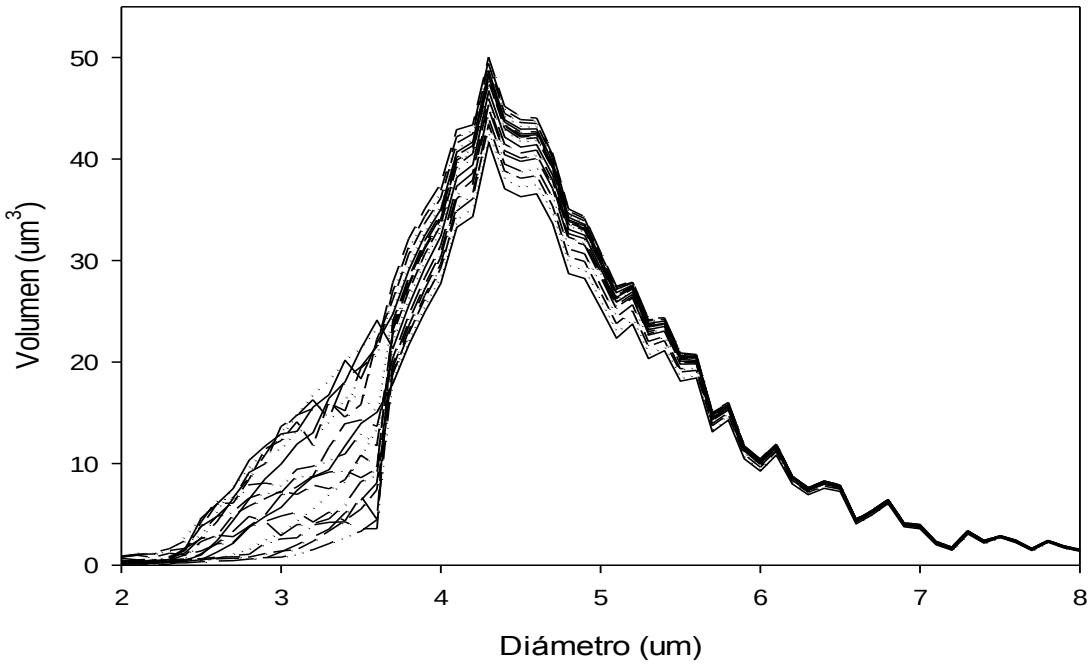

Figura 30. Perfil del diámetro celular durante el cultivo en batch

7.5 Efecto de la temperatura, calcio y magnesio

Para observar el efecto tanto de la temperatura como de diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de cultivo se realizó un diseño experimental multifactorial, el cual se hizo por duplicado, las diferentes concentraciones de minerales se escogieron consultando algunas metodologías empleadas para el cultivo de *K. marxianus* en lo referente a la producción de fructanasas, comparándolas con las concentraciones empleadas en el medio de cultivo utilizado en los experimentos anteriores.

7.5.1 Crecimiento

En las siguientes figuras (31-34) se muestra el comportamiento de la cepa en las distintas temperaturas empleadas en este diseño experimenta a manera de superficie de respuesta, observando el efecto del calcio y magnesio sobre el crecimiento de la cepa. En las superficies de respuesta se graficaron los datos de población (conteo en cámara de Neubauer) a las 36 h de haber iniciado la fermentación, en todas las condiciones los cultivos se encontraban en fase estacionaria.

En la figura 31 se presentan los datos de crecimiento a 20º C, se observa que a esta temperatura la mayor población se presentó en las concentraciones centrales del diseño experimental, 250 m/g de magnesio y 750 mg/l de calcio los experimentos realizados a esta temperatura presentaron una fase de latencia prolongada, alrededor de las 20 h dio inicio la fase exponencial, lo cual repercutió en la velocidad de crecimiento (datos presentados más adelante). Aunque hay que resaltar que a esta temperatura de cultivo hubo un mayor crecimiento con respecto a las demás temperaturas evaluadas.

Como ya sabemos la temperatura es uno de los factores que afectan principalmente las reacciones bioquímicas de las levaduras, diversos autores han sugerido que especies *no-Saccharomyces* presentan una mejor oportunidad para crecer a bajas temperaturas, ya que pueden aumentar su tolerancia al etanol [15,81,82]. Se sabe que la temperatura también afecta el metabolismo de la levadura como resultado la formación de metabolitos secundarios, por ejemplo a temperaturas por debajo de 20º C provocan la detención de la división celular, así como la síntesis de proteínas.

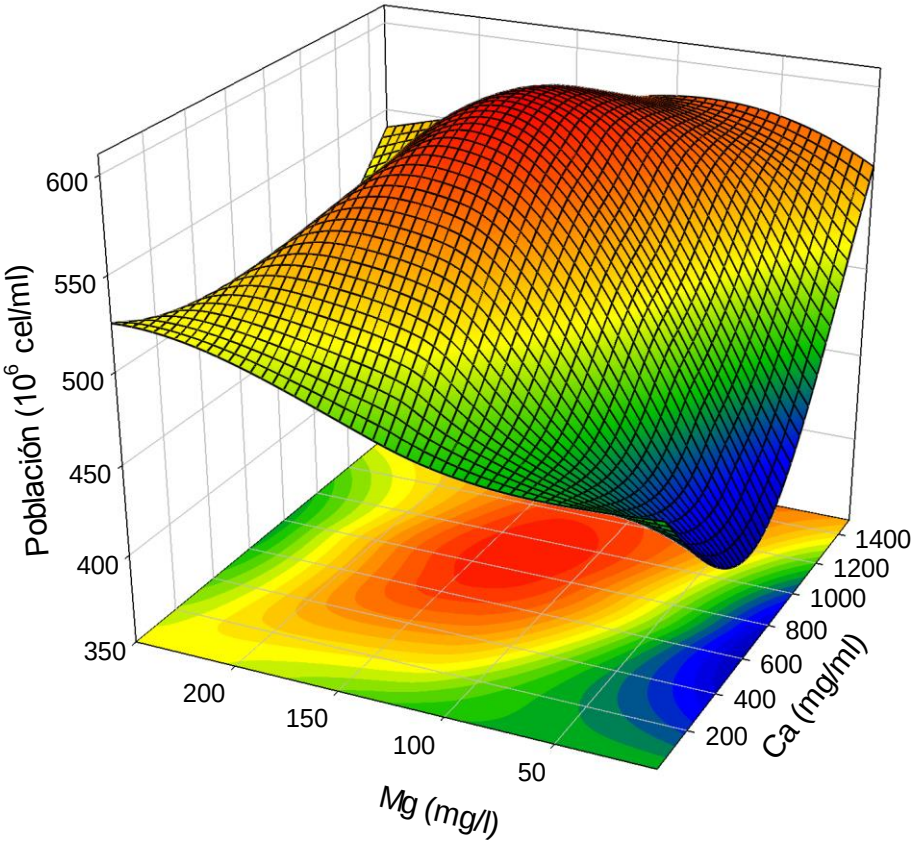

Figura 31. Crecimiento en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de inducción a 20º C.

Así como las levaduras son capaces de adaptarse a crecer a temperaturas elevadas, también lo hacen a bajas temperaturas. Existen dos grupos de respuesta transcripcionales, una temprana llamada adaptación específica el frio y otra tardía que coincide en gran medida con la respuesta general al estrés generada por el medio ambiente [83]. El largo plazo de adaptación al frio aumenta la supervivencia, esto debido a la acumulación de trehalosa y Hsp104, Hsp42, HSP12 y SSA4, los ARNm de estas proteínas suelen estabilizarse a bajas temperaturas [84], lo anterior podría explicar el porqué de la fase de latencia tan prolongada.

En la figura 32 observamos la superficie de respuesta obtenida a 28º C, se aprecia un comportamiento similar al presentado en 20º C, pero con la diferencia de que a esta temperatura

el máximo crecimiento fue de aproximadamente $400x10^6$ cel/ml y a 20º C se alcanzaron poblaciones por arriba de $550x10^6$ cel/ml en las mejores condiciones.

La fase exponencial en las fermentaciones realizadas a 28º C se presentó alrededor de las 6 h de dar inicio a la fermentación y a las 14 h ya se había finalizado la fase exponencial, este comportamiento fue similar en todos los experimentos realizados a estas condiciones de temperatura.

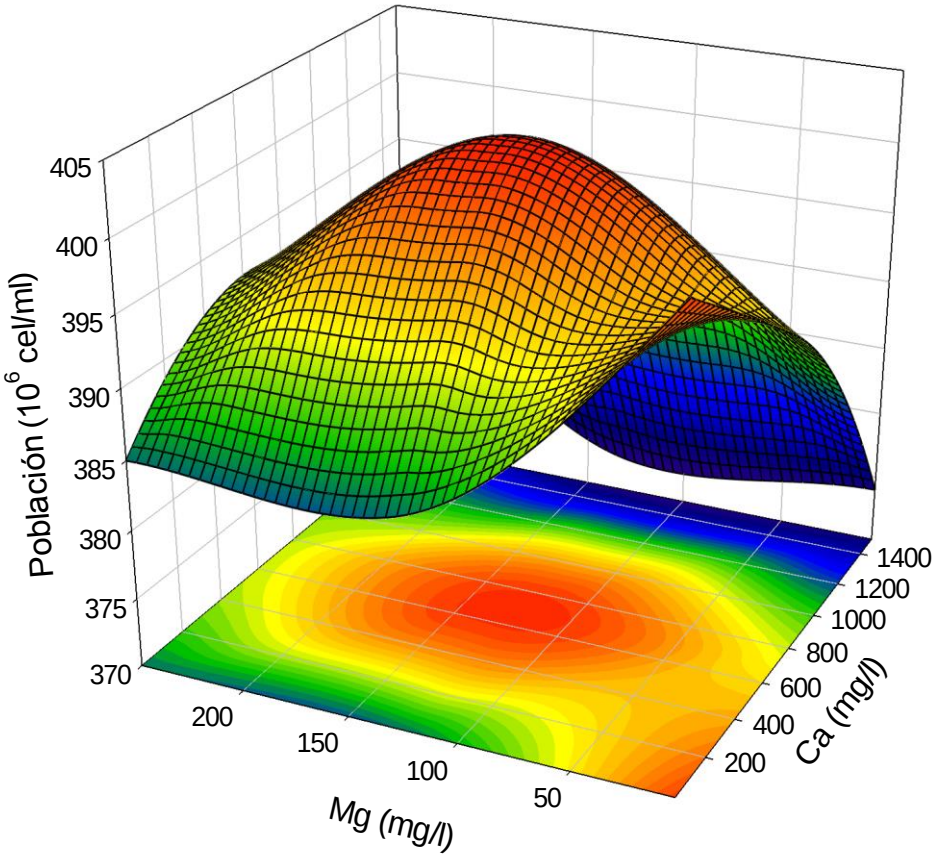

Figura 32. Crecimiento en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de inducción a 28º C.

Otro de los aspectos importantes en este experimento fueron las distintas concentraciones de calcio y magnesio en el medio de cultivo, estos elementos traza que están involucrados en la actividad metabólica de las levaduras, los requerimientos específicos de estos iones pueden cambiar el rendimiento de una cepa durante la fermentación, como es el caso de la producción de biomasa [85]. Es por ello que observamos distintos comportamientos en cada una de las

condiciones de cultivo. Como en el caso de la los experimentos realizados a 37º C (figura 33) observamos un comportamiento totalmente distinto a los presentados en las gráficas anteriores, el mayor crecimiento se presenta en las concentraciones elevadas de magnesio (250 mg/l) en combinación con el nivel medio ce calcio (750 mg/l), resaltando que a esta temperatura se obtuvieron crecimientos más bajos que en las temperaturas por dejado de 30º C.

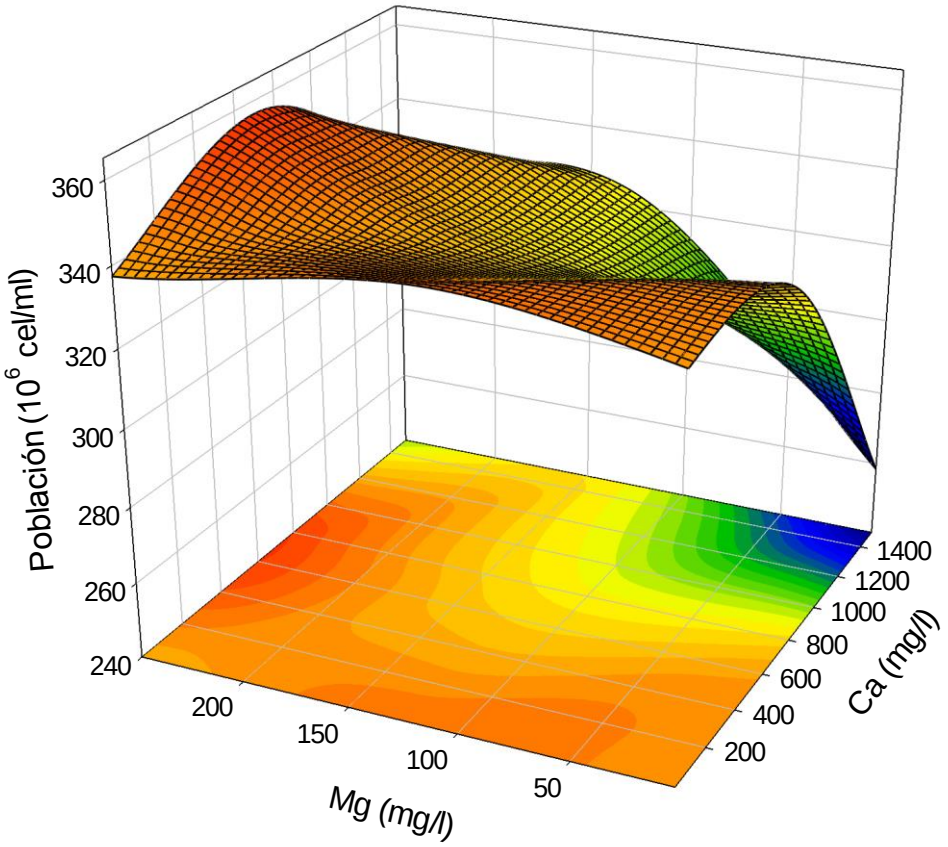

Figura 33. Crecimiento en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de inducción a 37º C.

Las levaduras son organismos que no pueden regular su temperatura interna y el estrés térmico provoca daño celular mediante la interrupción de la unión de hidrógeno, la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos, conduciendo a una rápida perdida de viabilidad celular [4]. Las levaduras termotolerantes soportan temperaturas por arriba de lo 40º C, como es el caso de *K. marxianus* la cual ha sido reportada como termotolerante por diversos autores [1,36,37,86].

En la figura 34 se muetra la superficie de respuesta obtenida de los experimentos realizados a 45º C, durante los cultivos a esta temperatura se observó una fase de latencia de aproximadamente 4 h y se alcanzó la fase estacionaria a las 12 h aproximadamente, este comportamiento fue similar en las otras condiciones probadas a esta temperatura, si bien la cepa esta reportada como termotolerante, cabe destacar que en esta temperatura se presentaron las poblaciones más pequeñas, con alrededor de $100x10^6$ cel/ml, excepto en los experimentos realizados con concentraciones elevadas de magnesio (500 mg/l) y medias de calcio (750 mg/l).

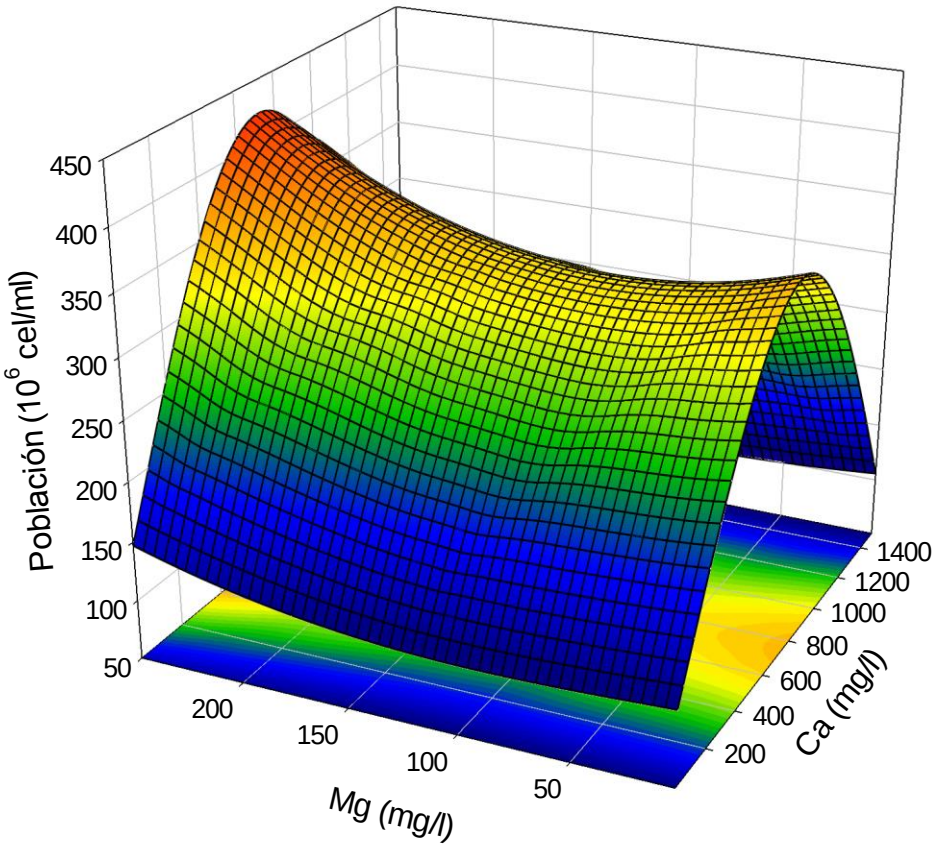

Figura 34. Crecimiento en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio y magnesio en el medio de inducción a 45º C.

En ninguno de los experimentos anteriores se presentó como mejor condición concentraciones bajas de magnesio (5 mg/l), esto debido a que el magnesio es de vital importancia para el crecimiento de las levaduras y otras funciones metabólicas de importancia fisiológica [70].

A elevadas temperaturas el magnesio muestra un efecto protector sobre el crecimiento de la cepa, como lo observado por Birch y Walker [87] quienes demostraron el efecto protector del magnesio en elevadas temperaturas, debido a que en altas concentraciones de magnesio se expresaron la proteínas de shock térmico. Se sabe que el dinamismo del magnesio en la pared celular está influenciado por la temperatura, el pH y las células viables del cultivo. Se ha recomendado entre temperaturas de 25 a 35º C para una mejor bioabsorción de magnesio [88,89].

Además, también se ha reportado la relación del calcio y el magnesio en la restauración del crecimiento celular [90], además de proporcionar una mayor estabilidad a la membrana plasmática, planteando la hipótesis de que ambos metales estabilizan y reducen la fluctuación en la membrana [91]. Otros autores han reportado [14,92] que el calcio es el metal dominante en esta relación antagónica, debido a la elevada afinidad por los sitios de unión de los ligandos como el ATP y ácidos nucleicos. Es evidente que la competencia de ambos minerales depende de los niveles de concentración que se encuentren en el medio de cultivo.

De acuerdo a los resultados observados en las gráficas anteriores podemos concluir que 750 mg/l resulta ser la mejor concentración de calcio para el crecimiento de esta cepa cuando se utilizan fructanos de agave como fuente de carbono. La mayoría de los estudios referentes al efecto del calcio y magnesio en las fermentaciones está enfocado a la producción de etanol [12,93].

Otro de los aspectos importantes a evaluar fue la velocidad máxima de crecimiento (µmax) y para ello los datos fueron analizados con el programa estadístico StatGraphics Centurion XVI.I, el diseño fue analizado con un nivel de confianza del 95% en donde la temperatura resultó ser el único factor significativo sobre la µmax, como lo muestra también el diagrama de Pareto estandarizado (figura 35).

En la figura 36 observamos el gráfico de medias de las µmax obtenidas en las diferentes temperaturas de cultivo empleadas, como podemos observar a 20º C se encuentra la µmax más baja y a 37º C se obtuvo la más alta, tanto a 28º C como a 45º C se presentan µmax similares (0.3 aproximadamente).

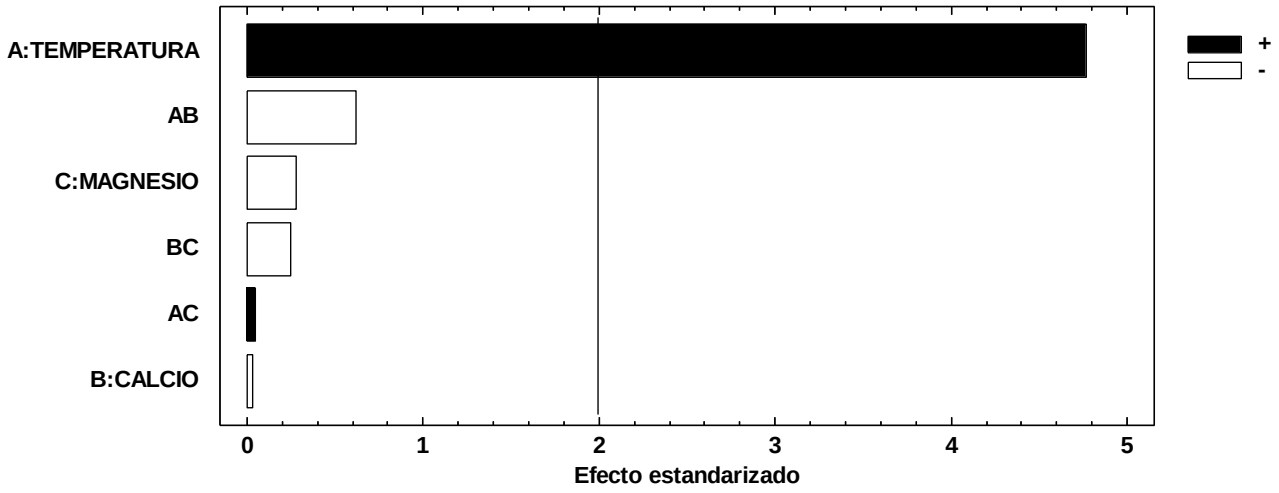

Figura 35. Diagrama de Pareto estandarizado para la velocidad máxima de crecimiento

La temperatura afecta directamente la velocidad y el tiempo de la fermentación, la duración de la fase de latencia y el retraso de la fase exponencial disminuye conforme aumenta la temperatura, sin embargo, temperaturas por arriba de los 30º C ponen en riesgo la viabilidad de las levaduras. Con respecto a las bajas temperaturas el principal problema es la fase de adaptación, especialmente cuando el inoculo proviene de temperaturas más elevadas, lo cual causa un choque térmico, frenando así el crecimiento.

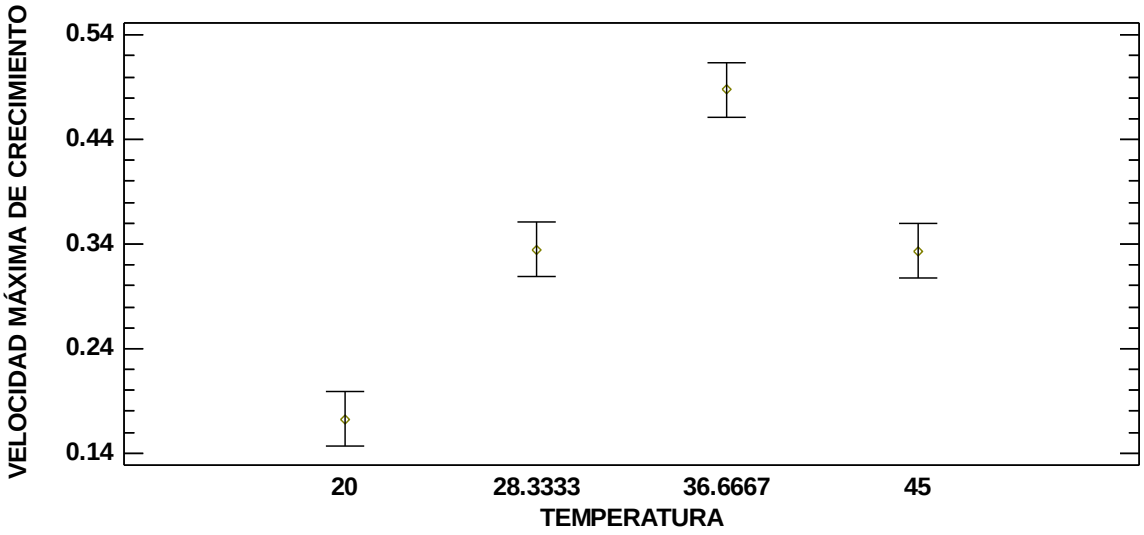

Figura 36. Gráfico de medias para la velocidad máxima de crecimiento en diferentes temperaturas

7.5.2 Consumo de la fuente de carbono

Para la evaluación del efecto de la temperatura, calcio y magnesio sobre el consumo de la fuente de carbono se llevó a cabo un análisis estadístico con un nivel de confianza del 95%. Como ya sabemos el azúcar residual en una fermentación varía de acuerdo a las condiciones del cultivo, así como por la composición del medio.

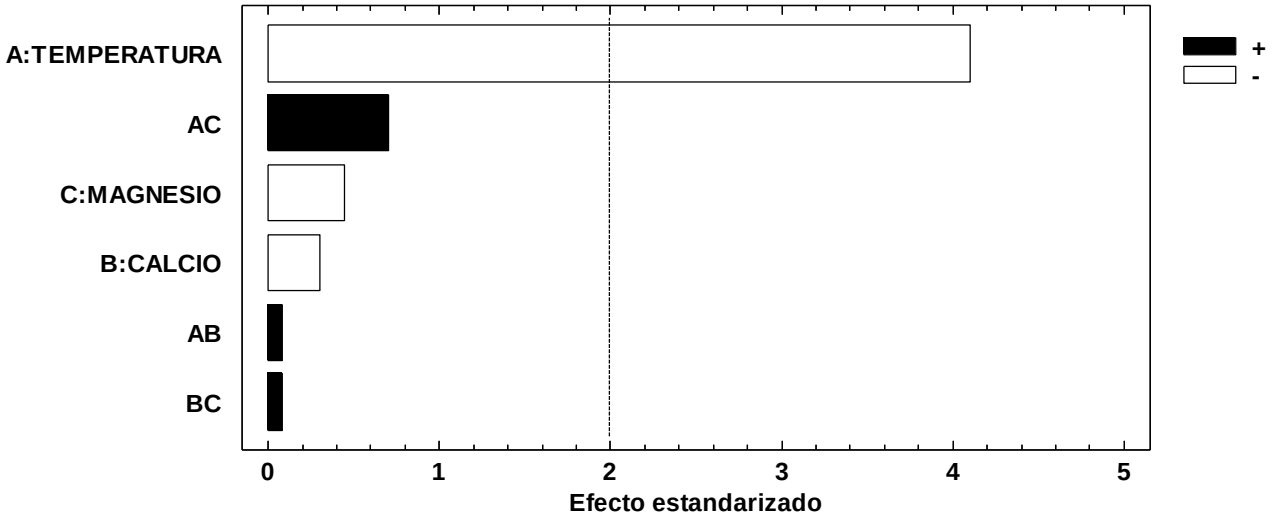

Figura 37. Diagrama de Pareto estandarizado para el consumo de sustrato

En la figura 37 observamos el diagrama de Pareto estandarizado del consumo de sustrato en las diferentes condiciones experimentales, se observa que solo la temperatura tiene influencia significativa sobre este paramento, esto puede ser debido a que la temperatura afecta el metabolismo de la levadura, resultando en la formación de metabolitos secundarios como el ácido acético y ácido succínico, los cuales pueden inhibir el consumo de la fuente de carbono [81].

En la figura 38 observamos el gráfico de medias para el consumo de sustrato, en donde se aprecia que a bajas temperaturas hay un 40% de azúcar residual, mientras que a temperaturas por arriba de los 35º C solo hay un 10% de azúcar residual.

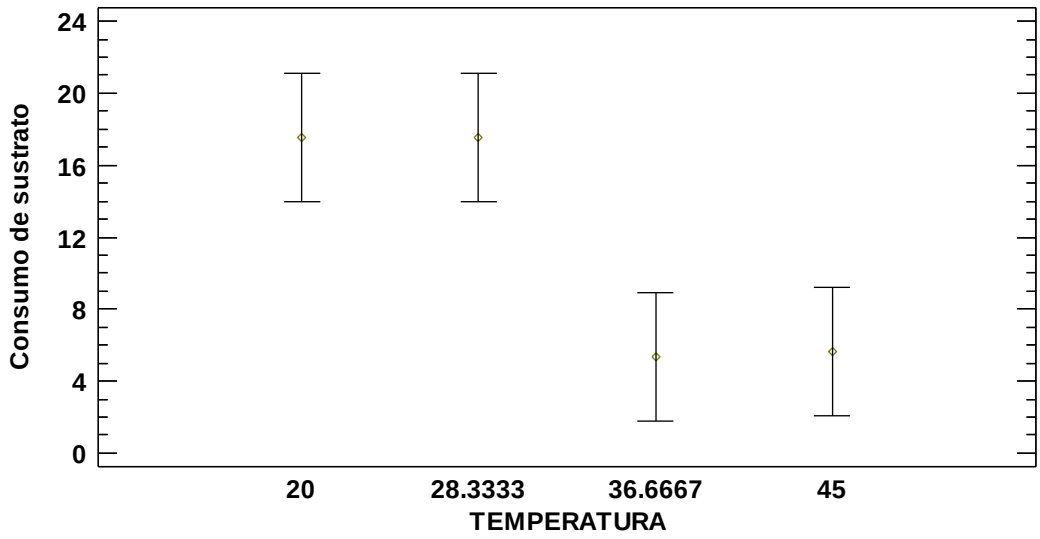

Figura 38. Graficó de medias para el consumo de sustrato

7.5.3 Actividad fructanasa

Uno de los aspectos más importantes en este trabajo fue el efecto de la temperatura y minerales sobre la actividad fructanasa, la cual refleja los diferentes estados fisiológicos en los que se pueda encontrar la levadura en las diversas condiciones de cultivo a las que fue sometida.

Tabla 10. Mejores condiciones del diseño experimental para la actividad fructanasa

Temperatura (º C)	Hora de cultivo	Condición	Actividad (U/ml)
20	20-24 h	AM	7.93 ±0.6
28	6-8 h	AA	2.5 ±0.14
37	6 h	AA, MA, BA	3.38 ±0.5
45	8 h	BA	5.23 ± 0.5

*Nota: A se refiere a la concentración superior probada en el diseño experimental, M la concentración intermedia y B a la concentración más baja. En primer orden está la clave para el calcio y posteriormente para el magnesio

Sin duda alguna uno de los factores que más reflejan un efecto sobre la fisiología de *K. marxianus* es la temperatura, como lo podemos observar en el diagrama de Pareto (Figura 39) el cual revela que solo la temperatura y la interacción de esta con el calcio y el magnesio resultaron ser significativos, con valores de P menores a 0.05.

Tanto en los resultados del crecimiento como los de µmax observamos que la temperatura tuvo un efecto significativo en esos parámetros, esta puede ser la razón por la cual la producción de la enzima es en diferentes momentos de la fermentación de acuerdo a cada una de las condiciones de cultivo empleadas.

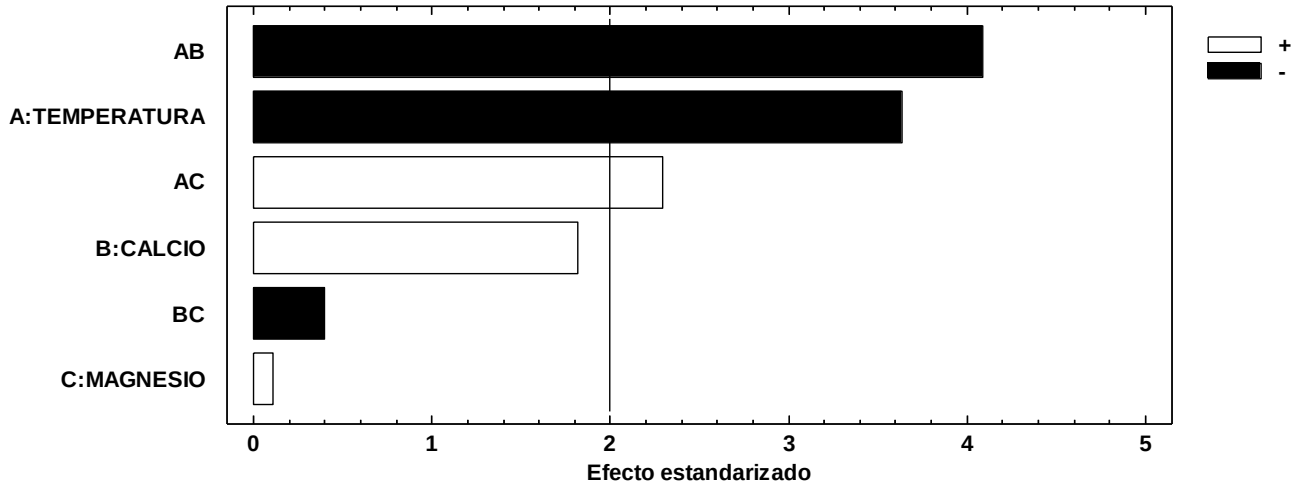

Figura 39. Diagrama de Pareto estandarizado de la actividad fructanasa

En la figura 40 observamos el gráfico de medias de la actividad fructanasa con respecto a la temperatura, la actividad enzimática no sobrepasó la 6 U/ml, variando en todos los casos las mejores condiciones de la producción de la enzima con respecto a las diferentes concentraciones de calcio y de magnesio, así como también el tiempo en que se produce durante el cultivo, como se muestra en la tabla 10.

Estos cambios en la hora de producción de la enzima pueden deberse a que a medida que aumenta la temperatura aumenta la tasa de respiración, ya que las partículas se mueven más rápido y con mayor energía, lo cual significa que también hay más choque entre partículas con suficiente energía para reaccionar. Sin embargo, temperaturas por encima de la óptima hacen que la estabilidad de la enzima disminuya.

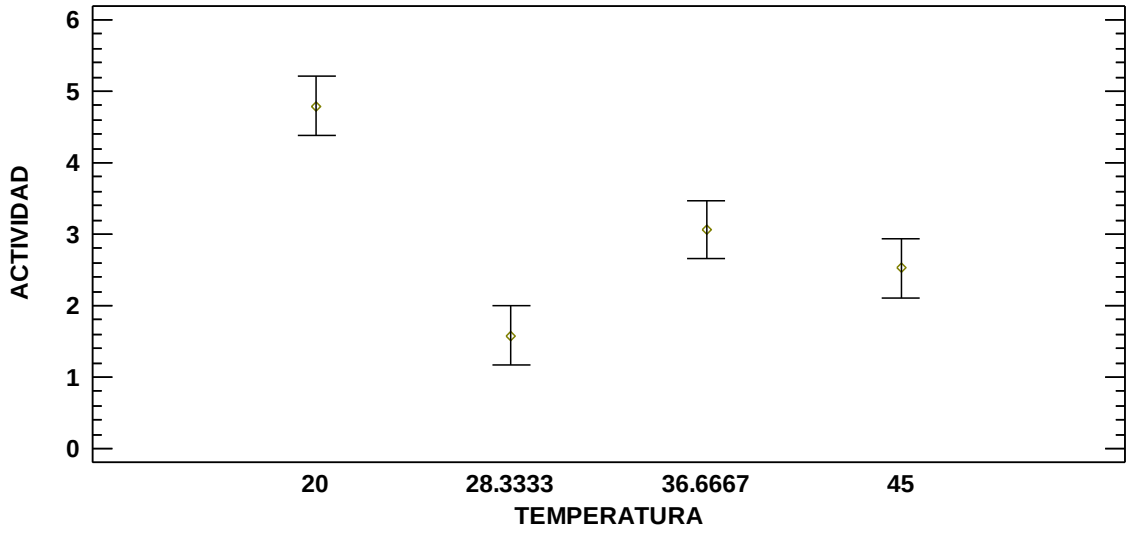

Figura 40. Gráfico de medias para la actividad fructanasa

7.5.4 Diámetro

Uno de los aspectos importantes que reflejan el estado fisiológico de los microorganismo es su tamaño, para evaluar el efecto de la temperatura así como le las diferentes concentraciones de calcio y magnesio sobre el diámetro de las levaduras se utilizó en CASY®.

El diámetro fue monitoreado durante la fermentación, pero solo se presentan los resultados del tamaño celular al finalizar la fermentación (36 h). El inóculo para todos los experimentos fue cultivado siempre en las misma condiciones (30º C, 250 rpm en YPD) esto con la finalidad de que no variará el tamaño de la cepa en cada uno de los diferentes inóculos empleados, así el diámetro promedio de la cepa al iniciar cada uno de los distintos experimentos fue de 4.5 µm, el cual fue cambiando a lo largo de la fermentación dependiendo de cada una de las condiciones de cultivo.

En la figura 41 se observa el diagrama de Pareto, en el cual se identifican los factores que tienen influencia sobre la variable de respuesta, tanto la temperatura como el calcio resultan tener efecto sobre el diámetro de la levadura, con valores de P de 0.003 y 0.007 respectivamente, además el análisis estadístico reveló que existe un 32% de variabilidad en el diámetro con respecto a los factores evaluados.

Además del diagrama de Pareto se realizaron gráficas para observar la tendencia del diámetro con respecto a las temperaturas evaluadas y concentraciones de calcio probadas.

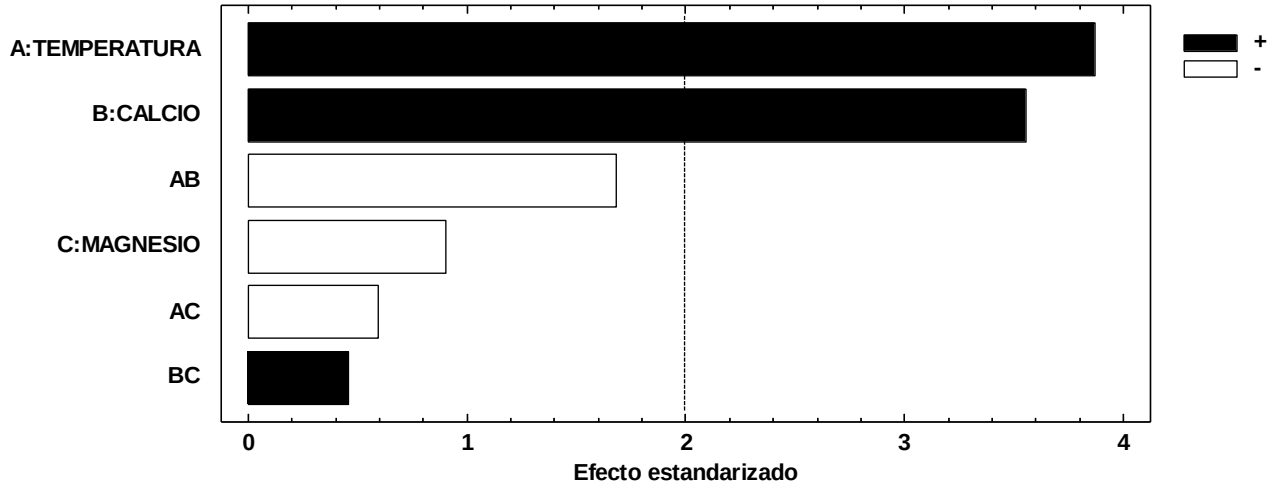

Figura 41. Diagrama de Pareto estandarizado para el diámetro de *K. marxianus*

En la figura 42 se observa el gráfico de distribución de medias con respecto a la temperatura, se aprecia claramente que en cada una de las diferentes condiciones el diámetro de la cepa fue variando. Lo anterior puede deberse a la velocidad con que los nutrientes entran al interior de la célula y salen las sustancias de desecho al exterior de la misma, lo que constituye un factor clave ya que influye en los ritmos metabólicos celulares y la velocidad de crecimiento, es, en general, inversamente proporcional al tamaño celular, esto se debe a que la velocidades de transporte son, en parte dependientes de la superficie de la membrana disponible respecto al volumen.

Con relación a su tamaño las células pequeñas tienen más superficie relativa que las de mayor tamaño, por lo cual una célula con radio pequeño posee una mayor relación superficie-volumen, pudiendo llevar a cabo un intercambio de nutrientes con el medio en condiciones más ventajosas [94]. Esto explicaría él porque a 37º C la velocidad máxima de crecimiento es mayor con respecto a las demás temperaturas, puesto que es a estas condiciones en donde la cepa disminuye su diámetro 1µm aproximadamente.

Pero curiosamente tanto a 28º como 45º C se presentan velocidades máximas de crecimiento similar, pero no así en el tamaño de la cepa, la respuesta a 28º C podría explicarse con el fenómeno anteriormente descrito, pero para el caso del aumento del diámetro a 45º C podría

deberse a las pequeñas alteraciones en la membrana plasmática pueden causar cambios importantes en la de muchas funciones que dependen de la membrana, como el transporte, la permeabilidad a los iones, lo cual puede afectar la viabilidad [95].

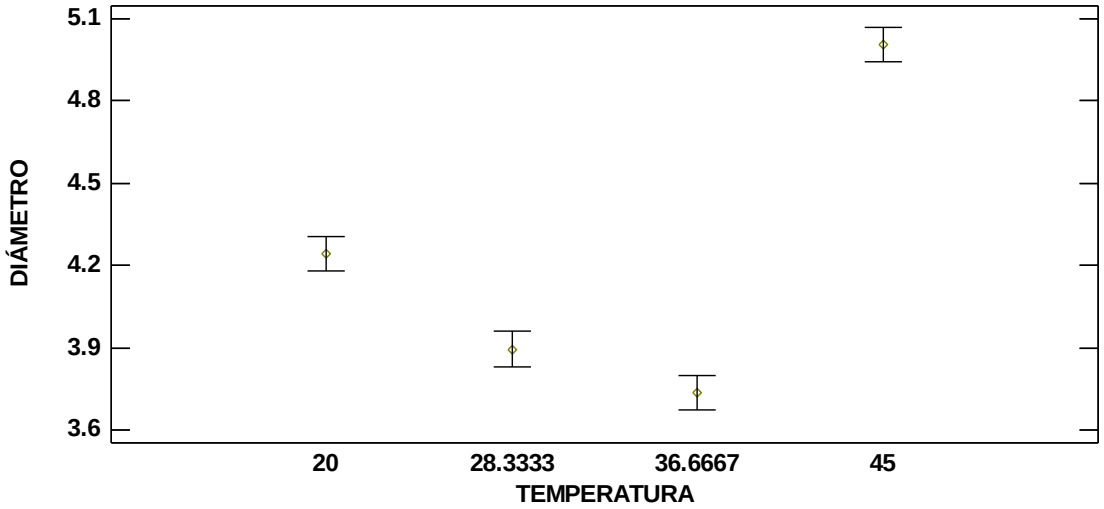

Figura 42. Gráfica de distribución del diámetro con respecto a la temperatura

En la figura 43 se observa la gráfica de distribución de medias del diámetro con respecto a las diferentes concentraciones de calcio empleadas en el medio de cultivo, observamos que entre más elevada sea la concentración de calcio en el medio el diámetro de la levadura parece permanecer estable.

De acuerdo a lo resultados obtenidos en este diseño experimental se puede concluir que la temperatura es el factor que más influye sobre los parámetros que se cuantificaron, en donde se observa más el efecto es en el crecimiento de la cepa a diferentes temperaturas, esto es debido a que la temperatura afecta directamente a la velocidad de crecimiento de la misma, así como también el consumo de la fuente de carbono. Para el caso de las diferentes concentraciones de minerales no se observó un efecto significativo sobre las variables estudiadas, excepto en el cambio del diámetro durante la fermentación, esto se pudo deber a que el calcio le proporciona resistencia a la membrana plasmática, evitando así las variaciones en el tamaño de la cepa, además, también se observó el efecto del calcio y magnesio en interacción con la temperatura en el caso de la actividad enzimática, en donde el calcio y la temperatura tuvieron un mayor efecto sobre la actividad enzimática.

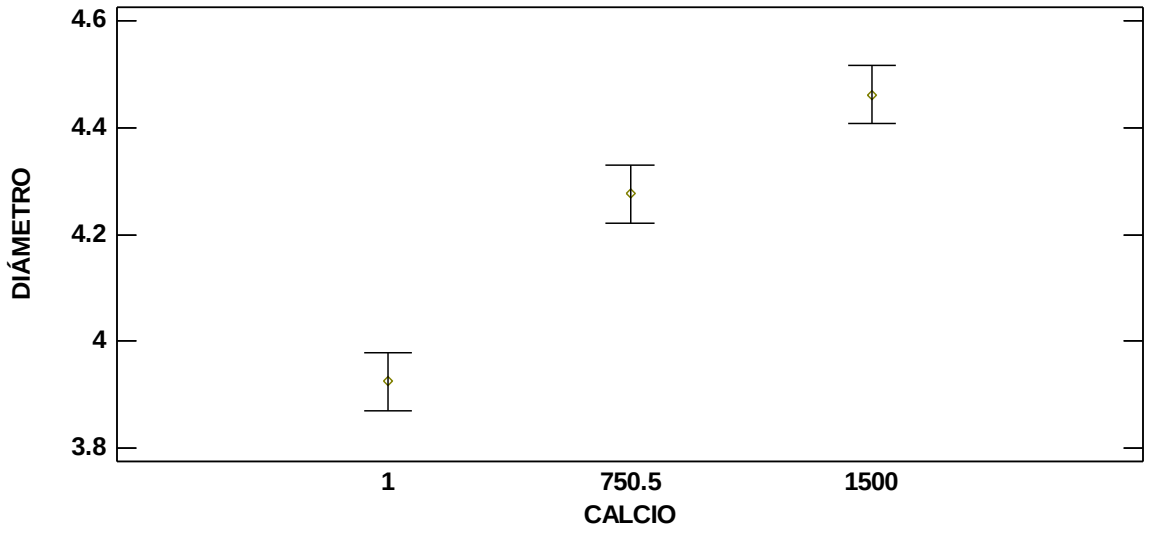

Figura 43. Gráfica de distribución del diámetro en respuesta a las diferentes concentraciones de calcio empleadas.

7.6 Cultivo en biorreactor (continuo)

El cultivo en continuo es una técnica establecida para el estudio fisiológico de un microorganismo. Con la finalidad de evaluar el estado fisiológico de *K. marxianus* se realizaron dos cultivos en continuo en las mismas condiciones de operación, anteriormente descritas en la metodología. En el primer cultivo (I) se evaluó el efecto del magnesio en la fisiología de la cepa, en el cultivo II se observó la influencia del calcio sobre la cepa, en ambos cultivos se observó el efecto de un aumento en la temperatura del cultivo.

Estos cultivos se realizaron utilizando glucosa como fuente de carbono, ambos cultivos iniciaron como un batch en el que las condiciones de operación fueron las mismas, 30º C, 250 rpm, pH 5, el flujo tanto de salida como de alimentación fue de 140 ml/h.

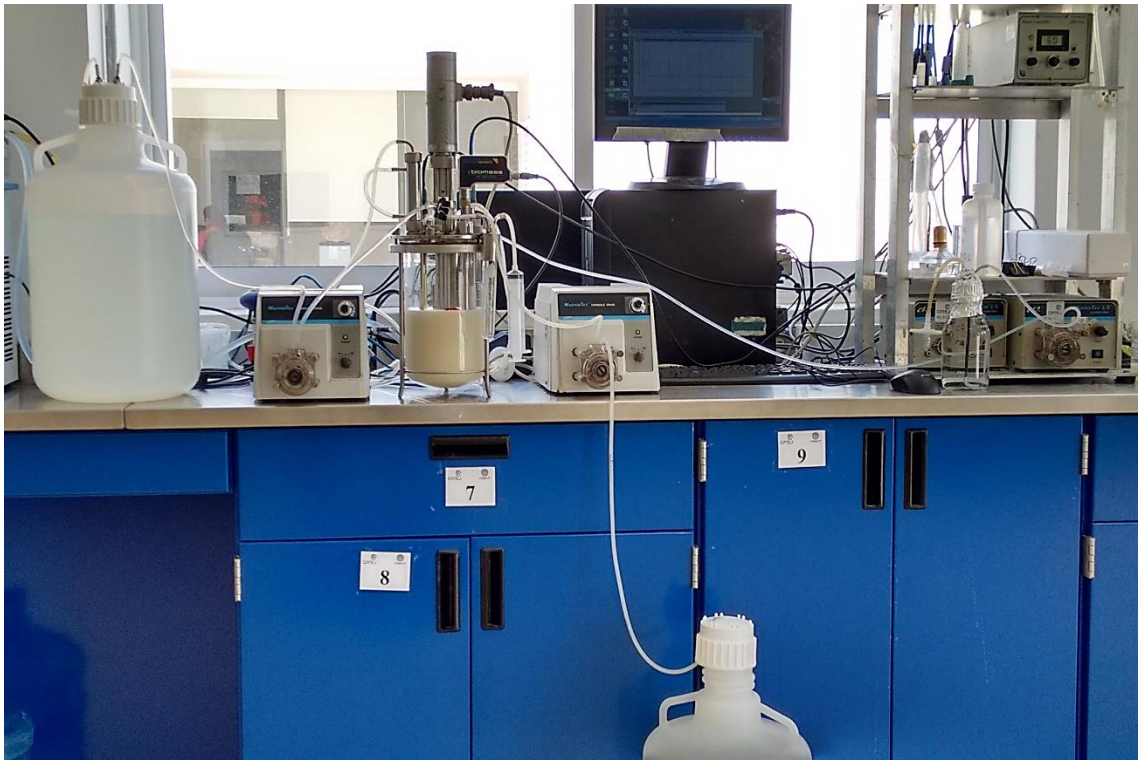

Figura 44. Sistema en continuo utilizado en los dos cultivos

7.6.1 Cinética de crecimiento y consumo de sustrato

Se monitoreo la cinética de crecimiento por diferentes técnicas, dos fuera de línea (conteo en cámara de Neubauer y determinación de biomasa por peso seco) y otra en línea (sonda Fogale) que se utilizó para determinar la viabilidad del cultivo.

En la figura 45 observamos las cinéticas correspondientes al cultivo I, el cultivo en continuo dio inicio a las 20 h de haber iniciado la fermentación, se observa que el sustrato presente en el medio ya estaba limitado, el cultivo en continuo dio inicio con una población de alrededor de $400x10^6$ cel /ml y 2 g/l de biomasa, se aprecia que ambas técnicas de cuantificación se correlacionan.

Durante el resto del cultivo el azúcar se mantuvo limitante, debido a la baja taza de dilución utilizada, las 45 h el cultivo fue sometido a un aumento de temperatura de 7º C, la población disminuye $100x10^6$ cel/ml. Posteriormente se regresó el cultivo a las condiciones iniciales de operación y se dejó aproximadamente 50 h para que se estabilizará, que son 5 tiempos de residencia. Posteriormente se aplicó un pulso de $MgCl_2$, con una concentración final en el

reactor de 250 mg/l de magnesio, la cual fue la concentración más elevada en los experimentos anteriores y al igual que en esos experimentos, tanto en el crecimiento como en el consumo de sustrato no presento ningún cambio.

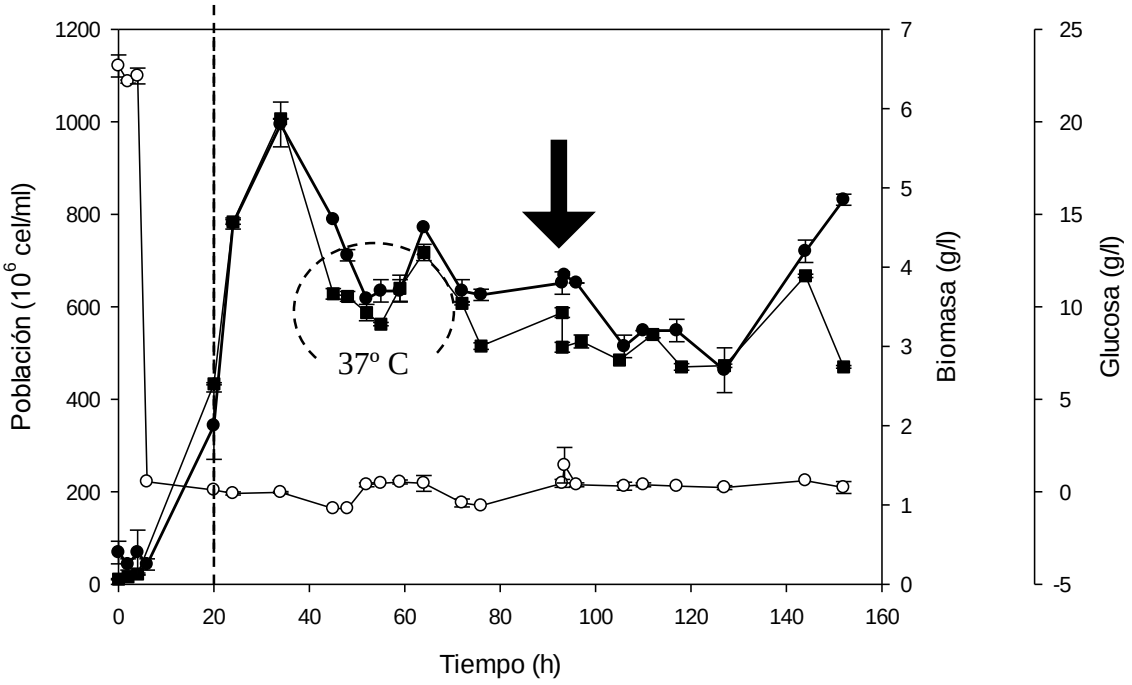

Figura 45. Cinética de crecimiento y concentración de azúcar residual en el cultivo en continuo I. Población (■), Biomasa (●), Consumo de sustrato (○), ⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de magnesio

En la figura 46 observamos la cinética de crecimiento y concentración de azúcar residual II, a las 10 h de cultivo se dio inicio al continuo, el cual se encontraba en la fase exponencial con una población del 650x10^6 cel/ml, además de que el azúcar residual era menos del 1% de la concentración inicial (20 g/l), después del inicio del continuo la población siguió aumentando hasta llega a los 1250x10^6 cel/ml a las 24 en donde se estabilizó, una vez estable el cultivo fue sometido a un pulso de $CaCl_2$ con una concentración de 1500 mg/l de calcio, que como en el caso del magnesio fue la concentración más elevada que se probó en el experimento anterior, pero a diferencia del magnesio, el calcio parece tener una influencia sobre el crecimiento aumentándolo en un 35% con respecto al conteo anterior al pulso de calcio que fue de 1200x10^6 cel/ml.

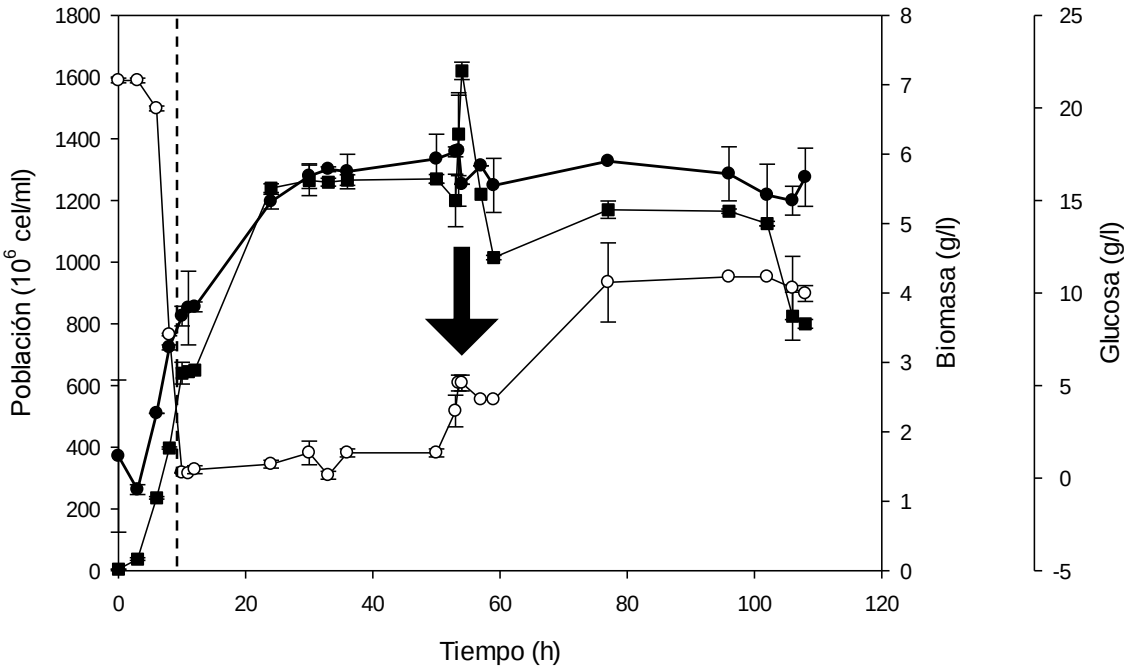

Figura 46. Cinética de crecimiento y concentración de azúcar residual en el cultivo en continuo II. Población (■), Biomasa (●), Consumo de sustrato (○), ⋮ inicio del continuo, ➓ pulso de calcio.

Durante un cultivo en continuo la fisiología del microorganismo es la misma debido a que se mantiene en un mismo estado, se mantienen las mismas condiciones del cultivo (temperatura, pH) así como su velocidad de crecimiento, la cual es igual al flujo de alimentación, en este caso fue de 0.08 y suelen existir variaciones de este estado fisiológico constante si existe algún tipo de variación en estas condiciones, como en este caso fue la composición del medio de cultivo.

El estímulo que presentó el calcio sobre el crecimiento puede deberse a que este y otros metales resultan indispensables para la progresión del ciclo celular. Otro de los papeles importantes del calcio es mantener la permeabilidad de la membrana plasmática de las levaduras, protegiendo la carga estructural de fosfolípidos y la regulación entre la interacción lípido proteína [96].

A pesar de que existen muchos reportes del efecto inhibitorio del calcio en el crecimiento a elevadas concentraciones [96,97], este efecto no se presentó en el cultivo. Las concentraciones de calcio en el medio de cultivo son muy variables, generalmente son por debajo de los 10 mg/l, pero en cultivos enfocados a la producción de enzimas pertenecientes a las glicosilhidrolasas

suelen ser más elevados [35,59,65,98], esto tal vez se deba a que se sabe que el calcio incrementa la actividad fructanasa [98].

7.6.2 Actividad enzimática

Uno de los factores más importantes en este estudio fue la actividad fructanasa, la cual también fue monitoreada en ambos cultivos, se presentan dos tipos de gráficas para cada cultivo, las primeras (figuras 47 y 48) representan las cinéticas de actividad fructanasa durante el cultivo en U/ml contrastadas con la biomasa y el consumo de sustrato, y en las siguientes (figuras 49 y 50) se presentan la actividad en U/g de biomasa. Es importante resaltar es que estos cultivos se realizaron utilizando glucosa como fuente de carbono a una velocidad de dilución muy baja, para tratar de mantener un limitación por la fuente de carbono. Se optó por trabajar con una taza de dilución de 0.08 h^{-1} debido a que de esta manera no se alcanzaría la μmax en esas condiciones de cultivo, lo cual permitió que la cepa creciera de manera más lenta evitando que se lavara el reactor.

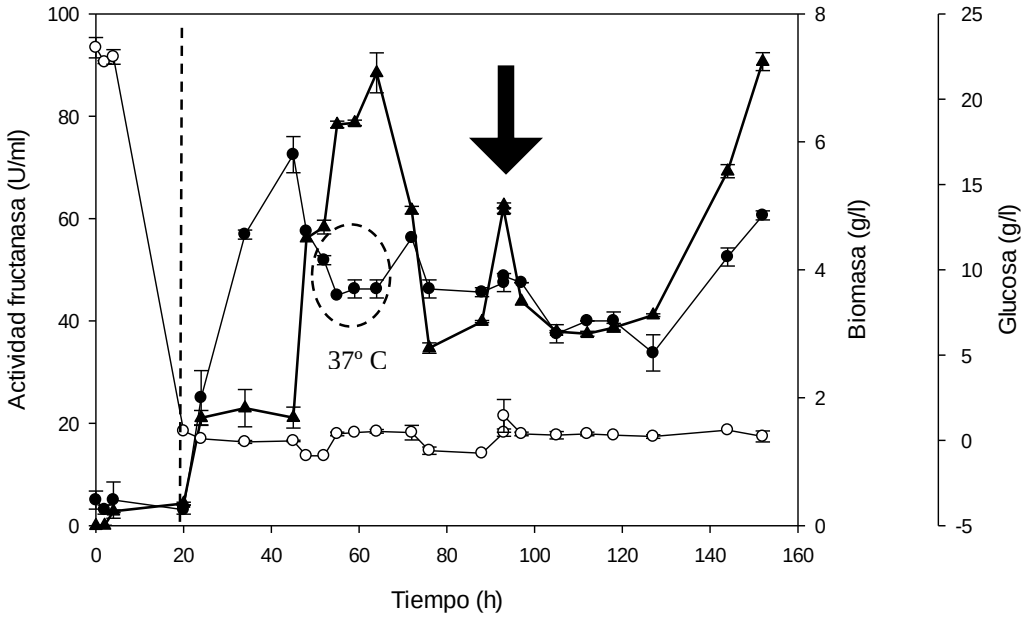

Figura 47. Cinética de actividad fructanasa durante el cultivo I. Biomasa (●), concentración de azúcar residual (○), actividad fructanasa (▲),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de magnesio.

La cantidad de actividad fructanasa máxima obtenida durante ambos cultivos fue distinta, para el cultivo I se obtuvieron 88.5 U/ml y en el segundo cultivo fue de 282 U/ml, la actividad se triplico, esto puede deberse a la concentración de células presentes en ambos cultivos, el I contaba con $714x10^6$ cel /ml y el II con $1165x10^6$ cel /ml, también se cuantificó la cantidad máxima de U/g de biomasa producidas durante ambos cultivos, 23,931 U/g para el cultivo I y 24,597 U/g para el cultivo II.

En ambos cultivos se observa una acumulación de actividad fructanasa esto puede ser debido a los largo tiempos de residencia del cultivo bajo estas condiciones de sustrato limitante, la actividad enzimática fue mayor a lo reportado en experimentos anteriormente realizados tanto a nivel matraz como en biorreactor que no fueron realizados en continuo. La producción de fructanasa dio inicio una vez que la glucosa fue limitante en el medio, en ambos casos eso sucedió antes de dar inicio al cultivo en continuo.

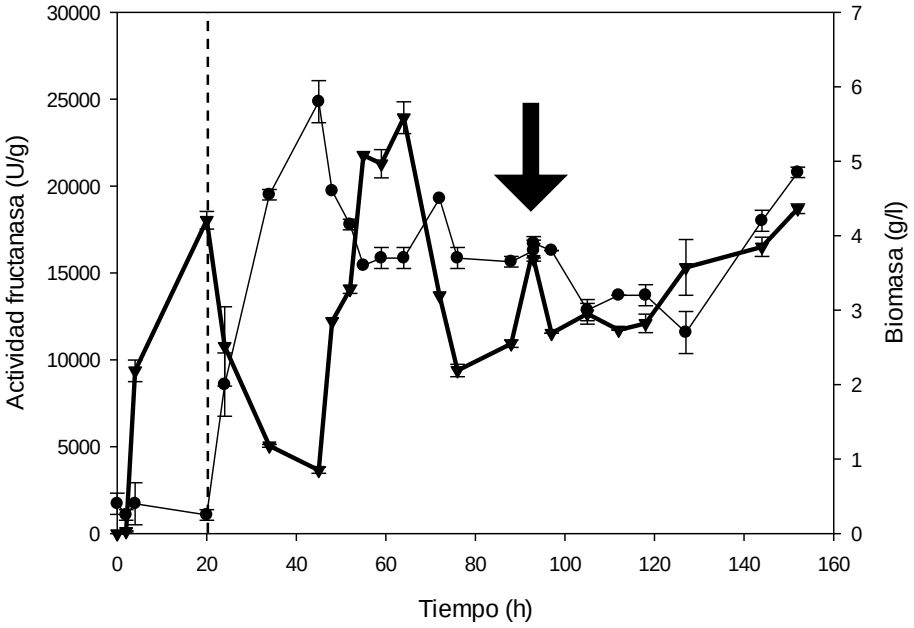

Figura 48. Cinética de actividad fructanasa en U/g de biomasa del cultivo I. Biomasa (○), Actividad fructanasa en U/g (▼),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de magnesio.

Los resultados anteriores son similares a los obtenidos por Jacques y col. [99] quienes realizaron estudio de producción de fructanasa con cepas de *Streptococcus mutans* en cultivo en batch y continuo, ellos realizaron varias tasas de dilución para observar el efecto sobre la producción de

la enzima encontrando que cuando la glucosa era el nutriente limitante en el medio la cepa acumulaba niveles máximos de fructanasa en bajas tasas de dilución (0.05-10^{h-1}). También encontraron que para ambas cepas la tasa de producción de la enzima aumento con la tasa de crecimiento, mientras hubiese limitación de glucosa, pero cuando no había esta limitante la cantidad de enzima siempre fue menor.

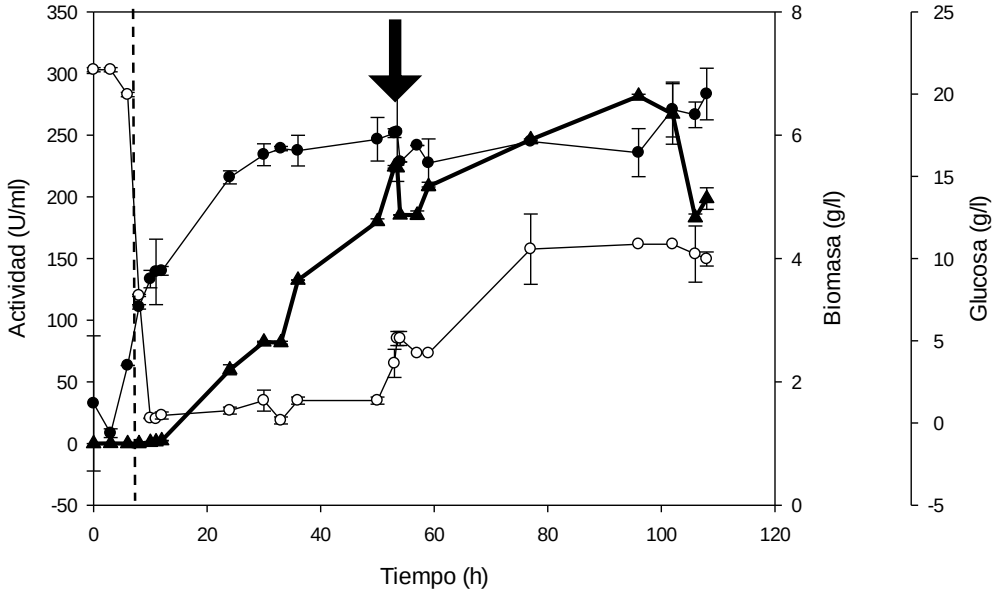

Figura 49. Cinética de actividad fructanasa durante el cultivo II. Biomasa (●), Concentración de azúcar residual (○), actividad fructanasa (▲),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de calcio

Como se observa en el cultivo II de nuestros experimentos, se puede apreciar en la figura 49 que alrededor de las 55 h de cultivo justo después de haber dado el pulso de calcio, la glucosa se siguió acumulando hasta llegar por arriba de los 10 g/l, pero curiosamente la actividad enzimática no decayó, posteriormente como ya se mencionó con anterioridad se aumentó de temperatura de 30 a 37º C y posteriormente se observa un decaimiento de la actividad fructanasa.

La disminución en la actividad fructanasa puede deberse a la represión catabólica por el exceso de glucosa, la síntesis de este tipo de enzimas pueden reprimirse durante el crecimiento en presencia de cualquier azúcar que las células puedan utilizar como fuente de energía y de carbono, por lo tanto a actividad específica de estas enzimas puede variar debido a que la producción depende del equilibrio entre la inducción y la represión de catabolitos [99].

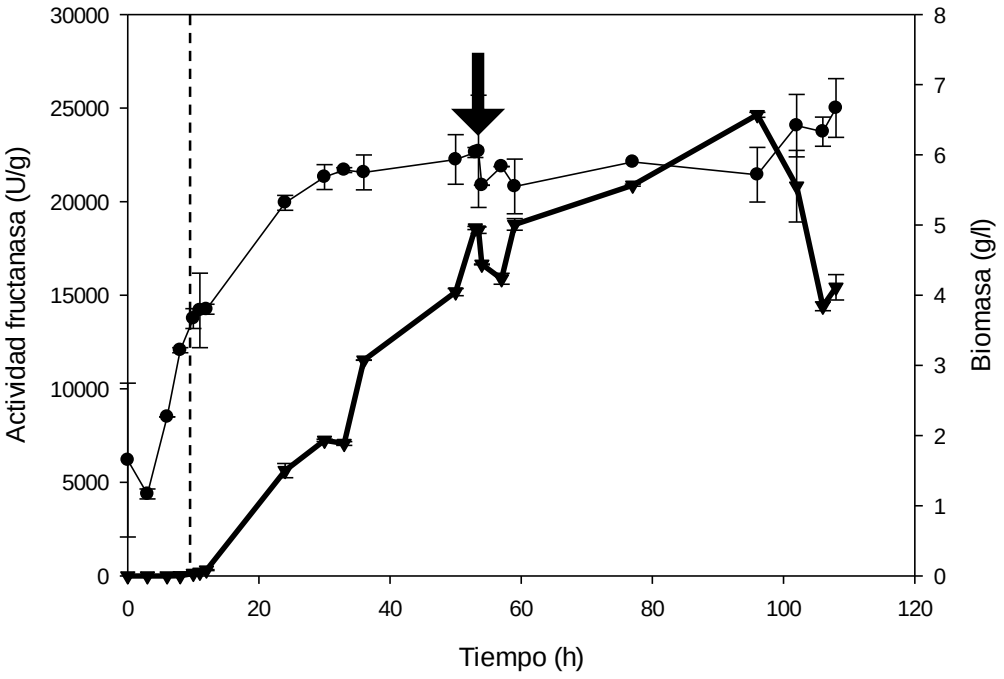

Figura 50. Cinética de actividad fructanasa en U/g de biomasa durante el cultivo II. Biomasa (●), Actividad fructanasa en U/g (▼),⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de calcio.

7.6.3 Viabilidad y actividad metabólica

La viabilidad está definida como la capacidad de las células a dividirse y crecer [100]. En el caso de la industria cervecera la capacidad para evaluar la viabilidad con precisión es necesario mantener el rendimiento en la fermentación, generando un producto estándar y uniforme. La técnica estándar utilizada es la tinción con azul de metileno, pero se ha demostrado que puede ser inexacta para células que presentan una viabilidad menor al 90%, es por ello que en estos experimentos decidimos optar por otras técnicas de cuantificación.

Para la determinación de la viabilidad del cultivo se utilizaron dos técnicas, se realizaron UFC en caja, y espectroscopia dieléctrica para el monitoreo de la viabilidad del cultivo en línea, para determinar la actividad metabólica de la cepa se utilizó microscopia de fluorescencia.

El uso de espectroscopia dieléctrica en línea para determinar el porcentaje de viabilidad, como una herramienta para el control y monitoreo de un cultivo ya ha sido reportada previamente [26]. Tibayrenc y col. [101] reportaron el uso de espectroscopia dieléctrica en línea para

observar el efecto de estresar con cambios de temperatura a *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica, se sabe que las propiedades dieléctricas de las células en suspensión dependen de diferentes variables relacionadas con el estado fisiológico de la célula, encontrando diferentes valores de permitividad en las diferentes fases del crecimiento, altos valores en la fase exponencial y menores en la fase estacionaria, este comportamiento mostró los diferentes estados fisiológicos de las células durante el proceso fermentativo.

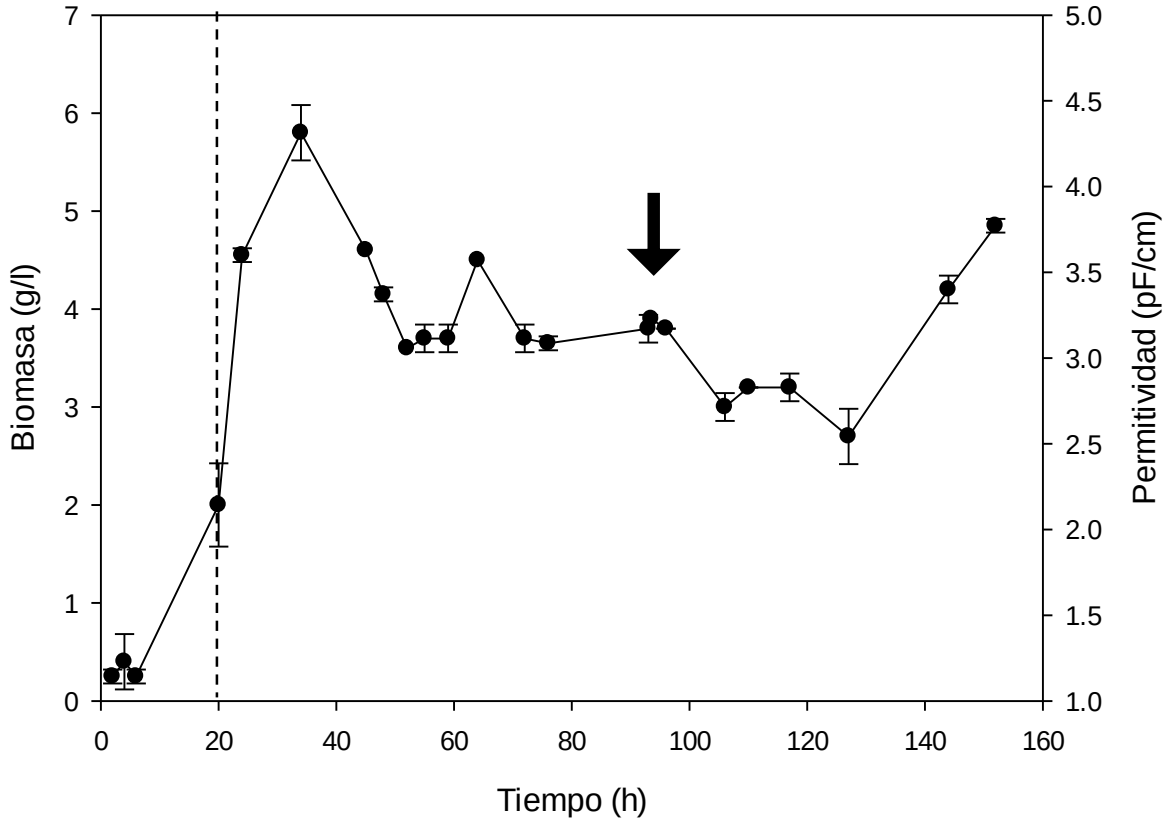

Figura 51. Cinética de viabilidad registrada por espectroscopia dieléctrica en el cultivo I. Biomasa (●), ⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de magnesio.

En ambos cultivos (Figura 51 y 52) se observa que la permitividad comienza con valores superiores a 1 pF/cm, lo cual puede deberse al porcentaje de cultivavilidad del inóculo, que fue superior al 90% en los dos cultivos. Durante el cultivo en batch en ambas fermentaciones la permitividad va en aumento registrando valores por arriba de 3 pF/cm al dar inicio al cultivo en

continuo. En los dos experimentos observamos que tanto la permitividad como la biomasa van en aumento conforme avanza el cultivo en continuo, hasta alcanzar valores de 4.5 pF/cm.

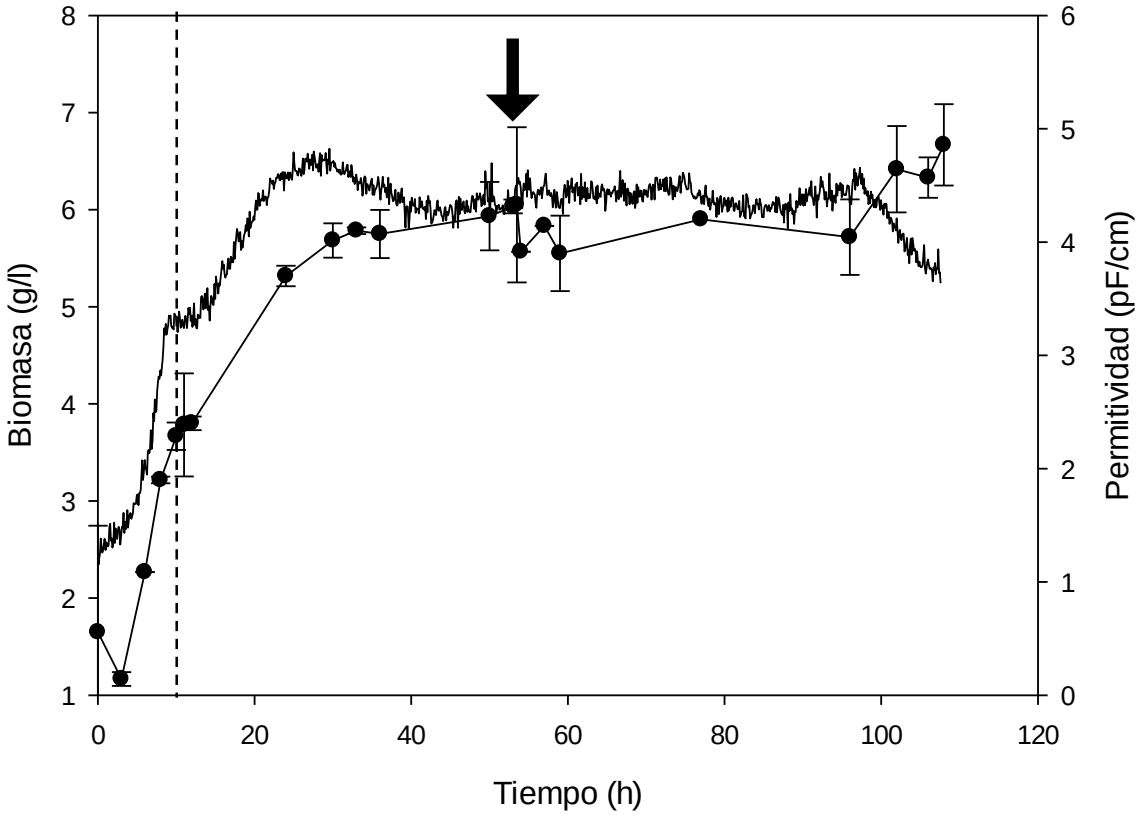

Figura 52. Cinética de viabilidad registrada por espectroscopia dieléctrica en el cultivo II. Biomasa (●), ⋮ inicio del continuo, ➓ pulso de calcio

Otra de las técnicas utilizadas para la determinación de la viabilidad de la cepa durante el cultivo fue el conteo de colonias en placa (UFC). En los dos cultivos (figuras 54 y 55) observamos que la capacidad de división celular de la levadura disminuye a las 4 h de haber iniciado el cultivo, a un porcentaje menor del 50%, para posteriormente incrementar durante el continuo, para el caso del cultivo I observamos que el porcentaje de cultivavilidad se mantiene en un 40% durante las primeras 48 h, después del pulso de magnesio la cultivavilidad aumento del 80 al 95%, después se disminuye pero se mantiene alrededor del 80%.

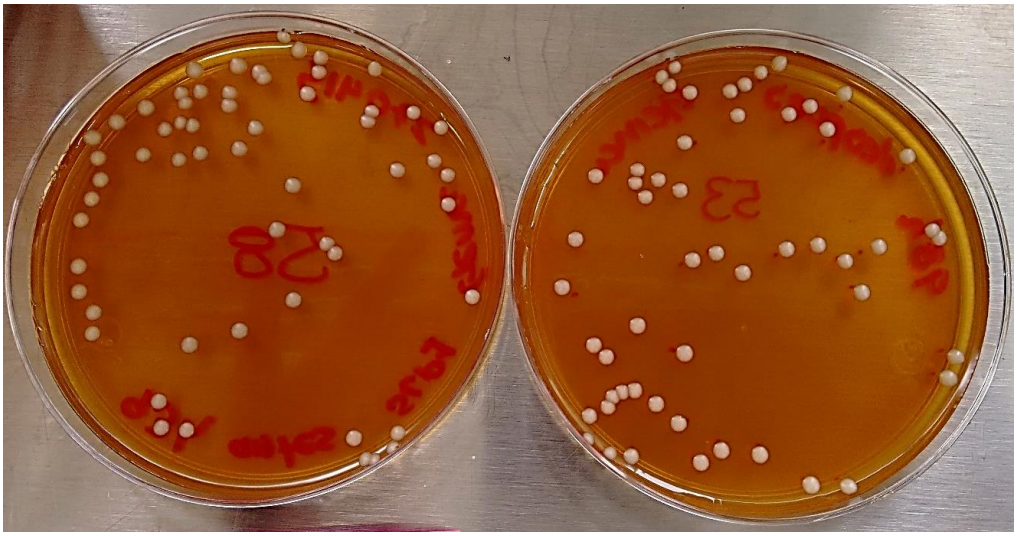

Figura 53. Colonias formadas después del pulso de calcio en el cultivo II

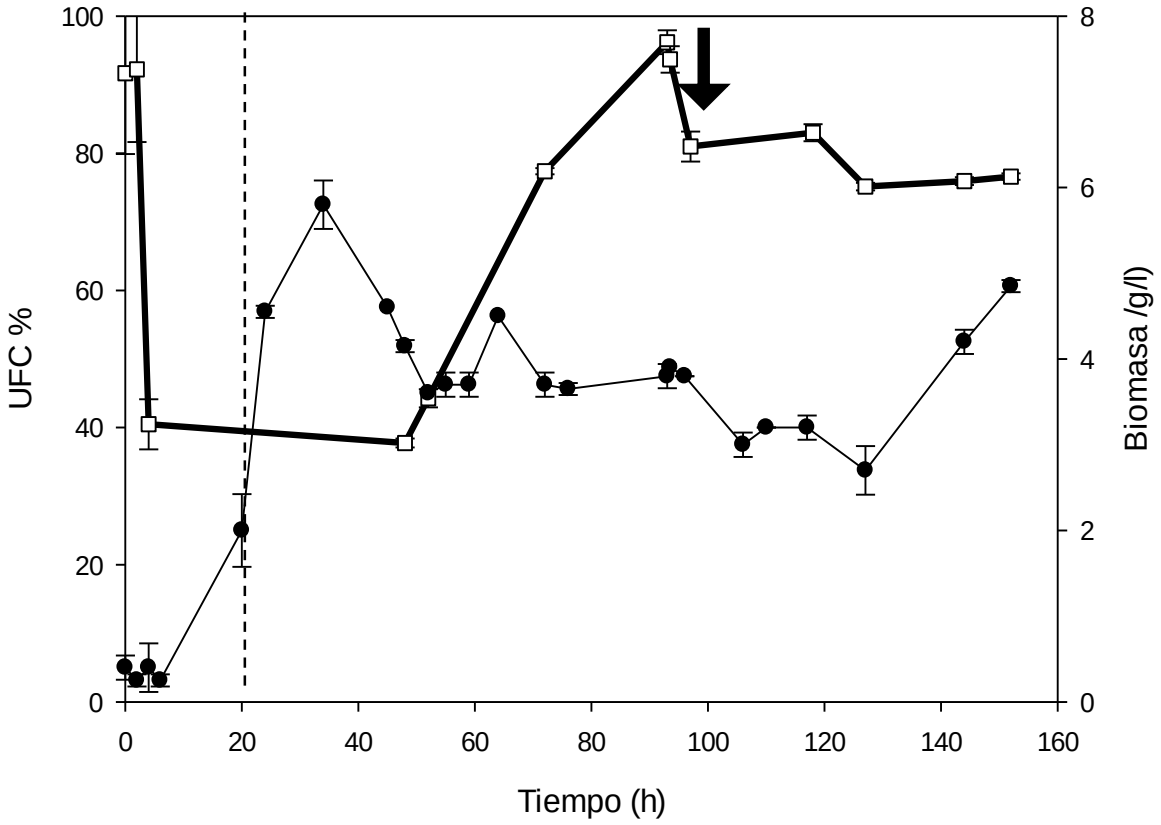

Figura 54. Capacidad de división celular durante el cultivo I. Biomasa (●), % UFC (□),⋮ inicio del continuo, ➓ pulso de magnesio.

En la figura 55 observamos la cinética de capacidad de división celular del cultivo II, observamos que durante las primeras 45 h del cultivo en continuo el porcentaje de cultivavilidad no fue estable, pero al igual que en el cultivo anterior el porcentaje no fue menor al 40%. Después de dar el pulso de calcio aumento en un 20% y posteriormente disminuyó, y después volvió a aumentar estabilizándose.

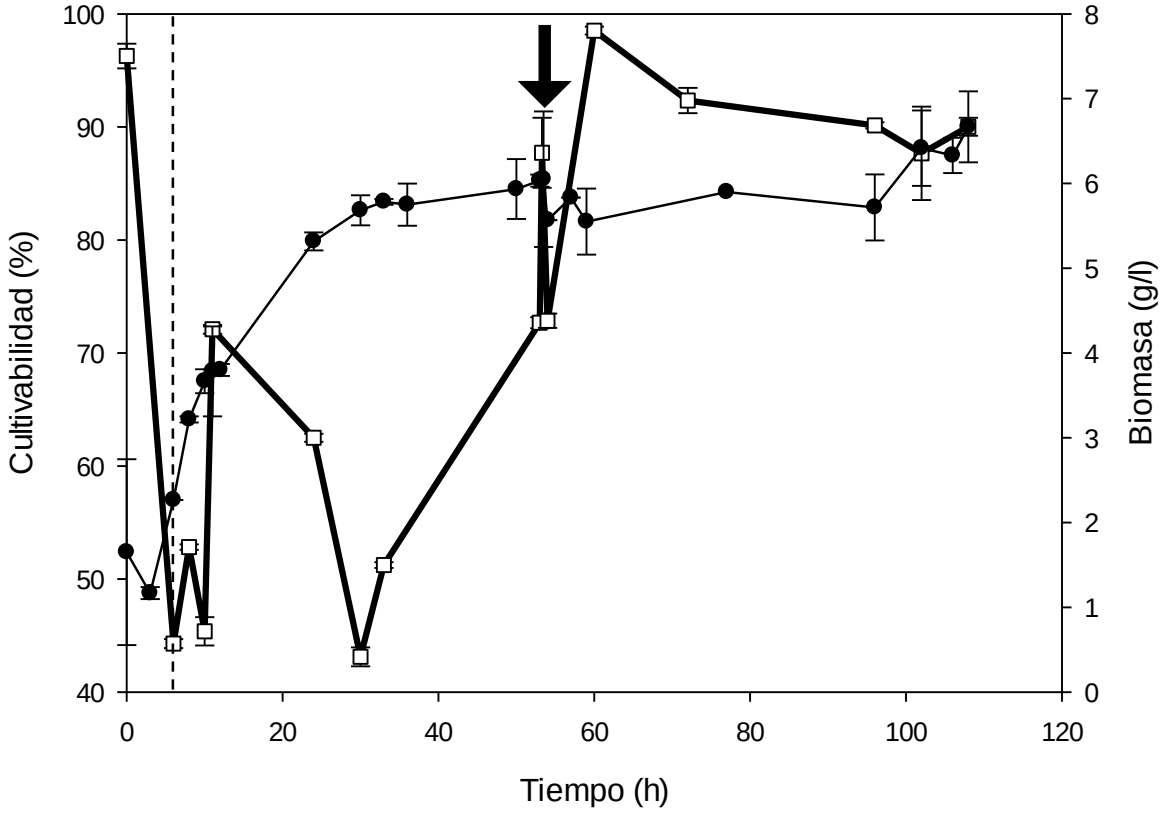

Figura 55. Capacidad de división celular durante el cultivo II. Biomasa (●), % cultivavilidad (□), ⋮ inicio del continuo, ⬇ pulso de calcio

También se utilizó microscopia de fluorescencia para determinar la actividad metabólica del cultivo en determinados puntos del mismo, como ya se mencionó con anterioridad para esta técnica se utilizó el FUN1® el cual determina la actividad metabólica de las células. En ambos cultivos la actividad metabólica al inicio del cultivo fue alrededor del 50% (figuras 56 y 57), la cual fue aumentando conformen avanzó el cultivo.

Se ha observado que el FUN1® es un colorante fluorescente que forma estructuras cilíndricas intravacuolares en células metabólicamente activas. La tinción con este compuesto utiliza un

mecanismo de procesamiento bioquímico endógeno que aún es desconocido para compactar y formar cilindros intravacuolares de color rojo-naranja., pero que requiere de integridad de la membrana plasmática y de capacidad metabólica (ATP) [78]. Aunque se uso es restringido por el hecho de que las células deben ser vistas justo después de la tinción, debido a la perdida de la fluorescencia.

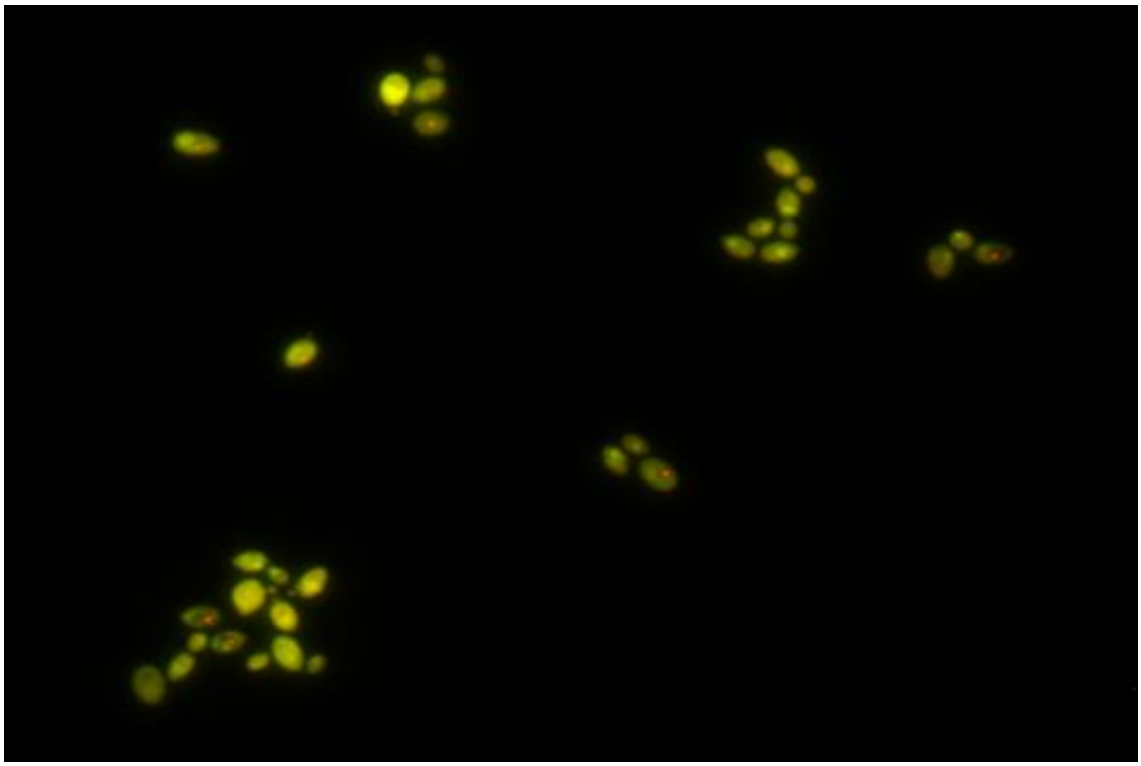

Figura 56. Células de *K. marxianus* con microscopia de fluorescencia al inicio del cultivo I

La mayoría de los estudios realizados utilizando en FUN1® como prueba de viabilidad han sido realizados con *S. cerevisiae*. Por ejemplo, Holmes-Smith y col. [102] utilizaron el FUN1® para determinar la viabilidad de *S. cerevisiae* en polímeros biocompatibles bajo diferentes condiciones de crecimiento, encontrando que este fluorocromo puede ser utilizado para monitorear la viabilidad del microorganismo durante el cultivo, a pesar del poco conocimiento que se tiene acerca de su funcionamiento.

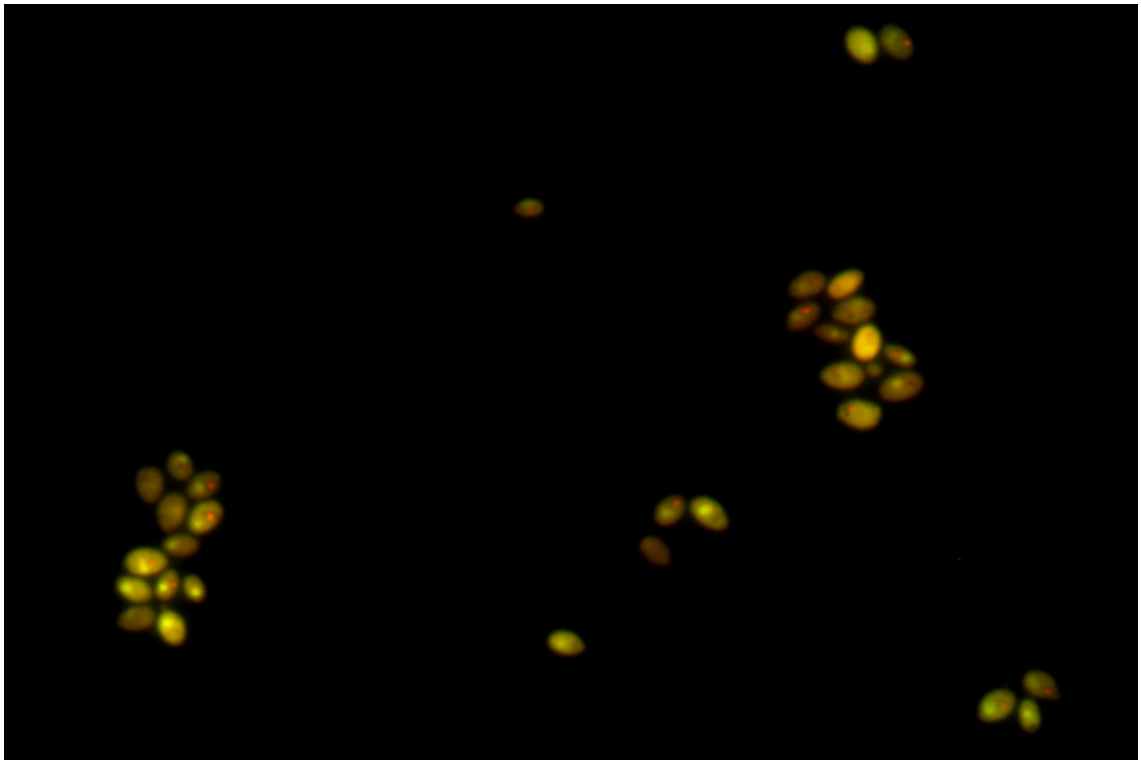

Figura 57. Células de *K. marxianus* con microscopia de fluorescencia al inicio del cultivo II

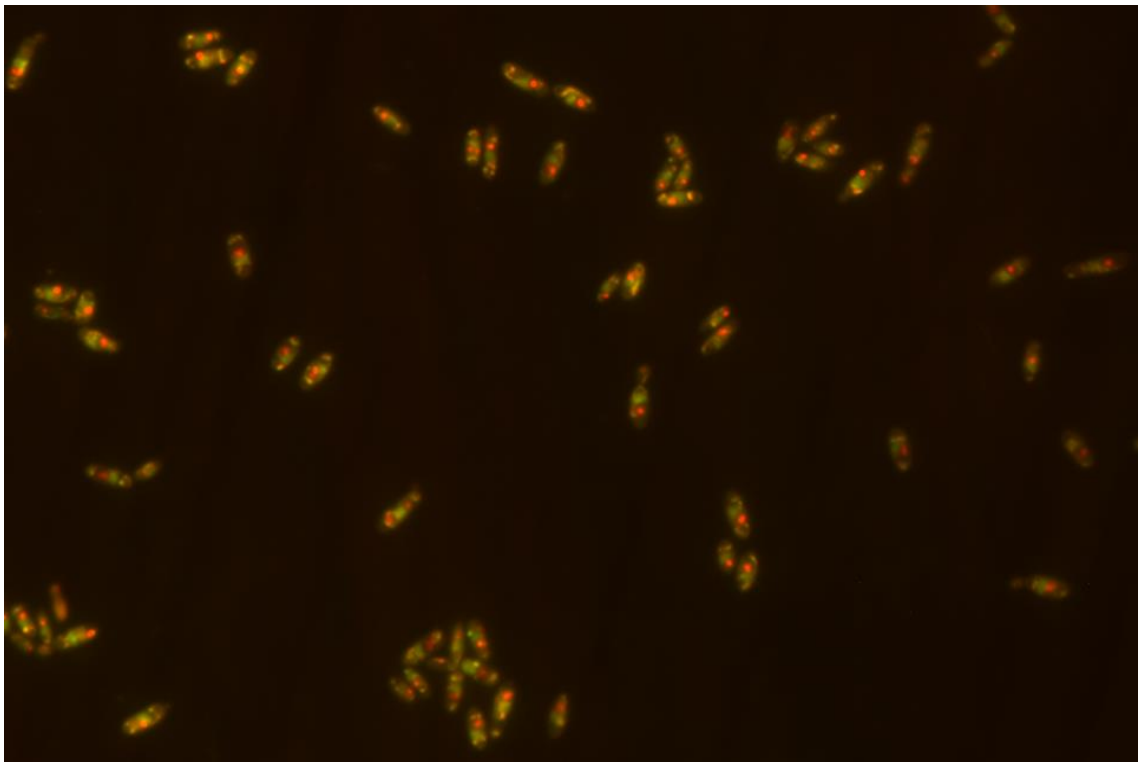

Figura 58. Células de *K. marxianus* con microscopia de fluorescencia al finalizar el cultivo I

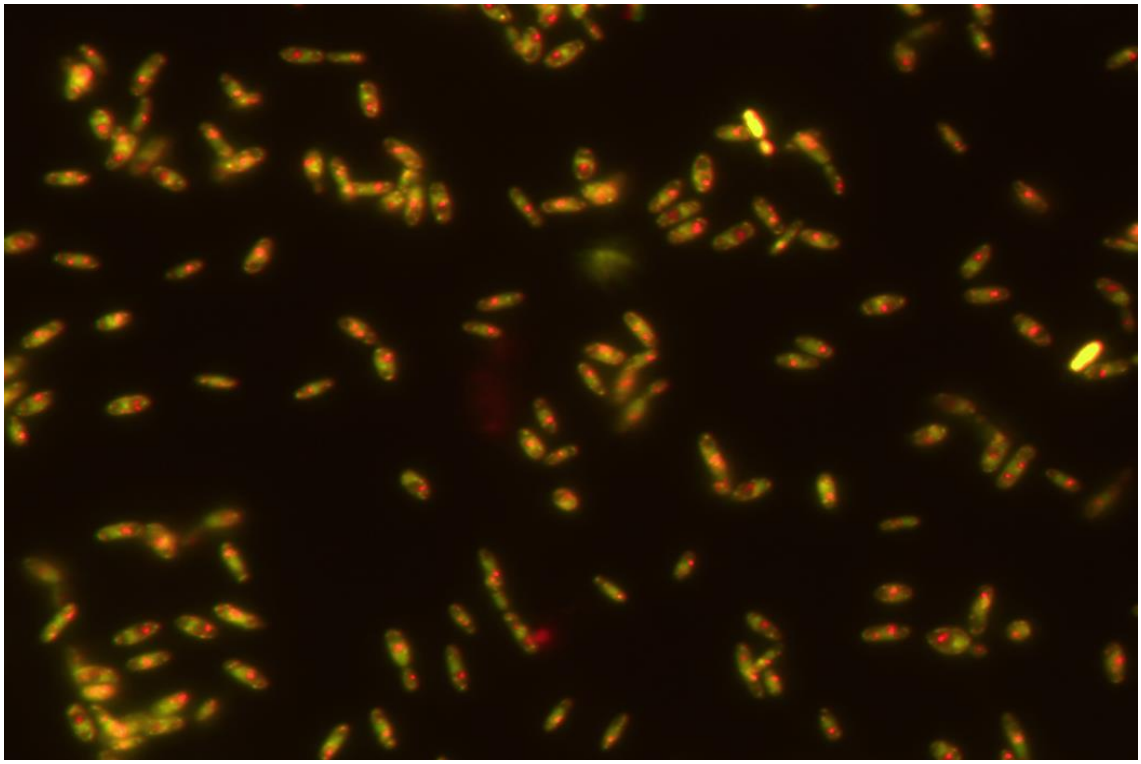

Figura 59. Células de *K. marxianus* con microscopia de fluorescencia al finalizar el cultivo II

Hasta ahora el único reporte que existe del su uso con cepas *no-Saccharomyces* es el de Pina-Vaz y col. [103] quienes lo utilizaron para observar la actividad antifúngica de ibuprofeno en combinación con fluconazol en cepas del género *Candida*.

7.6.4 Diámetro y Morfología

Las levaduras tienden a ser polimorfas, es decir, tienden a adoptar formas distintas dentro de la misma especie y aun en el mismo cultivo, lo cual depende de diversos factores, especialmente del sustrato en que viven y de la edad de los cultivos. Debido a esto la forma no siempre puede tomarse como carácter taxonómico.

K. marxianus generalmente presenta un morfología esferoidal, ovoide o elipsoidal, y cilíndrico de vez en cuando, su tamaño oscila entre los 4-8 µm. Se producen individualmente, en parejas o en pequeños racimos.

Se tomaron diversas fotografías a lo largo del cultivo para observar la morfología de la cepa. En la figura 60 observamos la morfología de la cepa al inicio de ambos cultivos, la cual presenta la típica forma ovoide, con un diámetro de 4.5 µm ±0.1.

Como ya se ha mencionado con anterioridad la cepa durante el cultivo en continuo en condiciones limitantes de glucosa produce elevadas concentraciones de fructanasa, se aprecia en la figura 61 que la levadura en estas condiciones cambia su morfología, a una forma más cilíndrica. Esto puede deberse a las condiciones limitantes de sustrato en que se encontraba la cepa, lo cual le genero algún tipo de estrés provocando este cambio.

Cultivo I Cultivo II

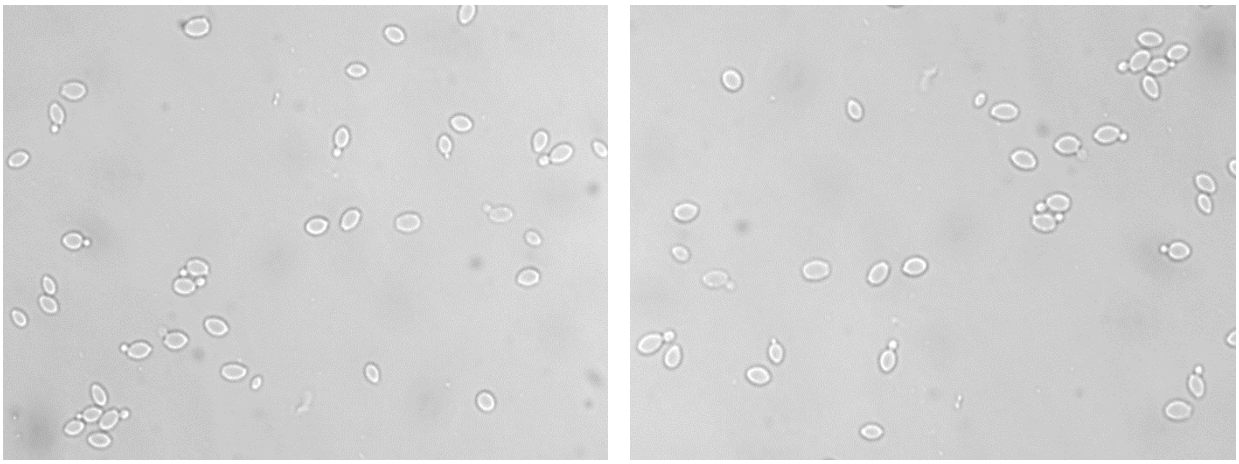

Figura 60. Morfología de *K. marxianus* al inicio del cultivo en continuo

Cultivo I Cultivo II

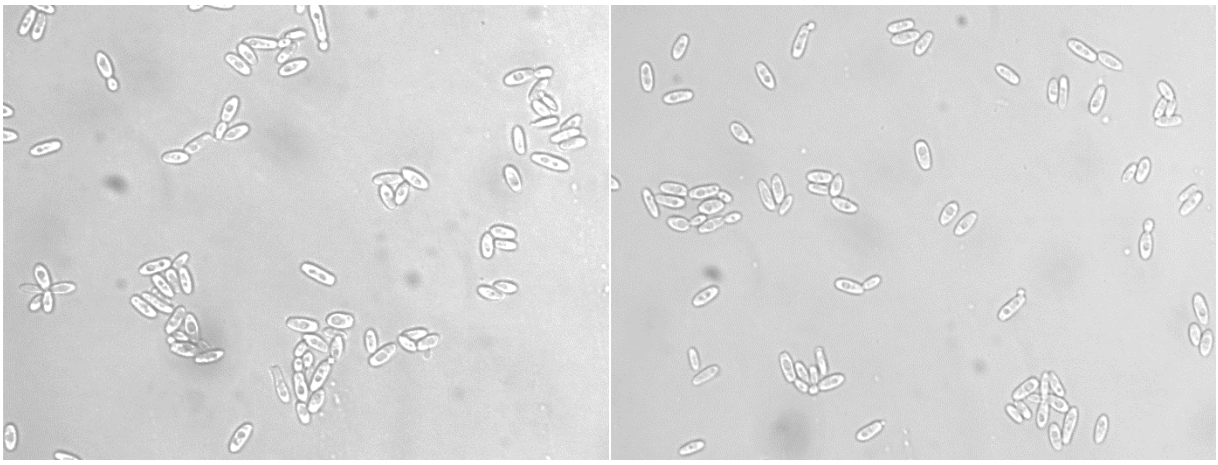

Figura 61. Morfología de *K. marxianus* durante la producción de fructanasas en cultivo en continuo

Samoilenco y col. [104] estudiaron el efecto de la temperatura en la morfología de *Candida utilis* en cultivo en continuo, tanto en quemostato como turbidostato, ellos observaron que el tamaño medio de la levadura aumentó al aumentar la temperatura óptima. El tamaño de las células cultivadas en condiciones de turbidostato fue mucho mayor a las cultivadas en condiciones limitantes de glucosa.

8 CONCLUSIONES

El uso de fructanos de agave como fuente de carbono resultó ser un buen inductor para la expresión de una fructanasa de *K. marxianus*.

Tanto las vitaminas como los elementos traza que componen el medio químicamente definido resultaron una mejor opción para el crecimiento de la cepa.

En los diferentes experimentos realizados se comprobó que la temperatura presenta un efecto sobre la fisiología de *K. marxianus*, tanto en la velocidad de crecimiento como la actividad fructanasa. A pesar de que a 20º C la velocidad de crecimiento es menor con respecto a otras temperaturas probadas, fue en a esta temperatura donde se obtuvieron los valores de población más elevados.

El empleo de la sonda de capacitancia permitió la detección en línea de la viabilidad de la cepa durante los diferentes cultivos en las distintas condiciones empleadas para el crecimiento de la cepa.

El uso de la microscopia de fluorescencia con el FUN1®, permitió observar el estado fisiológico de *K. marxianus* durante el cultivo continuo. A demás el análisis de estas fotografías permitieron encontrar cambios en la morfología de la cepa a lo largo del cultivo.

El uso de las diferentes técnicas empleadas durante este trabajo de tesis permitió tener un mejor conocimiento del estado fisiológico de la cepa al ser sometida a diferentes temperaturas de crecimiento y diversas concentraciones de calcio y magnesio en el medio de cultivo.

9 PERSPECTIVAS

- Evaluar el estado fisiológico de *K. marxianus* en un cultivo en continuo a temperaturas menores de 30º C y observar el efecto sobre la producción de fructanasas.

- Evaluar diferentes tasas de dilución en la producción de fructanasas utilizando glucosa como fuente de carbono.

- Realizar pulsos de fructanos de agave para observar el efecto de la producción de fructanasas durante un cultivo en continuo.

- Realizar pulsos de otros elementos traza para observar el efecto que presentan sobre la fisiología de la cepa.

- Analizar los genes que se expresan durante la producción de fructanasas en condiciones de glucosa limítate en el medio.

- Cuantificar la producción de compuestos volátiles y etanol durante cultivo en continuo en diferentes temperaturas con condiciones limitantes de glucosa.

- Probar otras fuentes de carbono para observar el efecto de la producción de fructanasas en condiciones limitantes de sustrato

10 BIBLIOGRAFIA

[1] M.M. Lane, J.P. Morrissey, Kluyveromyces marxianus: A yeast emerging from its sister's shadow, Fungal Biol. Rev. 24 (2010) 17–26. doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001.

[2] J. Cai, I.N. Roberts, M.D. Collins, Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera Brettanomyces, Debaryomyces, Dekkera, and Kluyveromyces deduced by small-subunit rRNA gene sequences., Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (1996) 542–549. doi:10.1099/00207713-46-2-542.

[3] M. Schaechter, J. Lederberg, The desk encyclopedia of microbiology, Elsevier/Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004.

[4] C. Rosa, P. Gábor, Biodiversity and ecophysiology of yeasts, 2006. doi:10.1007/3-540-30985-3.

[5] J. a. Barnett, K.D. Entian, A history of research on yeasts 9: Regulation of sugar metabolism, Yeast. 22 (2005) 835–894. doi:10.1002/yea.1249.

[6] M.L. Berbee, J.W. Taylor, From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi, Can. J. Bot. 73 (1995) 677–683. doi:10.1139/b95-310.

[7] T. Deak, Handbook of Food Spoilage Yeasts, Second Edition, CRC Press, 2007.

[8] Axcell BC & O'Connor-Cox ESC, The concept of yeast vitality – an alternative approach., Proc. 24th Conv. Inst. Brew. (1996).

[9] P.F. STANBURY, A. WHITAKER, S.J. HALL, CHAPTER 4 - Media for Industrial Fermentations, in: P.F.S.W.J.B.T.-P. of F.T. (Second E. HALL (Ed.), Pergamon, Amsterdam, 1995: pp. 93–122. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-036131-4.50009-2.

[10] I. Russell, Brewing Yeast and Fermentation: Chris Boulton and David Quain;, J. Inst. Brew. 109 (2003) 161. doi:10.1002/j.2050-0416.2003.tb00148.x.

[11] M. Bouix, J.-Y. Leveau, Rapid Assessment of Yeast Viability and Yeast Vitality During Alcoholic Fermentation, J. Inst. Brew. 107 (2001) 217–225. doi:10.1002/j.2050-0416.2001.tb00093.x.

[12] R.C. Nabais, I. Sá-Correia, C.A. Viegas, J.M. Novais, Influence of calcium ion on ethanol tolerance of Saccharomyces bayanus and alcoholic fermentation by yeasts, Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 2439–2446. doi:10.1128/AEM.02269-06.

[13] R.M. Birch, M. Ciani, G.M. Walker, Magnesium, Calcium and Fermentative Metabolism in Wine Yeasts, J. Wine Res. 14 (2003) 3–15. doi:10.1080/0957126032000114973.

[14] G.M. Walker, The Roles of Magnesium in Biotechnology, Crit. Rev. Biotechnol. 14 (1994) 311–354. doi:10.3109/07388559409063643.

[15] G.H. Fleet, M.A. Mian, The occurrence and growth of yeasts in dairy products, Int. J. Food Microbiol. 4 (1987) 145–155. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(87)90021-3.

[16] C.G. Gabrielă, V. Daniela, The influence of different forms of backery yeast Saccharomyces cerevisie type strain on the concentration of individual sugars and their utilization during fermentation, Rom. Biotechnol. Lett. 15 (2010) 5417–5422.

[17] J.S. Pierce, F. the Analysis Committee, INSTITUTE OF BREWING: ANALYSIS COMMITTEE MEASUREMENT OF YEAST VIABILITY, J. Inst. Brew. 76 (1970) 442–443. doi:10.1002/j.2050-0416.1970.tb03325.x.

[18] E. Parkkinen, H. Suomalainen, ESTERASES OF BAKER'S YEAST. II. SUBSTRATE SPECIFICITIES TOWARDS ESTERS FORMED DURING SUGAR FERMENTATIONS, J. Inst. Brew. 88 (1982) 34–38. doi:10.1002/j.2050-0416.1982.tb04067.x.

[19] V.A. Gant, G. Warnes, I. Phillips, G.F. Savidge, The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics, J. Med. Microbiol. 39 (1993) 147–154. doi:10.1099/00222615-39-2-147.

[20] R.I. Jepras, J. Carter, S.C. Pearson, F.E. Paul, M.J. Wilkinson, Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995) 2696–2701.

[21] E. Carter, F. Paul, P. Hunter, Cytometric Evaluation of Antifungal Agents, in: D. Lloyd (Ed.), Flow Cytom. Microbiol. SE - 8, Springer London, 1993: pp. 111–120. doi:10.1007/978-1-4471-2017-9_8.

[22] M.G. Dinsdale, D. Lloyd, B. Jarvis, YEAST VITALITY DURING CIDER FERMENTATION: TWO APPROACHES TO THE MEASUREMENT OF MEMBRANE POTENTIAL, J. Inst. Brew. 101 (1995) 453–458. doi:10.1002/j.2050-0416.1995.tb00883.x.

[23] B. Rotman, B.W. Papermaster, Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 55 (1966) 134–141.

[24] P.J. Millard, B.L. Roth, H.P.T. Thi, S.T. Yue, R.P. Haugland, Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts, Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997) 2897–2905.

[25] C.S. and H.C. Carvell J.P., Austin G., Matthee A., Van de Spiegle K., Developments in using offline radio-frecuency impedance methods for measuring the viable cell concentration in the brewery., J. Am. Soc. Brew. Chem. 58 (2000) 57–62.

[26] J.P. Carvell, J.E. Dowd, On-line measurements and control of viable cell density in cell culture manufacturing processes using radio-frequency impedance, Cytotechnology. 50 (2006) 35–48. doi:10.1007/s10616-005-3974-x.

[27] I. The, Electric properties of tissues, Wiley Encycl. Biomed. Eng. 209 (2006) 1–12. doi:10.1.1.65.7364.

[28] H.P. Schwan, Electrical properties of tissues and cell suspensions: mechanisms and models, Proc. 16th Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. (1994). doi:10.1109/IEMBS.1994.412155.

[29] L. Yang, Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes, Talanta. 74 (2008) 1621–1629. doi:10.1016/j.talanta.2007.10.018.

[30] K. Foster, Dielectric properties of tissues, in: Biomed. Eng. Handb., 1996: pp. 89–1 – 89–12.

[31] S. Nonklang, B.M.A. Abdel-Banat, K. Cha-aim, N. Moonjai, H. Hoshida, S. Limtong, et al., High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042, Appl. Environ. Microbiol. 74 (2008) 7514–7521. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2607150&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

[32] R.J. Rouwenhorst, L.E. Visser, a a Van Der Baan, W. a Scheffers, J.P. Van Dijken, Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of Kluyveromyces marxianus CBS 6556., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 1131–1137.

[33] M. Hensing, H. Vrouwenvelder, C. Hellinga, R. Baartmans, H. van Dijken, Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of Kluyveromyces marxianus, Appl. Microbiol. Biotechnol. 42 (1994) 516–521. doi:10.1007/BF00173914.

[34] E. Barranco-Florido, M. García-Garibay, L. Gómez-Ruiz, A. Azaola, Immobilization system of Kluyveromyces marxianus cells in barium alginate for inulin hydrolysis, Process Biochem. 37 (2001) 513–519. doi:10.1016/S0032-9592(01)00235-7.

[35] J. Arrizon, S. Morel, A. Gschaedler, P. Monsan, Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal, Bioresour. Technol. 110 (2012) 560–565. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.112.

[36] M.M. Lane, N. Burke, R. Karreman, K.H. Wolfe, C.P. O'Byrne, J.P. Morrissey, Physiological and metabolic diversity in the yeast Kluyveromyces marxianus., Antonie Van Leeuwenhoek. 100 (2011) 507–519. doi:10.1007/s10482-011-9606-x.

[37] G.G. Fonseca, E. Heinzle, C. Wittmann, A.K. Gombert, The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential, Appl. Microbiol. Biotechnol. 79 (2008) 339–354. doi:10.1007/s00253-008-1458-6.

[38] C. Kurtzman, Phylogenetic circumscription of , and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera , , , and, FEMS Yeast Res. 4 (2003) 233–245. doi:10.1016/S1567-1356(03)00175-2.

[39] M. Lachance, Yeast communities in a natural tequila fermentation, (1995) 151–160.

[40] D.R. Scannell, G. Butler, K.H. Wolfe, Yeast genome evolution - The origin of the species, Yeast. 24 (2007) 929–942. doi:10.1002/yea.1515.

[41] K.H. Wolfe, D.C. Shields, Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome., Nature. 387 (1997) 708–713. doi:10.1038/42711.

[42] N. Lertwattanasakul, K. Sootsuwan, S. Limtong, P. Thanonkeo, M. Yamada, Comparison of the gene expression patterns of alcohol dehydrogenase isozymes in the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus and their physiological functions., Biosci. Biotechnol. Biochem. 71 (2007) 1170–1182. doi:10.1271/bbb.60622.

[43] C.-L. Flores, C. Rodríguez, T. Petit, C. Gancedo, Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts, FEMS Microbiol. Rev. 24 (2000) 507–529.

[44] A. Merico, P. Sulo, J. Piškur, C. Compagno, Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the Saccharomyces complex, FEBS J. 274 (2007) 976–989. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05645.x.

[45] J. Piškur, E. Rozpedowska, S. Polakova, A. Merico, C. Compagno, How did Saccharomyces evolve to become a good brewer?, Trends Genet. 22 (2006) 183–186. doi:10.1016/j.tig.2006.02.002.

[46] R. Schaffrath, K.D. Breunig, Genetics and molecular physiology of the yeast Kluyveromyces lactis., Fungal Genet. Biol. 30 (2000) 173–190. doi:10.1006/fgbi.2000.1221.

[47] M.C.M. Hensing, R.J. Rouwenhorst, J.J. Heijnen, J.P. van Dijken, J.T. Pronk, Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts, Antonie Van Leeuwenhoek. 67 (1995) 261–279. doi:10.1007/BF00873690.

[48] J. Fiedurek, J. Szczodrak, Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of beta-galactosidase from Kluyveromyces fragilis, Acta Microbiol. Pol. 43 (1994) 57–65. http://europepmc.org/abstract/MED/7526616.

[49] S. Furlan, A.S. Schneider, R. Merkle, M. de Fátima Carvalho-Jonas, R. Jonas, Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of β- D-galactosidase by Kluyveromyces marxianus, Biotechnol. Lett. 22 (2000) 589–593. doi:10.1023/A:1005629127532.

[50] H.M. Sonawat, A. Agrawal, S.M. Dutta, Production of β-galactosidase fromkluyveromyces fragilis grown on whey, Folia Microbiol. (Praha). 26 (1981) 370–376. doi:10.1007/BF02927329.

[51] R.J. Rouwenhorst, L.E. Visser, A.A. Van Der Baan, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken, Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of Kluyveromyces marxianus CBS 6556., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 1131–1137.

[52] A. Cruz-Guerrero, I. Garcia-Peña, E. Barzana, M. Garcia-Garibay, L. Gomez-Ruiz, Kluyveromyces marxianus CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain, J. Ferment. Bioeng. 80 (1995) 159–163. doi:10.1016/0922-338X(95)93212-3.

[53] A. Pessoa Jr, M. Vitolo, Separation of inulinase from Kluyveromyces marxianus using reversed micellar extraction, Biotechnol. Tech. 11 (1997) 421–422. doi:10.1023/A:1018472924041.

[54] A. Castillo Calderon, R. Chamy Maggi, Producción de inulinasa por Levaduras de Kluyveromyces Marxianus, Sci. Agropecu. 1 (2010) 235–245.

[55] A.M.P. Santos, F. Maugeri, Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from Kluyveromyces marxianus, Food Technol. Biotechnol. 45 (2007) 181–186.

[56] I. Muñoz-Gutiérrez, M.E. Rodríguez-Alegría, A. López Munguía, Kinetic behaviour and specificity of β-fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans, Process Biochem. 44 (2009) 891–898. doi:10.1016/j.procbio.2009.04.013.

[57] D.G. Naumoff, beta-fructosidase superfamily: homology with some alpha-L-arabinases and beta-D-xylosidases., Proteins. 42 (2001) 66–76.

[58] S. Golunski, V. Astolfi, N. Carniel, D. De Oliveira, M. Di Luccio, M.A. Mazutti, et al., Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from Kluyveromyces marxianus, Sep. Purif. Technol. 78 (2011) 261–265. doi:10.1016/j.seppur.2011.02.019.

[59] J. Arrizon, S. Morel, A. Gschaedler, P. Monsan, Purification and substrate specificities of a fructanase from Kluyveromyces marxianus isolated from the fermentation process

of Mezcal., Bioresour. Technol. 102 (2011) 3298–3303. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067917.

[60] S.N. Rocha, J. Abrahão-Neto, A.K. Gombert, Physiological diversity within the kluyveromyces marxianus species., Antonie Van Leeuwenhoek. 100 (2011) 619–30. doi:10.1007/s10482-011-9617-7.

[61] N. Lertwattanasakul, N. Rodrussamee, Suprayogi, S. Limtong, P. Thanonkeo, T. Kosaka, et al., Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus DMKU 3-1042., AMB Express. 1 (2011) 20. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3222316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

[62] N. Rodrussamee, N. Lertwattanasakul, K. Hirata, Suprayogi, S. Limtong, T. Kosaka, et al., Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus, Appl. Microbiol. Biotechnol. 90 (2011) 1573–1586. doi:10.1007/s00253-011-3218-2.

[63] J.M. Gancedo, Yeast Carbon Catabolite Repression, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (1998) 334–361. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98918/.

[64] M. García, BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA: , 1993. https://books.google.com.mx/books?id=PUm4AgAAQBAJ.

[65] R.S. Singh, B.S. Sooch, M. Puri, Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated Kluyveromyces marxianus YS-1, Bioresour. Technol. 98 (2007) 2518–2525. doi:10.1016/j.biortech.2006.09.011.

[66] M. M. Al-Dagal and W.A. Bazaraa, Synthesis and properties of extracellular inulinase of Kluyveromyces marxianu sstrains NRRL 2415 and ATCC 8601, Egypt. J. Microbiol. 33 (1998) 525–539.

[67] P. Selvakumar, A. Pandey, Comparative studies on inulinase synthesis by Staphylococcus sp. and Kluyveromyces marxianus in submerged culture, Bioresour. Technol. 69 (1999) 123–127. doi:10.1016/S0960-8524(98)00170-9.

[68] B.O. Yépez Silva-Santisteban, F. Maugeri Filho, Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by Kluyveromyces marxianus, Enzyme Microb. Technol. 36 (2005) 717–724. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.12.008.

[69] T. Urit, M. Li, T. Bley, C. Löser, Growth of Kluyveromyces marxianus and formation of ethyl acetate depending on temperature, Appl. Microbiol. Biotechnol. 97 (2013) 10359–10371. doi:10.1007/s00253-013-5278-y.

[70] G.M. Walker, Metals in Yeast Fermentation Processes, in: B.T.-A. in A. Microbiology (Ed.), Academic Press, 2004: pp. 197–229. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54008-X.

[71] C.. Ough, M. Davenport, K. Joseph, Effects of Certain Vitamins on Growth and Fermentation Rate of Several Commercial Active Dry Wine Yeasts, Am. J. Enol. Vitic. 40 (1989) 208–213.

[72] S.J. Kalil, F. Maugeri-Filho, M.I. Rodrigues, Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracelular inulinase from Kluyveromyces marxianus, Process Biochem. 40 (2005) 581–586. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.034.

[73] P. ANTIER, G. MOULIN, P. GALZY, Influence of composition of the culture medium on the behaviour of Kluyveromyces fragilis in chemostat culture, Process Biochem. 25 (n.d.) 9–13. http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=6847294 (accessed August 4, 2015).

[74] H. Kallel-Mhiri, C. Valance, J.M. Engasser, A. Miclo, Yeast continuous mixed cultures on whey permeate and hydrolysed starch, Process Biochem. 29 (1994) 381–386. doi:10.1016/0032-9592(94)87008-X.

[75] J. Parrondo, L.A. García, M. Díaz, Nutrient balance and metabolic analysis in a kluyveromyces marxianus fermentation with lactose-added whey, Brazilian J. Chem. Eng. 26 (2009) 445–456. doi:10.1590/S0104-66322009000300001.

[76] M. Dinarvand, M. Rezaee, M. Masomian, S.D. Jazayeri, M. Zareian, S. Abbasi, et al., Effect of C/N ratio and media optimization through response surface methodology on simultaneous productions of intra- and extracellular inulinase and invertase from aspergillus Niger ATCC 20611, Biomed Res. Int. 2013 (2013). doi:10.1155/2013/508968.

[77] M.J. Henry-Stanley, R.M. Garni, C.L. Wells, Adaptation of FUN-1 and Calcofluor white stains to assess the ability of viable and nonviable yeast to adhere to and be internalized by cultured mammalian cells, J. Microbiol. Methods. 59 (2004) 289–292. doi:10.1016/j.mimet.2004.07.001.

[78] M.D. Eggleston, P. a. Marshall, Saccharomyces cerevisiae samples stained with FUN-1 dye can be stored at -20??C for later observation, J. Microsc. 225 (2007) 100–103. doi:10.1111/j.1365-2818.2007.01720.x.

[79] H.T. Ren, J.Q. Yuan, K.H. Bellgardt, Macrokinetic model for methylotrophic Pichia pastoris based on stoichiometric balance, J. Biotechnol. 106 (2003) 53–68. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.08.003.

[80] C. Justice, A. Brix, D. Freimark, M. Kraume, P. Pfromm, B. Eichenmueller, et al., Process control in cell culture technology using dielectric spectroscopy, Biotechnol. Adv. 29 (2011) 391–401. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.03.002.

[81] M.J. Torija, N. Rozès, M. Poblet, J.M. Guillamón, A. Mas, Effects of fermentation temperature on the strain population of Saccharomyces cerevisiae, Int. J. Food Microbiol. 80 (2003) 47–53. doi:10.1016/S0168-1605(02)00144-7.

[82] C. Gao, G.H. Fleet, The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, Saccharomyces cerevisiae, Candida stellata and Kloeckera apiculata, J. Appl. Microbiol. 65 (1988) 405–409. doi:10.1111/j.1365-2672.1988.tb01909.x.

[83] B. Schade, G. Jansen, M. Whiteway, K.D. Entian, D.Y. Thomas, Cold adaptation in budding yeast., Mol. Biol. Cell. 15 (2004) 5492–5502. doi:10.1091/mbc.E04-03-0167.

[84] O. Kandror, N. Bretschneider, E. Kreydin, D. Cavalieri, A.L. Goldberg, Yeast Adapt to Near-Freezing Temperatures by STRE/Msn2,4-Dependent Induction of Trehalose Synthesis and Certain Molecular Chaperones, Mol. Cell. 13 (2015) 771–781. doi:10.1016/S1097-2765(04)00148-0.

[85] P. Aleksander, A. Piotr, T. Tadeusz, M. Makarewicz, Accumulation and Release of Metal Ions by Brewer's Yeast During Successive Fermentations, J. Inst. Brew. 115 (2009) 78–83. doi:10.1002/j.2050-0416.2009.tb00347.x.

[86] G.G. Fonseca, A.K. Gombert, E. Heinzle, C. Wittmann, Physiology of the yeast Kluyveromyces marxianus during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source, FEMS Yeast Res. 7 (2007) 422–435. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00192.x.

[87] R.M. Birch, G.M. Walker, Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of Saccharomyces cerevisiae, Enzyme Microb. Technol. 26 (2000) 678–687. doi:10.1016/S0141-0229(00)00159-9.

[88] N.P. Pisat, A. Pandey, C.W. MacDiarmid, MNR2 regulates intracellular magnesium storage in Saccharomyces cerevisiae, Genetics. 183 (2009) 873–884. doi:10.1534/genetics.109.106419.

[89] W.D.-R. Małgorzata Gniewosz, M.Z. Stanisław Błażejak, Joanna Sobiecka, Investigations into magnesium biosorption by waste brewery yeast Saccharomyces uvarum, Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 06 (2007).

[90] S.S. Giles, C.J. Czuprynski, Extracellular calcium and magnesium, but not iron, are needed for optimal growth of Blastomyces dermatitidis yeast form cells in vitro., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11 (2004) 426–429. doi:10.1128/CDLI.11.2.426-429.2004.

[91] H. Simonin, L. Beney, P. Gervais, Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments, Biotechnol. Bioeng. 100 (2008) 325–333. doi:10.1002/bit.21749.

[92] B. Gibson, 125th anniversary review: Improvement of higher gravity brewery fermentation via wort enrichment and supplementation, J. Inst. Brew. 117 (2011) 268–284. doi:10.1002/j.2050-0416.2011.tb00472.x.

[93] D. Soyuduru, M. Ergun, Application of a Statistical Technique to Investigate Calcium , Sodium , and Magnesium Ion Effect in Yeast Fermentation, (2009) 326–333. doi:10.1007/s12010-008-8327-8.

[94] M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, M.G. Fernández, T.D. Brock, C.R. Fernández, et al., Brock biología de los microorganismos, Pearson Educación, 2004. https://books.google.com.mx/books?id=P_nsaCHD1wsC.

[95] N. Rozes, F. Larue, P. Ribereau-Gayon, Effect of a variation of grape must temperature on the fermentative ability and the neutral lipid content ofSaccharomyces cerevisiae, Biotechnol. Lett. 10 (1988) 821–824. doi:10.1007/BF01027580.

[96] Z. Ciesarová, D. Smogrovicová, Z. Dömény, Enhancement of yeast ethanol tolerance by calcium and magnesium., Folia Microbiol. (Praha). 41 (1996) 485–488. doi:10.1007/BF02814663.

[97] A.A. Koutinas, Optimization of Sucrose Ethanol Fermentation for K , Na , Ca , and Cu Metal Contents, 30 (1991) 1–7.

[98] R.S. Singh, R. Dhaliwal, M. Puri, Partial purification and characterization of exoinulinase from Kluyveromyces marxianus YS-1 for preparation of high-fructose syrup., J. Microbiol. Biotechnol. 17 (2007) 733–738.

[99] N.J. Jacques, J.G. Morrey-Jones, G.J. Walker, Inducible and constitutive formation of fructanase in batch and continuous cultures of Streptococcus mutans., J. Gen. Microbiol. 131 (1985) 1625–1633. doi:10.1099/00221287-131-7-1625.

[100] C.D. Powell, S.M. Van Zandycke, D.E. Quain, K.A. Smart, Replicative ageing and senescence in Saccharomyces cerevisiae and the impact on brewing fermentations, Microbiology. 146 (2000) 1023–1034. doi:10832629.

[101] P. Tibayrenc, L. Preziosi-Belloy, J.M. Roger, C. Ghommidh, Assessing yeast viability from cell size measurements?, J. Biotechnol. 149 (2010) 74–80. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.06.019.

[102] a. S. Holmes-Smith, A.C. Hollas, D. McLoskey, G. Hungerford, Viability of Saccharomyces cerevisiae incorporated within silica and polysaccharide hosts monitored

via time-resolved fluorescence, Photochem. Photobiol. Sci. 12 (2013) 2186. doi:10.1039/c3pp50202c.

[103] C. Pina-Vaz, F. Sansonetty, a. G. Rodrigues, J. Martinez-De-Oliveira, a. F. Fonseca, P. a. Mardh, Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against Candida species, J. Med. Microbiol. 49 (2000) 831–840.

[104] V.A. Samoĭlenko, S.B. Petrikevich, [Effect of temperature on Candida utilis morphology and growth rate under limited and unlimited cultivation conditions], Mikrobiologiia. 50 (1981) 873–877. http://europepmc.org/abstract/MED/7198711.

11 ANEXOS

Memorias del XXXV Encuentro Nacional de la AMIDIQ
6 al 9 de mayo de 2014, Puerto Vallarta, Guadalajara, México

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA INDUCCIÓN DE UNA FRUCTANASA CON FRUCTANOS DE AGAVE DE *Kluyveromyces marxianus*

Gema Núñez López [a], Javier Arrizon Gaviño [a], Anne Gschaedler Mathis [a], Lorena Amaya Delgado [a]
[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Avenida Normalistas # 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, México.

Resumen
K. marxianus es capaz de producir enzimas de importancia industrial. Es por ello que en este trabajo se utilizó esta levadura para inducir una fructanasa en un medio mineral con fructanos de agave como fuente de carbono. Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la producción de la fructanasa, obteniéndose la máxima actividad de 2.0 U/ml a 32.5º C. El extracto enzimático producido se caracterizó para determinar el pH y la temperatura óptimos, así como la concentración de sustrato ideal para la hidrólisis y tiempo de reacción.

Introducción
Las aplicaciones biotecnológicas con *K. marxianus* han sido motivadas porque presenta una rápida velocidad de crecimiento, es termotolerante, asimila distintos sustratos, produce etanol y compuestos volátiles, además de secretar enzimas, haciéndola atractiva para la industria [1], esto debido a la diversidad de hábitats de los cuales ha sido aislada [2]como ya se mencionó es una cepa termotolerante, diversos autores han reportado que puede crecer por arriba de los 40º C, aunque el tiempo de duplicación disminuye, lo cual podría ser muy interesante desde el punto de vista industrial ya que reduciría los costos en cuanto a la regulación de la temperatura de los biorreactores durante las fermentaciones a gran escala [3,4].
Como ya se mencionó en el párrafo anterior *K. marxianus* tiene la capacidad de excretar enzimas y ésta es una propiedad también es apreciada a nivel industrial, debido a que hace el más rentable el procesamiento de enzimas de bajo y mediano valor [5]. Una de estas enzimas son las fructanasas, su expresión es inducida por la inulina, sacarosa o fructanos, teniendo la capacidad de hidrolizar polisacáridos como los fructanos, los cuales son carbohidratos de reserva que comprenden entre 1-70 unidades de fructosa, ligado o no a una molécula de sacarosa terminal, pueden presentar una estructura lineal o ramificada con moléculas unidas a través de enlaces ß-2-6 fructosil-fructosa [6].
Las fructansas pueden ser secretada al medio de cultivo o permanecen asociadas a la pared celular [3]. *K. marxianus* ha sido estudiada ampliamente en la producción de fructanasas, destinado a la producción de jarabe de fructosa a partir de inulina [7]. Las fructanasas pertenecen a la familia 32 de las glicosilhidrolasas, en esta familia también se clasifican enzimas que hidrolizan polisacáridos que contienen fructosa, como las inulinasas y exo-inulinasas, así como las enzimas que presentan actividad transglicosilativa [8].
Por otro lado, se han realizado estudios para desarrollar procesos enzimáticos que reduzcan los costos de energía en el proceso de hidrólisis de los fructanos de agave en la industria tequilera [9]; se ha reportado que cepas *K. marxianus* aisladas de fermentaciones tradicionales de agave, son hiperproductoras de fructanasas [10]. De acuerdo con lo reportado la producción de estas enzimas es influenciada por la temperatura y algunos minerales [11]; sin embargo, hasta el

momento no se ha estudiado la influencia de la temperatura sobre la producción de fructanasas en *K. marxianus* utilizando fructanos de agave como inductor.

Metodología

Microorganismo y medios de cultivo

Se utilizó una cepa de levadura de *K. marxianus* de la colección de CIATEJ denominada SLP1, la cual fue aislada del procesamiento del mezcal.

La producción celular del preinoculo fue hecha en matraces de 125 ml con 25 ml de medio YPD (g/l) glucosa 20, extracto de levadura 10 y bactopectona 20, el cual fue incubado a 30ºC por 24 h a 250 rpm, posteriormente se preparó el inoculo en matraces de 250 ml con 50 ml de medio YPD y se incubó por 6 h en las condiciones anteriores. Para la inducción de la enzima fue utilizado un medio mineral con fructanos de agave (50 g/l) como fuente de carbono (g/l) urea 1, K_2HPO_4 3, $MgSO_4$ 2, y (M) $CaCl_2$ 0.002, $MnCl_2$ 0.002. Se inoculó a una concentración de 1^6 cel/ml en 100 ml. Se realizó una cinética (48 h) para evaluar el efecto de la temperatura sobre la producción de la enzima variándola en tres niveles (20, 32.5 y 45º C) a 250 rpm.

Zimograma

Para corroborar la presencia de la enzima se realizó un Zimograma en condiciones nativas utilizando sacarosa como sustrato. Se realizó un cultivo en medio mineral por 24h para obtener el extracto enzimático en las mismas condiciones para la inducción de la fructanasa.

Determinación de actividad fructanasa

Se utilizó un ensayo indirecto en donde los productos de reacción son detectados espectrofotométricamente tras su conversión en derivados coloreados. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con fructosa. Primero se colocó en tubo de 1.5 ml 50 µl del sustrato (buffer acetatos pH 5.5 con fructanos de agave), posteriormente se añadieron 50 µl del extracto enzimático previamente diluido (si fuera necesario), después homogenizó la mezcla para ser incubarla por 15 minutos a 50°C, una vez terminada la incubación se agregaron 200 µl del reactivo DNS y se le agregaron 50 µl de extracto enzimático al blanco para posteriormente seguir la metodología para cuantificar azúcares reductores por la técnica de Miller.

Caracterización del extracto enzimático

Para la caracterización del extracto enzimático se realizó la inducción con fructanos de agave como fuente de carbono en medio mineral a 30º C y 250 rpm, determinando la actividad fructanasa utilizando fructanos de agave como sustrato, primero se verifico el tiempo óptimo de reacción que fue de 15 a 30 minutos, después el pH óptimo variándolo de 4.5 a 7, así como también la temperatura (35 a 60º C) y concentración de sustrato óptimo, que varió de 0.20 a 1.20%.

Resultados

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la inducción de una fructanasa de *Kluyveromyces marxianus* utilizando fructanos de agave como inductor, para corroborar que la enzima fuese secretada por la levadura se realizó un Zimograma, el gel se muestra en la Figura 1, en el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, en el segundo observamos la banda que muestra la presencia de la enzima.

La mayoría de los ensayos de cuantificación de actividad fructanasa se realizan utilizando sacarosa como sustrato es decir, para que sea hidrolizada por la enzima excretada, en este trabajo se utilizaron los fructanos de agave tanto como inductor de la enzima como sustrato.

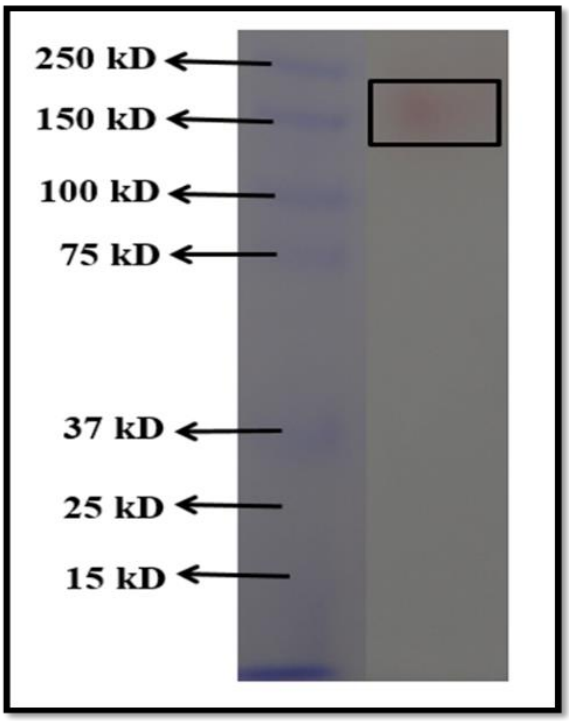

Figura 1. Zimograma

Para la caracterización del extracto enzimático se cuantificó la actividad fructanasa, de acuerdo a lo reportado [11, 12]el óptimo de temperatura se encuentra a los 50º C lo cual difiere un poco de lo obtenido en este trabajo, ya que como se muestra en la Figura 2, el óptimo de temperatura se presenta a los 45º C; para el caso del pH observamos que la actividad enzimática se mantiene constante alrededor de 1 a 1.2 U/ml en los pH probados, estos resultados son similares a los que reporta Arrizon et *al*., [11]. El tiempo óptimo de reacción fue de 15 minutos y la concentración de sustrato fue de 1%.

Hasta el momento no se tienen reportes de producción de fructanasas a 20º C, la mayoría de los estudios se han enfocado a evaluar el efecto de cultivar ésta cepa a temperaturas elevadas, debido a su capacidad termotolerante, además de que se han utilizado inulina o sacarosa como inductor, y no fructanos de agave. En la Figura 3 se observan las cinéticas de actividad enzimática con respecto al tiempo, observándose que la actividad máxima para las tres temperaturas probadas se presenta a las 36 h del cultivo.

.

Podemos observar que 20° C la actividad fructanasa alcanza 1 U/ml como máximo, a las 36 h como ya se mencionó con anterioridad y durante toda la cinética se mantuvo por debajo de 0.5 U/ml, ello puede ser debido a que a esta temperatura el crecimiento de la población celular fue menor que en las otras dos temperaturas evaluadas (30 y 45° C), alrededor de los $250x10^6$ cel/ml (datos no mostrados).

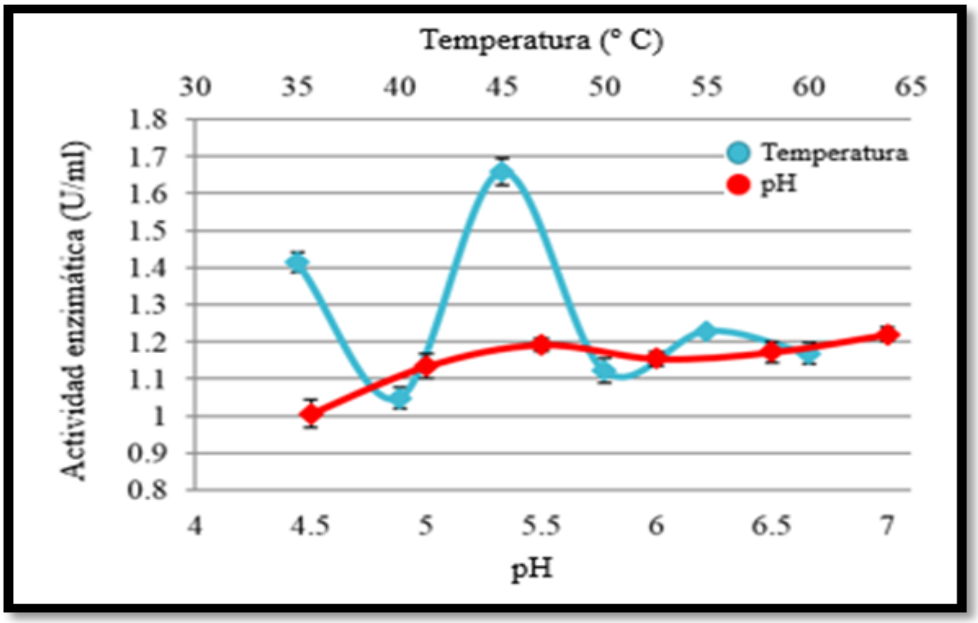

Figura 2. Caracterización del extracto enzimático (temperatura y pH óptimos)

En el 2011 Rocha et *al.* realizaron un cribado de cepas de *K. marxianus*, reportando una actividad máxima de 1.2 U/ml a 30º C, la cual incrementó al elevar la temperatura 7º, resultados que difieren de lo obtenido en esta investigación, ya que como se observa en la Figura 3 el máximo de actividad se obtuvo a 32.5º C y al aumentar la temperatura a 45º C disminuyó la actividad enzimática, aunque lo reportado por otros autores es que la actividad enzimática puede verse favorecida cuando se cultiva cerca de su óptimo de temperatura, que es entre 37º y 42º C [12].

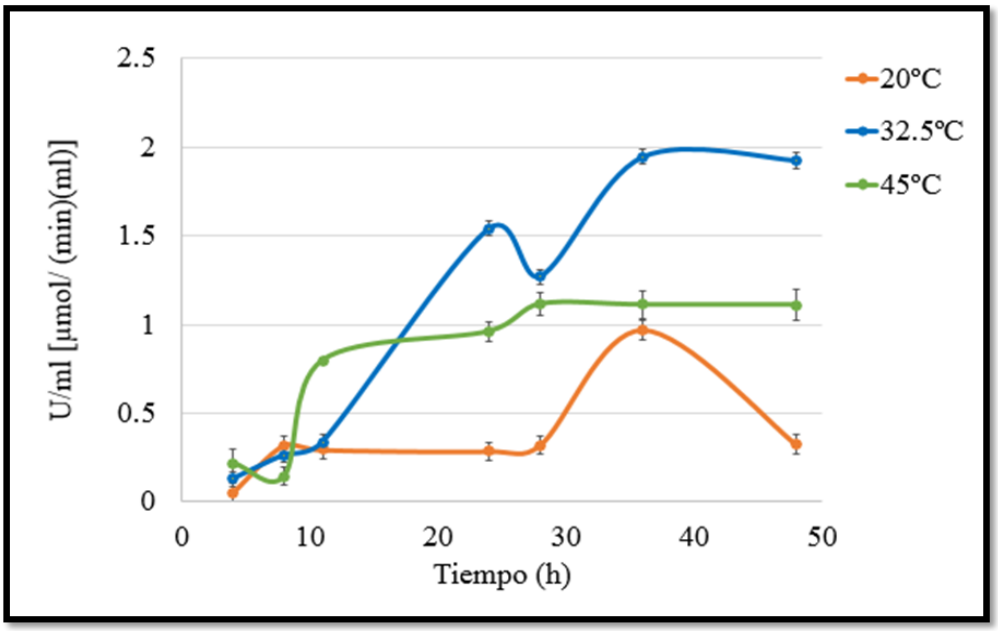

Figura 3. Cinéticas del efecto de la temperatura sobre la actividad fructanasa

En este trabajo el máximo crecimiento celular se obtuvo a 32.5º C, que fue de $380x10^6$ cel/ml; así como el de actividad, ésta podría considerarse su temperatura óptima de cultivo. Sin embargo, se evaluarán otras temperaturas para verificar este resultado.

Conclusiones

Con el Zimograma se corroboró que *K. marxianus* produce una fructanasa. La producción de la enzima se vio afectada por efecto de la temperatura.

Referencias

1. Lane, M. M., J. P. Morrisey., "*Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow", *Fungal Biology review*, Vol. 100, p. 507-519, (2010).
2. Fonseca, G. G., E. Heinzle, C. Wittmann, A. K. Gombert., "The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential". *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 79, p. 339-354, (2008).
3. Rouwenhorst R. J., Visser L. E., Van Der Baan A. A., Scheffers W. A., Van Dijken J. P., "Production, distribution, kinetic properties of inulinase in continuous cultures of Kluyveromycesmarxianus CBS 6556", *Appl Environ Microbiol*, Vol. 54(5), p. 1131–1137, (1988).
4. Hensing M. C., Rouwenhorst R. J., Heijnen J. J., van Dijken J. P., Pronk J. T., "Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts", *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 67(3), p. 261–279, (1995).
5. Hensing M., Vrouwenvelder H., Hellinga C., Baartmans R., van Dijken J. P., "Production of extracellular inulinase in high-celldensity fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus", Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 42, p. 516–521, (1994).
6. Carabin, I. G., & Flamm, W. G., "Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber", *Regulatory Toxicology Pharmacology*, Vol. 30, p. 268–282, (1999).
7. Cruz-Guerrero, A.E., Olvera, J.L., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., "Inulinase-hyperproducing strains of Kluyveromyces sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque", *World J. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 22, p. 115–117, (2006).
8. Koshland, J. R., S. S. Stein., "*Correlation of bond breaking with enzyme specificity; cleavage point of invertase", Journal Biol Chem*, Vol. 208(1), p. 139-48, (1954).
9. Waleckx, E., et *al*., "Hydrolysis of fructans from Agave tequilana Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process", *Food Chem*, Vol. 108, p. 40–48, (2008).
10. Singh, P., Gill, P.K., "Production of inulinases: recent advances". *Food Technol. Biotechnol*. Vol. 44, p. 151–162, (2006).
11. Arrizon, J., et *al*., "Purification and substrate specificities of a fructanase from Kluyveromyces marxianus isolated from the fermentation process of Mezcal", *Bioresour Technol*. Vol. 102, p. 3298–3303, (2011).
12. Rocha, S. N., J. Abrahäo-Neto, A. K. Gombert., "Physiological diversity within the Kluyveromyces marxianus species", *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 100, p. 619-630, (2011).

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA INDUCCIÓN DE UNA FRUCTANASA CON FRUCTANOS DE AGAVE DE *Kluyveromyces marxianus*

Gema Núñez López [a], Javier Arrizon Gaviño [a], Anne Gschaedler Mathis [a], Lorena Amaya Delgado [a]
[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Biotecnología Industrial.
Avenida Normalistas # 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, México. e-mail: lamaya@ciatej.mx

Resumen: *Kluyveromyces marxianus* es capaz de producir enzimas de importancia industrial. Es por ello que en este trabajo se utilizó esta levadura para inducir una fructanasa en un medio mineral con fructanos de agave como fuente de carbono. Se caracterizó el extracto enzimático para determinar el pH y la temperatura óptimos, así como la concentración de sustrato ideal para la hidrólisis y tiempo de reacción. Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la producción de la fructanasa, obteniéndose la máxima actividad de 2.0 U/ml a 32.5 °C.

INTRODUCCIÓN

K. marxianus presenta una rápida velocidad de crecimiento, es termotolerante, asimila distintos sustratos, produce etanol y compuestos volátiles, además de secretar enzimas [1]. Una de estas enzimas son las fructanasas. La expresión de las fructanasas es inducida por la inulina, sacarosa o fructanos; se ha reportado que cepas *K. marxianus* aisladas de fermentaciones tradicionales de agave son hiperproductoras de estas enzimas [2]. Estas enzimas son influenciadas por la temperatura y algunos minerales para su producción [3]. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la influencia de la temperatura sobre la producción de fructanasas en *K. marxianus* utilizando fructanos de agave como inductor.

METODOLOGÍA

Se realizó un cultivo en medio mineral a 30 °C por 24 h para la obtención del extracto enzimático. Un zimograma se realizó en condiciones nativas, para corroborar la presencia de la enzima. El extracto enzimático se caracterizó cuantificando la actividad de la enzima verificando el tiempo de reacción, pH, temperatura y concentración de sustrato óptimos. Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la producción de la enzima variándola en tres niveles (20, 32.5 y 45 °C) cuantificando la población celular y la actividad enzimática.

RESULTADOS

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la inducción de una fructanasa de *Kluyveromyces marxianus* utilizando fructanos de agave como inductor. En la Figura 1 se observa que la actividad máxima se presenta a las 36 h del cultivo. En el cultivo a 20° C se obtuvo 1 U/ml como máximo de actividad fructanasa y durante toda la cinética se mantuvo por debajo de 0.5 U/ml , esto se puede deber a que a esta temperatura la población celular fue menor que 32.5 y 45° C, alrededor de $250x10^6$ cel/ml (datos no mostrados). El máximo de actividad enzimática (1.94 U/ml) y población celular ($380x10^6$ cel/ml) se obtuvo a 32.5 °C, ésta podría considerarse su temperatura óptima de cultivo, ya que se ha reportado que la actividad enzimática puede verse favorecida cuando se cultiva cerca de su óptimo de temperatura [4]. Sin embargo, se evaluarán otras temperaturas para verificar este resultado.

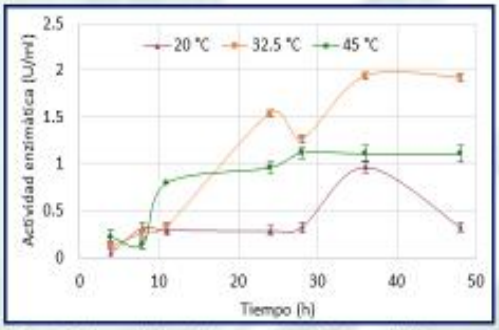

Figura 1 Cinéticas del efecto de la temperatura sobre la actividad fructanasa

Durante la caracterización del extracto enzimático se encontró que la temperatura óptima de reacción fue de 45 °C (Figura 2), estos resultados difieren de lo reportado por diversos autores (50-55 °C). Se puede observar que la actividad fructanasa se mantiene constante (1.2 U/ml) en el rango de pH estudiado. El tiempo óptimo de reacción encontrado fue de 15 minutos y la concentración de sustrato optimo para la reacción fue de 1%.

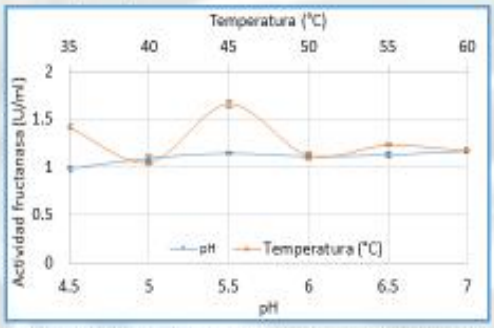

Figura 2. Caracterización del extracto enzimático (temperatura y pH óptimos)

CONCLUSIONES

La caracterización del extracto enzimático permitió conocer los parámetros óptimos para llevar a cabo la hidrólisis enzimática. Se observó que la temperatura de cultivo afecta la actividad enzimática.

Agradecimientos: Esta investigación fue financiada por el proyecto "Espectroscopia para la evaluación y el control en tiempo real del estado fisiológico de células biológicas (SPECTRE)" convocatoria conjunta ANR-CONACYT 162712.

Referencias

1. Lane, M. M., J. P. Morrisey., "*Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow", *Fungal Biology review*, Vol. 100, p. 507-519, (2010).
2. Rouwenhorst R. J., Visser L. E., Van Der Baan A. A., Scheffers W. A., Van Dijken J. P., "Production, distribution, kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556", *Appl Environ Microbiol*, Vol. 54(5), p. 1131–1137, (1988).
3. Hensing M. C., Rouwenhorst R. J., Heijnen J. J., van Dijken J. P., Pronk J. T., "Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts", *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 67(3), p. 261–279, (1995).
4. Rocha, S. N., J. Abrahão-Neto, A. K. Gombert., "Physiological diversity within the Kluyveromyces marxianus species", *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 100, p. 619-630, (2011).