

XIII Simposium Taller Nacional y VI Internacional

Producción y Aprovechamiento de Nopal y Maguey



MEMORIAS



Jueves 9 y Viernes 10 de Octubre 2014

"Desarrollo y bienestar sustentable a través del nopal y maguey"



Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica



PRESENTACIÓN

La Universidad Autónoma de de Nuevo León, a través de la Facultad de Agronomía, así como la Subdirección de Posgrado e Investigación de la misma, se complace en invitarlos al "**XIII Simposium Taller Nacional y VI Internacional sobre Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey**". En el transcurso de estos simposios, se han beneficiado los productores que participan en los **Talleres**; por los conocimientos que adquieren sobre cultivares de nopal verdura, forrajeros y tuneros. La transferencia de técnicas como columna vertebral de este simposium nos ha permitido mejorar las prácticas de manejo del nopal y maguey, así como el desarrollo de nuevos productos y subproductos, los cuales incrementan día a día su aceptación para condiciones adversas.

Por otra parte, el nopal y maguey están dando excelentes resultados en la conservación y reforestación de suelos degradados, y como forraje han sido un sustento extraordinario para el ganado y fauna silvestre de las zonas áridas y semi-áridas. De acuerdo a lo antes mencionado, en este XIII y VI Simposium Nacional e Internacional, respectivamente, se analizarán las formas más eficientes para su manejo y explotación, destacando las bondades del nopal en la producción de bioenergéticos.

Considerando la relevancia de esta temática, la Universidad Autónoma de Nuevo León y su Facultad de Agronomía, en coordinación con la Universidad Autónoma Chapingo, el Colegio de Postgraduados (Campus, San Luis Potosí), el INIFAP (Campo Experimental de Zacatecas), SAGARPA, CONAZA, Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, Fundación Produce de Nuevo León, A. C. y la Corporación para el Desarrollo Agropecuario del Estado de Nuevo León, se complacen en respaldar el desarrollo de este evento y a la vez invitar a productores, técnicos, estudiantes y público en general. El Simposium se realizará en las instalaciones de la Facultad de Agronomía ubicada en la Ex hacienda el Canadá, en el municipio de Escobedo, N.L. del 9 al 10 de Octubre de 2014.

OBJETIVOS GENERALES

1. *Dar a conocer los avances existentes en el manejo, producción y utilización del nopal y maguey.*
2. *Capacitar a productores y técnicos en el uso eficiente del nopal y maguey para la conservación de suelos de zonas áridas.*
3. *Capacitar a productores en el manejo y transformación de productos y subproductos del nopal.*

Ph. D. Rigoberto Vázquez Alvarado

Coordinador General

9-10 Octubre 2014

EXTRACCIÓN Y OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE SAPONINAS A PARTIR DE HOJAS DE LOS *Agaves salmiana* Y *tequilana weber* DE ZACATECAS

Ortiz-Torres D.L.¹; M. Galván-Valencia³; L. Delgadillo-Ruiz²; J. Huerta-García², F. Cabral-Arellano²; R. Bañuelos-Valenzuela¹; E.L. Esparza-Ibarra^{2*}.

¹Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Carr. Panamericana Zacatecas-Fresnillo Km. 31.5, Calera de Victor Rosales, Zacatecas, CP. 98500. Tel. (478) 985 12 55. **MÉXICO.**

²Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Calzada Solidaridad esq. Paseo la Bufa S/N, Zacatecas, Zac. CP. 98060. Tel. (492) 921-1326. **MÉXICO.**

³Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Carr. Zacatecas-Guadalajara Km. 6, Ejido la Escondida CP. 98160. **MÉXICO.**

*E-mail: edgarzac@gmail.com

Resumen

El clima del estado de Zacatecas en su mayoría semiárido, no es apto para el cultivo de muchas especies de plantas. El agave o maguey es un género que resiste a condiciones extremas de temperatura y sequías, siendo una planta que tiene varios usos, tales como la obtención de bebidas, alimentos, productos industriales de tipo textil y mineral, además de productos con aplicaciones medicinales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las hojas o pencas del agave, que se generan como un residuo de la agroindustria del mezcal; así como la obtención de compuestos de interés industrial como las saponinas. Para ello se realizó una caracterización por microscópica óptica y electrónica de las fibras de las hojas de *Agave salmiana* y *Agave tequilana weber*, que se localizan en el sureste y sur del estado donde se produce el mezcal. Además se realizó un análisis bromatológico y una evaluación del contenido químico por microscopia de infrarrojo. La obtención de saponinas se hizo en extractos de hojas frescas y extractos alcohólicos de cada Agave. El análisis bromatológico de las hojas mostro un alto contenido en fibra cruda pero bajo en grasa y proteína. De las hojas frescas se obtuvieron extractos que se purificaron por cromatografía en columna y se analizaron por cromatografía en capa fina (CCD) para evaluar saponinas. Los resultados de este estudio contribuyen a la caracterización de los productos de desecho del procesamiento de los agaves con la finalidad de proponer posibles aplicaciones.

Palabras clave: Cromatografía, maguey y saponinas.

SAPONIN FRACTIONS EXTRATED AND OBTAINED FROM LEAVES OF THE *Agave salmiana* AND *tequilana weber* OF ZACATECAS

Abstract

The climate of the state of Zacatecas mostly semiarid, is not suitable for growing many species of plants. The agave or maguey is a gender that resists extreme temperatures and drought, with a plant that has many uses, such as obtaining drinks, food, industrial products and textile-like mineral, as well as products for medicinal applications. The aim of this study was to characterize the leaves of the agave, which are generated as a residue of agribusiness mezcal; and the preparation of compounds of industrial interest such as saponins. This characterization by light and electron microscopic of fibers leaves of *Agave salmiana* and *Agave tequilana weber*, that are located in the southeast and south of the state where the mezcal produced was performed. In addition, a proximal analysis and assessment of the chemical content by infrared microscopy was performed. Obtaining saponins in extracts

made from fresh leaves and alcoholic extracts of each Agave. The compositional analysis of the leaves showed a high content of crude fiber but low in fat and protein. Extracts from fresh leaves which were purified by column chromatography and analyzed by thin layer chromatography (CCD) were obtained to evaluate saponins. The results of this study contribute to the characterization of the waste products from the processing of agaves in order to propose possible applications.

Key words: Chromatography, maguey and saponinins.

Introducción

El estado de Zacatecas, corresponde el 3.8% del territorio Mexicano. En el estado predominan tres ambientes climáticos: el subtropical árido semicálido que representan 15.8% de la superficie estatal, el subtropical árido templado que ocupan 58.7% y el subtropical semiárido templado con el 17.5%, aun así el clima y el suelo son muy variados, la temperatura media anual va desde 10°C en las sierras, hasta más de 20°C en las partes bajas del estado y los suelos son muy variables en pendiente, profundidad, textura, salinidad, etc. (INIFAP, 2003).

En Zacatecas, el cultivo de *Agave tequilana weber* (maguey azul) y *Agave salmiana* ssp. *crassispina* (maguey verde) para la producción de mezcal se concentra en las regiones del sur y sureste del estado, siendo también importantes para el suelo por la retención de agua, que se producen típicamente en suelos poco profundos con bajo contenido de materia orgánica. A partir del otorgamiento de la denominación de origen del mezcal, esta actividad ha crecido y con ello la generación de residuos, por lo que es importante valorar su posible aprovechamiento (Martínez *et al.*, 2012).

El Agave es un género resistente al tipo de clima predominante en el estado, éste pertenece a la familia de las *Agavaceae* y cuenta con más de 300 especies (He-Shui *et al.*, 2011; Peng, 2006; GELA, 2013), la gran mayoría endémicas de México con usos comestibles, medicinales, religiosos, textiles, ornamentales y en la construcción. Es una planta que crece en condiciones climáticas adversas, son plantas que no requieren riego o cuidados específicos, se multiplican por brotes basales (hijuelos) que crecen alrededor de la planta madre o por semillas a 20 °C en el comienzo de la primavera (Rivera *et al.*, 2010). Son plantas desérticas en forma de roseta, pertenecen a la familia de las monocotiledóneas y son plantas monocarpicas que se caracterizan por tener hojas espinosas y alto contenido en fibra (Ben-Hamissa, 2013; Rodriguez-Garay, 2009). Algunas de las especies de agave son

económica y socialmente importante en el centro y norte de México, pero sus poblaciones han sido severamente sobre-utilizadas (Martínez *et al.*, 2012).

En la actualidad el mayor interés económico de esta planta reside en la producción de bebidas alcohólicas como el pulque, el tequila y el mezcal. A partir de estos procesos se generan gran cantidad de subproductos y desechos que pueden ser aprovechables como las fibras de las hojas (pencas) y el tallo (piñas), en el caso del residuo del bagazo de agave, estos son residuos de lignocelulosa que se acumulan durante la fermentación, que contienen el 43% de celulosa, 19% de hemicelulosa y 15% de lignina (w/w). Los subproductos generados de la actividad mezcalera los cuales contienen azúcares complejos, son útiles como sustratos para la producción de enzimas de importancia biotecnológica (inulinasas, xilanasas, pectinasas y celulasas) Huitron *et al.*, 2008; Caspeta, 2014), en la conversión de biomasa en azúcares fermentables, combustibles, tratamiento de residuos y para la obtención de otros tipos de bebidas alcohólicas, saborizantes, endulzantes y probióticos naturales; el oxalato de calcio que se ha propuesto como fuente renovable de carbonato de calcio para la industria del cemento, vidrio y acero; entre otros. En la industria del mezcal, el primer residuo generado son las pencas que corresponden al 14% del peso del agave siendo su degradación extremadamente lenta, pero que por su contenido de azúcares, fibras, minerales y metabolitos secundarios pudieran ser de utilidad (Narváez y Sánchez, 2009). Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios, ya sea como parte del crecimiento y desarrollo normal o en respuesta al ataque de patógenos, no son necesarios para el crecimiento, la reproducción o supervivencia de la planta, sin embargo, pueden ser importantes en conferir ventajas selectivas, por ejemplo, suprimir el crecimiento de las plantas vecinas o mediante la protección contra las plagas, patógenos y estrés, también representan un gran recurso de moléculas complejas que son valorados y aprovechados por el hombre para usos farmacológicos.

Entre los metabolitos secundarios del agave, de particular importancia son las saponinas, glicósidos anfipáticos con esqueletos de triterpenos (aglicona con base de C₃₀) o esteroides (aglicona de C₂₇) cuya diversidad estructural se relaciona con su amplia gama de efectos biológicos, su composición pueden variar notablemente en función de los antecedentes genéticos del material de la planta, el tipo de tejido, la edad y el estado fisiológico de los factores vegetales y ambientales. Además las saponinas son una fuente accesible de

sapogeninas, compuestos base para la síntesis de esteroides de importancia terapéutica. Las aplicaciones de las saponinas son variadas, pues también se utilizan en la industria de bebidas, alimentos y cosméticos como agentes espumantes, modificadores del sabor y como conservadores, en la industria farmacéutica por tener efectos anti inflamatorios, anti fúngicos y por tener efecto anti tumoral (Haralampidis *et al.*, 2002; Sedeghi *et al.*, 2013; Yoong-Cheok *et al.*, 2014).

Se ha encontrado que en la familia *agavaceae* es una fuente rica en saponinas de tipo esteroidal, espirostanol y furostanol, estos compuestos al ser estructuras complejas; su extracción, purificación e identificación, resulta ser un reto metodológico, por lo que se requiere el uso de técnicas cromatográficas y espectrofotométricas, como Cromatografía en Columna (CC), Cromatografía en capa delgada (CCD), espectroscopia de infrarrojo (IR), y resonancia magnética nuclear protónica y de carbono (RMN ^1H y ^{13}C), así como también la utilización de técnicas de cromatografía de alta resolución (HPLC) (Eskander *et al.*, 2010; Yokosuka and Mimaki, 2009; He-Shui *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2006).

Metodología

Descripción de las muestras

Se utilizaron pencas de *Agave* de las especies *salmiana* y *tequilana weber* que se recolectaron en las fechas de septiembre 2012 a marzo del 2013. Las muestras provienen de las mezcaleras situadas en los municipios de Pinos, Zacatecas (sureste del estado) ubicada a N: 22° 23' 968" de latitud norte y 101° 18' 786" de longitud oeste con una altitud de 2408 msnm y en el Teúl de González Ortega, Zacatecas (región sur del estado) sus coordenadas geográficas, son: 21° 19' 566" de latitud norte y 103° 48' 749" de longitud oeste, a una altura de 1900 msnm. A partir de las características macro morfológicas de las hojas se llevó a cabo la identificación de ambas especies de agave.

Caracterización micro estructural del bagazo de *Agave salmiana* y *tequilana weber*

La caracterización se realizó por medio de microscopia óptica, espectroscopia en el Infrarrojo (FTIR) y microscopia electrónica de barrido (SEM).

Las fibras fueron observadas por medio de un microscopio óptico marca Cari Zeiss modelo Axio Scope a distintos aumentos (20000 aumentos), observando la morfología de las fibras y

el diámetro de cada una de ellas. La espectroscopia de infrarrojo (FTIR), se llevó a cabo en un espectrofotómetro marca Bruker modelo IR VERTEX 70/70v FT-IR, la cual es una técnica instrumental utilizada para obtener información de los compuestos de las fibras que permitió identificar los grupos funcionales y la estructura de las moléculas presentes en las fibras. La microscopia electrónica de barrido (SEM) se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido marca Joel, donde se depositaron las muestras junto con Oro (Au) en el portaobjetos, la adición de este metal fue para que la muestra se volviera conductora, esta técnica ayudó a ampliar la superficie apreciando con mayor facilidad la textura, simultáneamente dio información del contenido porcentual de los elementos identificados en la fibra analizada.

Obtención de extractos crudos a partir de muestras recolectadas de las hojas de *Agave tequilana* Weber y *Agave salmiana*

Las hojas frescas de los agaves fueron pesados, lavaron y se les retiraron las espigas; posteriormente se trocearon y secaron al aire durante un mes para posteriormente pasarlas a una estufa (Boekel Scientific, Modelo-131400) a temperatura entre 50-60 °C por un mes aproximadamente. Una vez deshidratada las muestras fueron molidas mecánicamente (Thomas-Wiley, Thomas Scientific USA, Laboratory Mill Model 4) hasta un tamaño de partícula que pasara una malla de poro ½ mm. Los polvos se maceraron durante dos semanas en metanol absoluto, manteniendo agitación constante y atmósfera libre de oxígeno. El sobrenadante fue filtrado y concentrado a presión reducida (Rotavapor Büchi R-3000), después se realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano (marca Prolabo para HPLC No. de serie 1593) y la fracción hidrosoluble se liofilizó (Labconco, Freezone) para su conservación y cálculos de los rendimientos.

Adicionalmente se preparó un segundo extracto que consistió en el jugo de pencas frescas que se obtuvo con un extractor comercial de jugos (Lyclone, Turmix). El jugo fue varias veces filtrado y centrifugado para eliminar los sólidos suspendidos. Finalmente se liofilizó, al polvo se le realizó una extracción líquido-líquido con petróleo ligero (éter de petróleo marca Caledon, grado de pureza reactivo, código 8100-1) para eliminación de grasas presentes, se filtró dejando completamente seco el polvo para su conservación.

Análisis bromatológico de hojas frescas y extracto alcohólico

El análisis bromatológico consistió en la determinación del porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas, porcentaje de extracto etéreo, porcentaje de fibra y porcentaje de proteínas, de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-F-83-1986, NMX-F66S-1978, NMX-F089S-1978, NOM-F-1980, NOM-F90-S-1978); y la determinación de azúcares reductores se realizó por el método del DNS.

Separación y purificación de fracciones enriquecidas en saponinas por cromatografía en columna

Los compuestos de interés son las saponinas, las cuales según la literatura la resina recomendada y utilizada fue Diaion HP20 (No. De partícula 250 µm) donde su fase móvil fue una serie de solventes de polaridad decreciente: H₂O > MeOH-H₂O (50:50, 75,25) > MeOH las distintas fracciones obtenidas se monitorearon por cromatografía en capa delgada. El monitoreo de las diferentes fracciones obtenidas fueron eluidas con una mezcla de solventes (1-Butanol-EtOH-NH₃ (7:2:5), mostrando la separación de los compuestos de acuerdo a su polaridad. Estas placas fueron reveladas con anisaldehído, reactivo específico para saponinas esteroidales dando una coloración azul o violeta al calentar la placa a 100 °C.

Con la intención de contar con sub fracciones más puras y en función de su mayor actividad o contenido de saponinas, las fracciones de interés nuevamente fueron separadas por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria sílica gel octadecil funcionalizado de C18 (Sigma-Aldrich código S4521-25G), y fase móvil MeOH-H₂O (40:60 y 50:50), MeOH (Eskander *et al.*, 2010; Yokosuka and Mimaki, 2009).

Evaluación de la actividad hemolítica de los extractos

Para asegurar la presencia de saponinas en las muestras de trabajo, se realizó una evaluación en la actividad hemolítica con las fracciones, para la cual se recolectó sangre de bovinos en tubos heparinizados, estos fueron centrifugados a 2300 revoluciones por 5 min y lavados con solución de PBS (solución buffer de fosfatos) a pH 7, con los eritrocitos se hizo una solución al 3% v/v, en la cual fueron sumergidas placas cargadas con fracciones donde se sospechó que habría presencia de saponinas (Sharm *et al.*, 2013).

Resultados y Discusión

Descripción de las muestras

Las muestras con las que se trabajó tienen diferencia en sus características morfológicas (Figura 1), se encontraron diferencias en sus características morfológicas para cada Agave, las hojas del Agave *salmiana* son lanceoladas, midieron en promedio 60 cm de largo, sus espinas eran subuladas, el color iba del verde a un color grisáceo. Las hojas del Agave *tequilana weber* fueron de igual manera lanceoladas, con 80 cm de largo con espina apical, ganchudas y numerosas, presentando un color azul. La descripción de estos agaves corresponde a la ya descrita por otros autores (Rodríguez *et al.*, 2009; GELA, 2013).



Figura 1. Hojas del Agave *salmiana* (izquierda) y hojas del Agave *tequilana weber* usados.

Caracterización micro estructural del bagazo de Agave *salmiana* y *tequilana weber*

En la especie de agave *salmiana* las fibras tienen un diámetro que va desde 269 μm hasta 680 μm , en el caso de la especie *tequilana weber* los diámetros de las fibras van desde 164 μm hasta 363 μm (Figura 2). Los espectros de absorción en IR (Figura 3) de todas las muestras estudiadas revelan la presencia de bandas características a la estructura del carbonato de calcio, mediante el microscopio electrónico de barrido se muestra el tipo de fibra (Figura 4) y el porcentaje de peso de los elementos para el Agave *salmiana* fue de Carbono con el 42%, Oxígeno 46% y 11% para el Calcio, en cuanto al Agave *tequilana* tenemos que fue menor el porcentaje para cada uno de los elementos teniendo 34, 36 y 28 % de Carbono, Oxígeno y Calcio respectivamente.

Análisis bromatológico de hojas frescas y extracto alcohólico

En el Cuadro 1 y 2 se muestran los rendimientos observando que obtenemos mayor concentración en menor tiempo.

En el análisis bromatológico (Cuadro 3) se observa que el porcentaje (%) de cenizas, fibra y extracto etéreo no varía significativamente entre las dos especies de agave, ni en el tratamiento; mientras que el porcentaje de proteína es mayor en el caso del agave *salmiana* tanto de las pencas frescas como del extracto, pero aun así no es suficiente para su uso como consumo animal, lo cual es recomendable hacer mezclas mediante la adición de otro tipo de granos o forrajes de mayor contenido proteico, cabe resaltar que hay un contenido alto de azúcares reductores en las pencas y en los extractos.

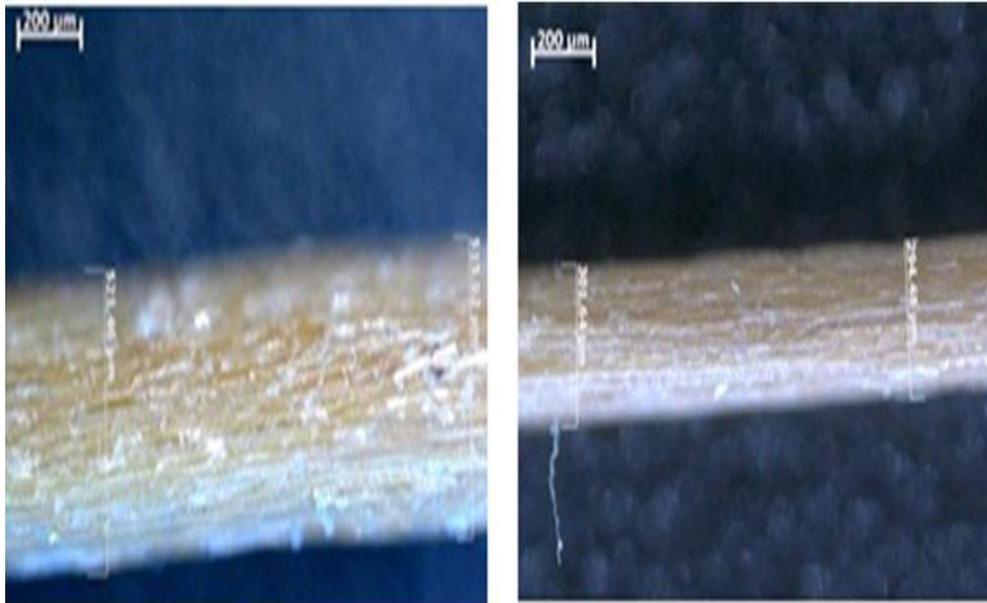


Figura 2. Micrografías tomadas con microscopio óptico de las fibras del bagazo de los *Agaves salmiana* (izquierda) y *tequilana weber* (derecha). Vistas a 5x, como referencia las barras indican 200 µm.

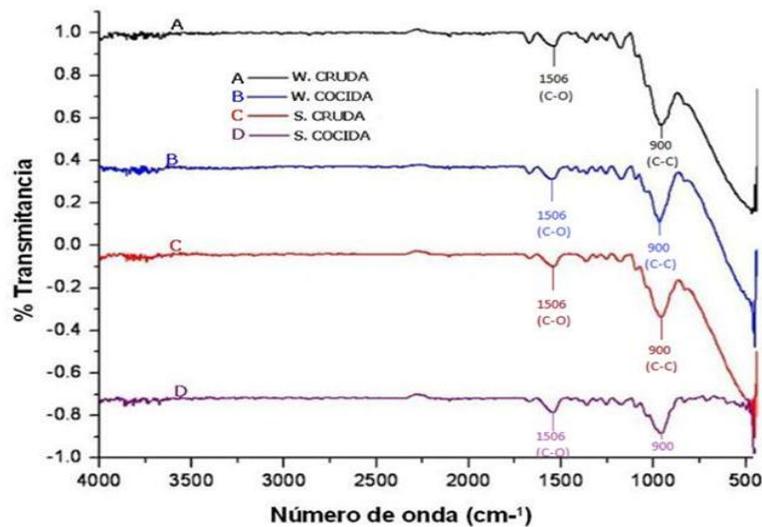


Figura 3. Espectro de absorción de IR de las fibras de bagazo de *IA. salmiana* y *tequilana* en fresco (A y C) y cocida (B y D).

Separación y purificación de fracciones enriquecidas en saponinas por cromatografía en columna

Para la separación de fracciones por medio de cromatografía en columna se adicionaron las muestras liofilizadas disueltas en agua por separado obteniendo diferentes fracciones con diferentes patrones cada una de ellas mostradas en el Cuadro 4, teniendo un rastro distintivo antes de que se metiera a la columna el cual se muestra en la Figura 5, del lado derecho el *Agave salmiana* y del lado izquierdo el *Agave tequilana*.

Cuadro .1. Porcentajes y rendimientos en el macerado en metanol. (E.1).

Muestra	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)	Sólidos disueltos en metanol (g)	Rendimiento de sólidos (%)
A. <i>salmiana</i>	4,711.2	189.5	95.97	5.6367	2.97
A. <i>tequilana</i>	3,224.7	155.4	95.2	2.4378	1.6

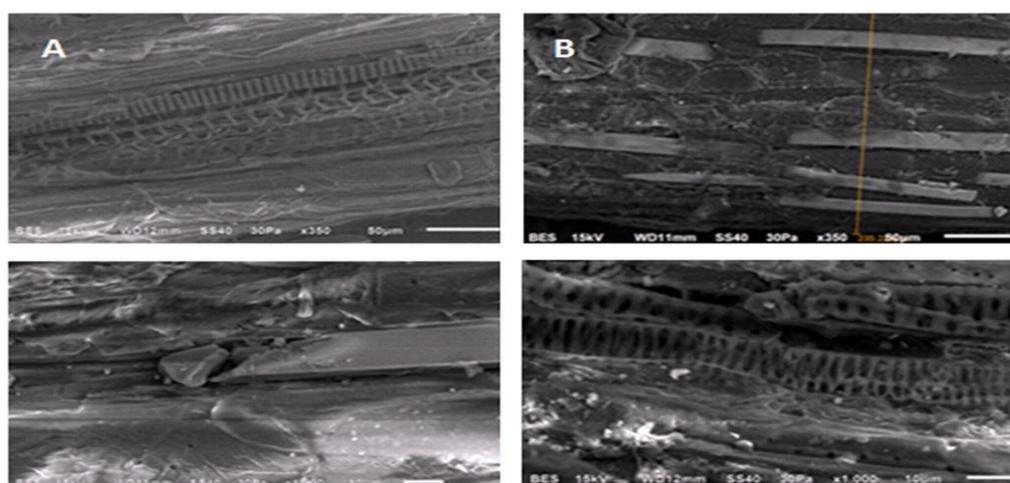


Figura 4. Micrografías de SEM de fibras de bagazo de *Agave salmiana* (izquierda) y *Agave tequilana weber* (derecha). Las imágenes superiores vistas a 350x; Inferiores 1000x.

Cuadro 2. Porcentajes y rendimientos en el jugo de las hojas (E.2).

Muestra	Peso del jugo (mL)	Sólidos disueltos (g)	Rendimiento de sólidos (%)
A. <i>samiana</i>	900	71.8495	7.98
A. <i>tequilana</i>	750	65.7076	8.76

Una vez fraccionada la muestra alcohólica del *Agave salmiana* tenemos diferentes características en cada una de las fracciones como se observa en la Figura 6. Las manchas relacionadas a las saponinas las encontramos con un RF de 2.8 a 3.2.

Cuadro 3. Resultados del análisis bromatológico de las pencas frescas y extracto alcohólico de los Agaves *salmiana* y *tequilana*.

Muestra	Humedad %	Cenizas %	Extracto etereo %	Fibra %	Proteína %	Azúcares reductores mg/mL
A. salmiana (a)	82.40	14	0.58	20	5.1	58.47
A. salmiana (b) ^b		14	0.08	21	7.3	57.08
A. tequilana (a)	85.30	14	0.99	21.5	5.2	64.64
A. tequilana (b)		15	0.16	22	6.4	65.98

(a) se refiere a pencas frescas y (b) al residuo después de llevar a cabo la extracción.

Cuadro 4. Fracciones obtenidas de los extractos

Tipo de extracto	Volumen eluído	Fracciones
E.1 A. <i>salmiana</i>	109 tubos (5 mL)	7
E.1 A. <i>tequilana</i>	80 tubos (5 mL)	7
E.2 A. <i>salmiana</i>	539 tubos (5 mL)	14
E.2 A. <i>tequilana</i>	110 tubos (5 mL)	3

En cuanto a las fracciones del extracto alcohólico del *Agave tequilana* tenemos un patron característico mostrado en la Figura 7 lado izquierdo. Las fracciones de este extracto muestran diferencia en los RF en comparacion con el *Agave salmiana*, que aun asi muestran Rf similares, siendo estos identicos a los correspondientes a las saponinas.

Evaluación de la actividad hemolítica de los extractos

Para confirmar la presencia de saponinas se evaluó la actividad hemolítica de los extractos en eritrocitos (Figura 9) la cual se hizo dando pauta para seguir separando estos compuestos. Las sub fracciones obtenidas por la silica de C18, son similares tanto en los E1 y E2 de los 2 Agave (Figura 10), dando R_F 0.28 a .03, mismos que en la prueba de hemolisis y el control de saponina (Qullaja Sigma-Aldrich, código 377635).

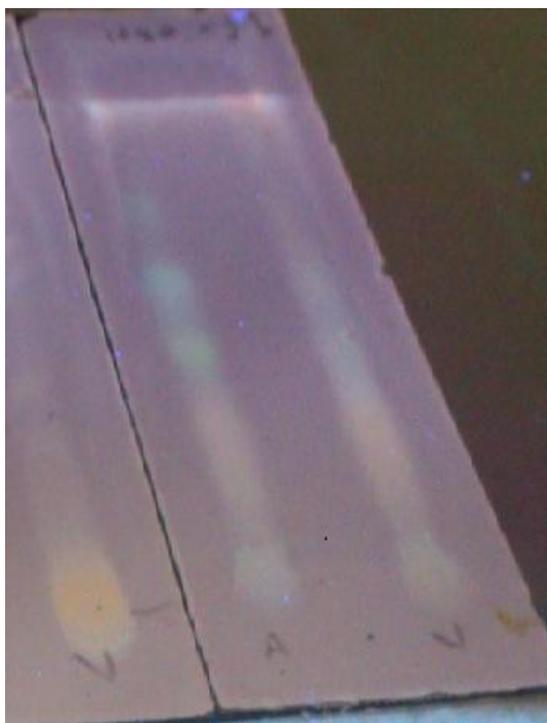


Figura 5. Placa de los extractos de los *Agaves salmiana* (derecho) y *tequilana weber* (izquierdo).

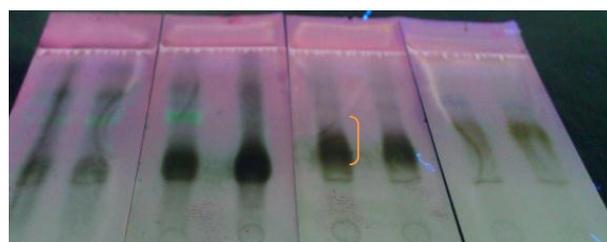
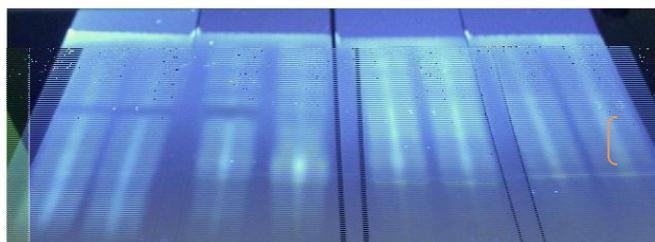


Figura 6. Fracciones del extracto alcohólico del *Agave salmiana* vistas a luz UV de 254, lado izquierdo sin revelar derecho revelado con anisaldehido.

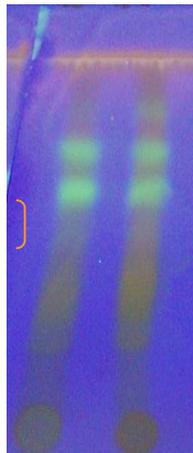


Figura 7. Patron del extracto del *agave tequilana* (izquierda). Fraccion 3 (iaquierdo).

Las fracciones del E2 de las dos variedades tienen similitudes muy marcadas entre sí.

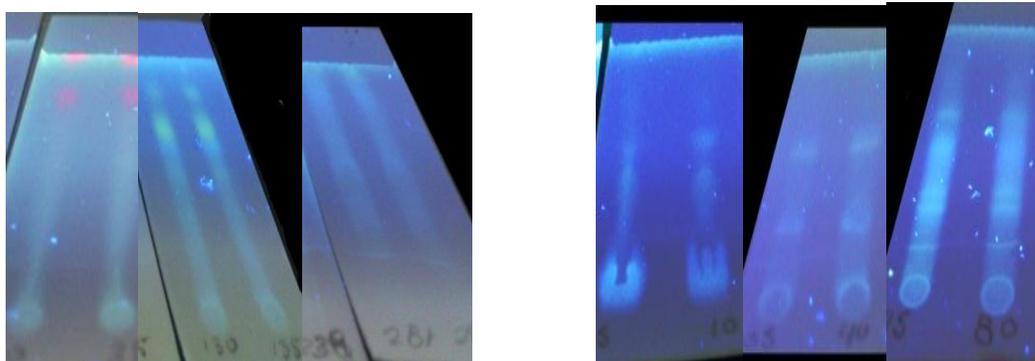


Figura 8. Placas del E2 del *Agave salmiana* (izquierda) y *Agave tequilana* (derecha).

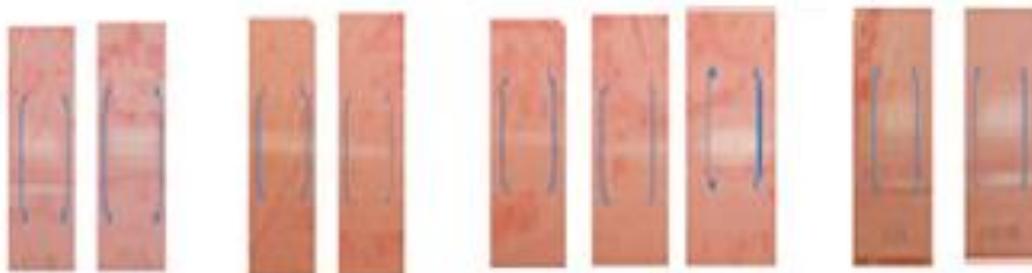


Figura 9. Placas cargadas con las diferentes fracciones de las dos variedades de *Agave* y reveladas con eritrocitos provocando lisis causados por la presencia de saponinas.

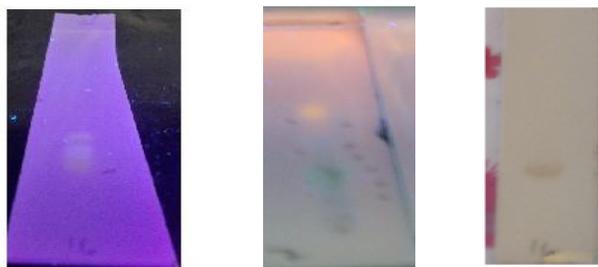


Figura 10. Placas cargadas con sub fracciones de los E1 y E2 de las dos variedades, conteniendo compuestos con R_F muy parecidos (izquierda), del lado derecho esta palca cargada con saponina Quillaja (control).

Conclusiones

Mediante las diferentes técnicas de caracterización realizadas, se observó la diferencia entre las fibras de las dos especies de *Agaves*, así como también la presencia de carbonato de calcio tanto en el bagazo del *Agave salmiana* como en el *Agave tequilana weber*, mientras que el análisis proximal, arrojó el contenido de minerales y nutrientes los cuales no son suficientes para ser empleados en la alimentación en la ganadería, siendo recomendable hacer mezclas de los bagazos con la adición de granos. En cuanto a la caracterización fitoquímica mostró la presencia de metabolitos secundarios, entre ellos las saponinas confirmándose compuestos de gran importancia mediante cromatografía en capa delgada.

Todo ello con la intención de buscar los usos posibles de estos compuestos y la disminución de los residuos generados en la elaboración del mezcal.

Literatura Citada

- Ben-Hamissa, A., Seffen, M., Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Perego, P., Converti, A. 2013. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high pressure reactor. *Food and Bioprocess Technology*. 90: 17-21.
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez M.A., Ponce-Noyola, T., Martínez, A. 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of *Agave bagasse* to fuel ethanol: *Applied Energy*. 113:277-286.
- Eskander, J. Lavaud, C. Harakat, D. 2010. Steroidal saponins from the leaves of *Agave macroacantha*: *Fitoterapia*. 81: 371-374.
- GELA (Grupo Etnobotánico Latinoamericano). Fecha de actualización 19 de febrero del 2013. Fecha de consulta 19 de febrero del 2013. Disponible en <http://www.ibiologia.unam.mx/gela/index.html>.
- Haralampidis, K. Trojanowska, M. Osbourn, A. 2002. Biosynthesis of Triterpenoid Saponins in Plants: *Biotechnology*. 75.
- He-Shui, Y. Peng, Z. Xin-Bo, S. Li-Ping, K. Yi-Xun, L. Xu. P. Jie, Z. Jing F. Yang, Z. Cheng-Qi, X. Da-Wei, T. Li-Juan, Z. Bai-Ping, M. 2011. Two New Steroidal Saponins from the Fresh Leaves of *Agave sisalana*: *Helvetica Chimica Acta*. 94.
- Huitron, C. Perez, R. Sanchez, A.E. Lappe, P. Rocha-Zavaleta, L. 2008. Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes. *Enzyme*. 29(1): 37-41.
- INIFAP. 2003. Potencial productivo de especies agrícolas en el estado de Zacatecas. pp. 80-84. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Zacatecas. México, D.F. ISBN 968-800-557-6.
- Martínez S.M. R. Mata-González, C. Morales-Nieto, R.D. Valdez-Cepeda. 2012. *Agave salmiana* Plant Communities in Central Mexico as Affected by Commercial Use Environmental Management. 49 :55–63.
- Narváez Zapata J.A., Sánchez Teyer L.F. 2009. Agaves as a Raw Material: Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology*. 3:185-191.
- Peng, Z. Jing, F. He-shui, Y. Jie, Z. Li-ping, K. Bai-ping, M. Xian-zhong, Yan. 2006. The NMR studies on two new furostanol saponins from *Agave sisalana* leaves: *Magn. Reson. Chem*. 44:1090–1095.

- Riveraa, G. Bocanegra-García, V. Mongec, A. 2010. Traditional plants as source of functional foods: a review: *Journal of Food* Vol. 8, No. 2: 159–167.
- Rodríguez-Garay, B., Lomelí-Senci3n, J.A., Tapia-Campos, E., Guti3rrez-Mora, A., Garc3a-Galindo, J., Rodr3guez-Dom3nguez, J.M., Urbina-L3pez, D., Vicente-Ram3erz, I. 2009. Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. *Azul* y *Agave angustifolia* Haw. var. *Line3o*; *Industria corps and products*. 29: 220-228.
- Sedeghi, M., Zolfaghari, B., Senatore, M., Lanzotti, V. 2013. Spirostane, furostane and cholestane saponins from Persian leek with antifungal activity: *Food chemistry*. 141: 1512-1521.
- Sharm, O.P., Kumar, N., Singh, B., Bhat, T.K. 2013. An improved method for thin layer chromatographic analysis of saponins; *Food chemistry*. 132; 671-674.
- Yokosuka, A. Mimaki, Y. 2009. Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity: *Phytochemistry*. 70: 807-815.
- Yoong-Cheok, CH., Karim-Salman, H.A., Sulaiman, R. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review; *Food Research International*. 59; 16-40.

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS β -FRUCTOSIDASAS EN *Lactobacillus casei* DE *Agave salmiana*

Gaytán–Saldaña N.A.¹; J.A. Osuna–Castro²; F. J. Macías–Rodríguez³; J. Huerta–García¹; E.L. Esparza–Ibarra^{1*}

¹Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Calzada Solidaridad esq. Paseo la Bufa S/N, Zacatecas, Zac. CP. 98060. Tel. (492) 921-1326. **MÉXICO.**

²Universidad de Colima.Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Colima, **MÉXICO.**

³Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario Centro–Norte. Calle Cruz del Sur No. 100, Col. Constelación. Apdo. Postal 196, CP 98085, El Orito, Zacatecas, Zac., **MÉXICO.**

*E-mail: edgarzac@gmail.com

Resumen

Los fructanos son polímeros de fructosa que comprenden una excelente fuente para la obtención de fructooligosacáridos (FOS), donde la hidrólisis enzimática parcial resulta ser un proceso más ventajoso por su menor coste y rendimientos altos. El aislamiento de cepas con capacidad para sintetizar enzimas β -fructosidasas que degraden estos polímeros para obtener FOS, ofrece aportaciones clave para investigaciones futuras en el contexto de los prebióticos y probióticos. En este estudio a partir de la savia de *Agave salmiana* denominada como aguamiel se aisló *Lactobacillus casei* con actividad β -fructosidasa. La síntesis de enzimas β -fructosidasa en *L. casei* se indujo en medio con fructanos de agave como única fuente de carbono. El extracto proteínico extracelular mostró un halo de actividad enzimática en geles de poliacrilamida co-polimerizado con inulina y se determinaron dos proteínas con un peso molecular estimado de 116 y 105 kDa.

Palabras clave: *Agave*, aguamiel, aislamiento, β -fructosidasa, fructanos, *Lactobacillus casei*, SDS-PAGE.

PRODUCTION OF ENZYMES β -FRUCTOSIDASES In *Lactobacillus casei* FROM *Agave salmiana*

Abstract

Fructans are fructose polymers that comprise an excellent source for obtaining fructo oligosaccharides (FOS), where the partial enzymatic hydrolysis turns out to be a more advantageous approach. The isolation of strains with ability to produce β -fructosidase-type enzymes that degrade these polymers for obtaining FOS, provides key components for future research in the context of prebiotics and probiotics. In this study, the isolation of *Lactobacillus casei*, with β -fructosidase activity, from the sap of *Agave salmiana*. called "aguamiel" was carried out. The synthesis of β -fructosidase enzymes of *Lactobacillus casei* was induced in media supplemented with agave fructans as sole carbon source. The extracellular protein extract showed β -fructosidase enzyme activity in gels polyacrylamide copolymerized with inulin from chicory. The halo of enzyme activity correspond to two proteins; with an estimated molecular mass of 116 and 105 kDa.

Key words: *Agave*, aguamiel, isolation, β -fructosidase, fructans, *Lactobacillus casei*, SDS-PAGE.

Introducción

Los fructanos son polímeros de fructosa que pueden ser considerados producto de la extensión del metabolismo de la sacarosa (Chalmers *et al.*, 2005), a la cual unidades de fructosa se unen adyacentemente mediante enlaces β -fructosil-fructosa hasta formar cadenas lineales o ramificadas. En el reino vegetal se encuentran presentes en el 15 % de las angiospermas, y en plantas de la familia *Agavaceae* estos fructanos son los principales carbohidratos de reserva (Huitrón *et al.*, 2013) que constituyen el 60 % del peso seco (Mancilla-Margalli y López, 2006); los cuales se utilizan para la elaboración de bebidas alcohólicas (tequila, mezcal, bacanora y pulque). Los fructanos en especial los fructooligosacáridos (FOS), son considerados ingredientes prebióticos con propiedades benéficas para el humano; por lo que son comercializados como ingredientes para alimentos, suplementos nutricionales y nutraceuticos. Los FOS son sintetizados a partir de sacarosa a través de enzimas fructosiltransferasas y/o por la hidrólisis enzimática parcial de fructanos. Diversos estudios reportan la presencia de enzimas degradadoras de fructanos en bacterias ácido lácticas, como cepas de *Lactobacillus* (Müller y Seyfarth, 1997; Makras *et al.*, 2005; Goh *et al.*, 2007; Saulnier *et al.*, 2007; Martel *et al.*, 2012; Kuzuwa *et al.*, 2012). Las enzimas que hidrolizan los enlaces β -fructosil-fructosa son las β -fructosidasas.

Las bacterias ácido lácticas colonizan reservorios naturales que les proveen sus altos requerimientos nutricionales y debido a su mecanismo de generar energía, pueden crecer en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. El aislamiento de bacterias ácido lácticas principalmente del género *Lactobacillus*, se ha reportado en gramíneas (Müller y Lier, 1994) y en fermentos de *Agave salmiana* (Escalante-Minakata *et al.*, 2008). La presencia de *Lactobacillus* en gramíneas y bebidas ricas en fructanos, sugiere que estas bacterias asimilan fructanos mediante la producción de enzimas que degraden estos polisacáridos a sus monosacáridos constituyentes. La búsqueda de *Lactobacillus* spp. con actividad hidrolítica sobre fructanos a partir de aguamiel de *Agave salmiana* fue el propósito de este estudio.

Metodología

Aislamiento y selección

Una alícuota de aguamiel se diluyó en caldo MRS (Difco-USA) y se incubó a 45 °C (Jaramillo *et al.*, 2010). Enseguida, se realizaron bancos de diluciones en caldo MRS y se sembraron en placas con MRS-agar (Diario Oficial de la Federación, 1995). Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones aeróbicas y anaeróbicas durante 24-72 h. Las colonias con morfología colonial correspondiente a *Lactobacillus* spp. fueron seleccionadas.

Determinación fenotípica y bioquímica de las cepas aisladas

Las cepas seleccionadas fueron determinadas de acuerdo a los criterios de MacFaddin (2003) y al Manual Bergey (2005), para determinar bacterias ácido lácticas especialmente del género *Lactobacillus*.

Ensayo de la actividad β -fructosidasa

Las cepas presuntamente correspondientes al género *Lactobacillus* se evaluaron con base en su capacidad de fermentar fructanos siguiendo la metodología de oxidación o fermentación de la glucosa de McFaddin (2003). Se clasificaron cuatro grupos de acuerdo al carbohidrato empleado: grupo G (glucosa), FA (fructanos de agave), I (inulina de achicoria) y C (control).

Determinación molecular de las cepas con actividad β -fructosidasa mediante amplificación y secuenciación del gen 16S DNAr

El DNA genómico de las cepas con capacidad β -fructosidasa fue aislado siguiendo el método de Petrick *et al.* (1988). La región 16S DNAr se amplificó utilizando dos primers universales, 27F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') reportados por Liu *et al.* (2012). La reacción de PCR se llevó a cabo usando Platinum Taq DNA Polymerase en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Las condiciones de amplificación se programaron de la forma siguiente: 94 °C, por 2 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 2 min; y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % conteniendo bromuro de etidio en buffer TAE 1X. Los resultados revelaron un producto de PCR de 1466 bp. y se purificaron con el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences). La región del gen 16S del DNAr se envió a secuenciar, a Servicios

Genómicos Langebio del CINVESTAV unidad Irapuato, Guanajuato, mediante secuenciación individual utilizando la técnica de Sanger. La especie se determinó al comparar la secuencia del 16S DNAr obtenida, con las secuencias disponibles en el GenBank de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el uso de la herramienta de análisis en línea BLASTn. Las secuencias fueron alineadas usando el software BioEdit (Hall, 1999).

Identificación de la actividad β -fructosidasa

Previo a la identificación de enzimas β -fructosidasas se realizaron las cinéticas de crecimiento en medio de cultivo MRS y medio de cultivo con fructanos de agave (2% p/v) (medio MRS sin glucosa).

La cepa de interés se inoculó en medio de cultivo líquido (medio MRS sin la adición de glucosa) suplementado con fructanos de agave y/o inulina de achicoria (Sigma) al 2% (p/v) e incubado a 37 °C durante 18 h. Se ensayó sólo la fracción correspondiente al sobrenadante del medio. Las proteínas secretadas al medio se recuperaron por centrifugación, y se concentraron siguiendo la metodología diálisis-congelación-centrifugación de Virgen *et al.* (2012). La actividad β -fructosidasa se identificó mediante SDS-PAGE al 10% (Laemmli, 1970) y en geles de poliacrilamida al 8% co-polimerizado con inulina de achicoria al 2% (p/v). Los extractos se disolvieron en buffer de muestra en condiciones no reductoras, y se sometieron a electroforesis a 60 V. El SDS-PAGE fue teñido en azul de Coomassie, mientras que el gel co-polimerizado con inulina fue teñido con el sistema ácido periódico-Schiff (PAS-Sigma Aldrich). Como control positivo se utilizó inulinasa comercial Fructozyme L (Sigma) de *Aspergillus niger*.

Resultados y Discusión

Aislamiento, selección y Determinación fenotípica y bioquímica

Se obtuvieron 53 cepas aisladas a partir de aguamiel, con características de morfología colonial de *Lactobacillus*. Las 53 cepas se sembraron tres veces de manera consecutiva para la obtención de cultivos puros. Durante este proceso ciertas cepas presentaron contaminación o simplemente ya no se desarrollaron. Al final sólo permanecieron seis de ellas y se denominaron: Am1, Am2, Am3, Am21 Am35 y Am42, las cuales presentaron características del género *Lactobacillus* en relación a su morfología celular de forma bacilar,

su tinción Gram positiva, su capacidad de crecer en ausencia de O₂, y carencia de endosporas.

Ensayo de la actividad β -fructosidasa

La capacidad de fermentar los carbohidratos ensayados, glucosa, fructanos de agave y fructanos de achicoria, fue revelada a través del indicador de pH (púrpura de bromocresol) contenido en el medio, el cual al liberarse los productos ácidos por el desdoblamiento de los carbohidratos viró de color violeta a amarillo. Según la intensidad de la tonalidad del vire indicó la capacidad de fermentar estos carbohidratos. De las seis cepas sólo la cepa Am3 fue la que fermentó fructanos de agave como de achicoria. Este perfil fermentativo de Am3 coincide con los resultados de Makras *et al.* (2005), donde *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* fermentó FOS e inulina a ácido láctico y otros metabolitos. La cepa Am3 al fermentar los carbohidratos ensayados generó un cambio de color visible en el medio, lo que sugiere que la cepa Am3 asimila fructanos de agave e inulina a través de la producción de enzimas β -fructosidasa. Solo la cepa Am3 fue de interés para continuar con el objetivo de estudio (Figura 1).



Figura 1. Fermentación de glucosa (G), inulina (I), y fructanos de agave (FA) de la cepa Am3. Control (C).

Determinación molecular de la cepa

Mediante el análisis del alineamiento de la secuencia obtenida del amplicón, se encontró un alto porcentaje de identidad (100 %) de la cepa Am3 con la secuencia del gen 16S del DNA ribosomal de *Lactobacillus casei* (Figura 2).

Identificación de la actividad β -fructosidasa

Lactobacillus casei (cepa Am3) puede utilizar glucosa y fructanos de agave para su crecimiento (Figura 3). En la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* en medio de cultivo MRS caldo se mostró una fase de adaptación corta con una duración de tres horas. Posteriormente, el cultivo entró en fase exponencial, donde se registró el mayor crecimiento las 18 h. A partir de esta hora inició la fase estacionaria y se mantuvo en ella hasta las 29 h. Finalmente, se registró la fase de declive o muerte a partir de las 34 h.

En el crecimiento de *L. casei* en medio con fructanos de agave se observó un patrón de crecimiento diáuxico con períodos de adaptación de corta duración entre cada fase exponencial. Este patrón se debe a la influencia de más de un sustrato contenidos en el mismo medio de cultivo, uno de los cuales se usa con preferencia frente al otro. Kuzuwa *et al.* (2012) al propagar *Lactobacillus casei* IAM 1045 en medio de cultivo en presencia de glucosa e inulina obtuvieron el mismo patrón de crecimiento. Incluso Goh *et al.* (2007) al examinar el efecto de la glucosa sobre el operón para la utilización de FOS por *Lactobacillus paracasei* 119, observó un patrón de crecimiento diáuxico cuando las células fueron cultivadas en FOS en presencia limitada de glucosa (0.1 %). El sustrato de fructanos de agave utilizado en este estudio, es un producto comercial grado alimentario que difiere de los fructanos comerciales grado químico en su grado de pureza, complejidad y concentración. La inulina comercial de achicoria grado alimenticio contiene 90 % de inulina, 6 % de sacarosa y 4 % de glucosa-fructosa; y en la inulina comercial grado químico se eliminan trazas de sacarosa y glucosa-fructosa, manteniendo solo las cadenas de inulina.

El crecimiento de la población celular se determinó mediante recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) se presentan los valores medios de tres experimentos independientes y las desviaciones estándar se muestran según el ANOVA ($R^2=0.98983$, g.l.=13, $F=209.6207$, $p < .0001$, y $R^2=0.994986$, g.l.=13, $F=427.3976$, $p < 0.0001$, respectivamente).



Figura 2. Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa Am3 con la secuencia del gen 16S del DNA ribosomal de *Lactobacillus casei*.

Para identificar las enzimas β -fructosidasas de *L. casei*, las proteínas extracelulares extraídas de la fracción correspondiente al sobrenadante del medio fueron separadas por SDS-PAGE (Figura 4).

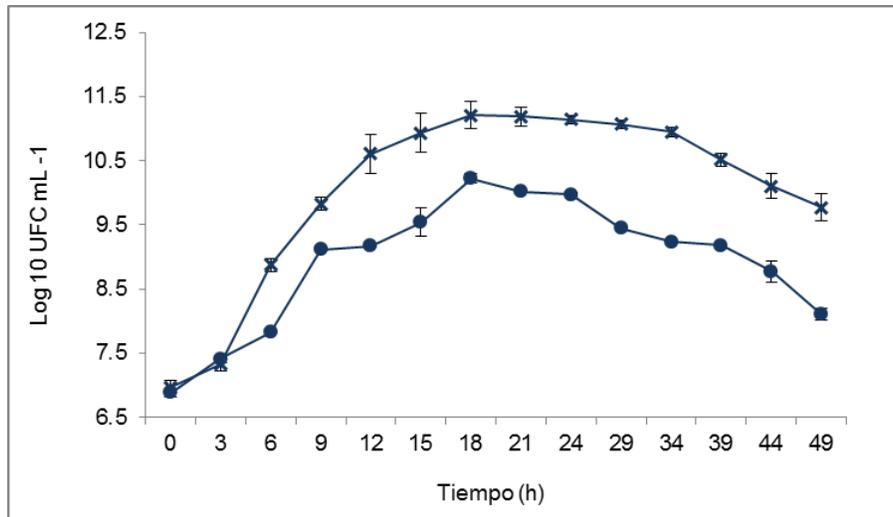


Figura 3. Perfil de crecimiento de *Lactobacillus casei* en medio MRS(●) y medio suplementado con fructanos de agave (x).

El extracto de proteínas extracelular inducido con fructanos de agave generó un halo de digestión (Figura 4B, carril 2) No obstante los extractos extracelulares inducidos por glucosa o inulina, no exhibieron actividad enzimática sobre el gel co-polimerizado con inulina (Figura 4B). El patrón electroforético del extracto de proteínas extracelular inducido con fructanos de agave (Figura 4A, carril 2) mostró dos bandas diferenciales (indicadas con flechas) observadas en el SDS-PAGE, las cuales corresponden justo donde se observa el halo de actividad β -fructosidasa (indicada con flecha en la Figura 4B, carril 2). Estas bandas corresponden a un peso estimado de 105 y 116 kDa. Por lo anterior se puede establecer la posibilidad de dos o más bandas de proteína o isoformas con actividad β -fructosidasa.

Estudios reportan que algunos *Lactobacillus* son capaces de fermentar fructanos a través de la síntesis de enzimas que permiten degradar estos polímeros. Por ejemplo, Müller y Seyfarth (1997) postularon una enzima fructanhidrolasa extracelular (42 kDa) como única enzima degradadora de fructanos en *L. paracasei* subsp. *paracasei* cuando se creció en medio suplementado con fructano extraído de *Phleum pratense*. Sin embargo recientes estudios sobre la utilización de FOS resaltan la presencia de otras enzimas con actividad de fructanhidrolasa. Goh *et al.* (2007) encontraron una β -fructosidasa extracelular asociada a pared celular con un peso molecular estimado de 139 kDa.

En este estudio, aunque *L. casei* fue capaz de crecer en medio con inulina (datos no mostrados), el extracto enzimático extracelular no mostró actividad enzimática. Contrario a este resultado, Kuzuwa *et al.* (2012) encontraron que el extracto de proteínas extracelulares de *L. casei* IAM1045 degradan inulina cuando se creció en presencia de ésta. En otro estudio se obtuvo una β -fructofuranosidasa intracelular en *L. plantarum* cuando se creció en FOS de cadena corta (Saulnier *et al.*, 2007). Esto sugiere, que la inducción y propiedades de las enzimas dependen del sustrato que se utiliza para inducir las al crecer al microorganismo. En este estudio, *L. casei* fue capaz de crecer en medio suplementado con inulina de achicoria. Sin embargo, el extracto enzimático extracelular no mostró actividad enzimática. Esto sugiere la posibilidad de que la inulina induzca en *L. casei* una enzima fructosidasa de pared celular o citoplasmática.

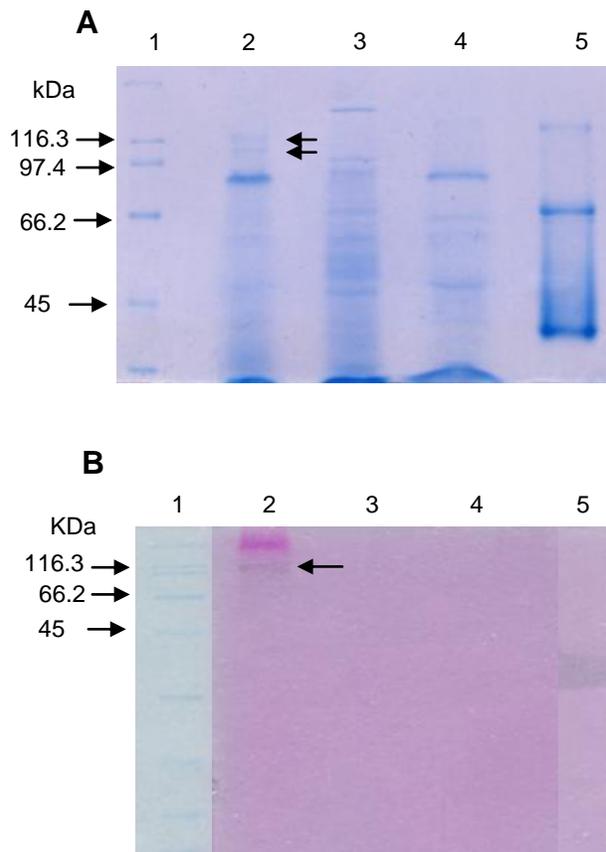


Figura 4. Perfil electroforético de las proteínas extracelulares de *L. casei* en SDS-PAGE (A) y gel de poliacrilamida 10% co-polimerizado con inulina 2%, (p/v) (B). Carril 1, marcador de peso molecular Broad Range. Extracto de proteínas extracelular inducido con: fructanos de agave (carril 2), inulina (carril 3), glucosa (carril 4). Inulinasa de *Aspergillus niger* (Carril 5).

Por otro lado, no se mostró actividad β -fructosidasa cuando *L. casei* creció en presencia de glucosa. En un estudio realizado por Goh *et al.* (2007) encontraron que *L. casei* 1195 cuando se creció en FOS en presencia limitada de glucosa, la síntesis de β -fructosidasa para la utilización de FOS está sujeto a represión catabólica por glucosa.

Conclusiones

A partir de aguamiel de *Agave salmiana* se logró aislar *Lactobacillus casei* con actividad β -fructosidasa. El extracto de proteínas extracelular de *L. casei* inducido con fructanos de agave reveló actividad enzimática sobre inulina contenida en geles de poli(acrilamida).

Agradecimientos

A la M. en C. Perla Ivonne Gallegos Flores por su valioso apoyo y asesoría en la elaboración de este estudio.

Bibliografía

- Chalmers J, Lidgett A, Cummings N, Cao Y, Forster J, Spangenberg G. 2005. Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal*. 3: 459–474.
- Diario Oficial de la Federación. 1995. Norma oficial mexicana de bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA1-1994.
- Escalante-Minakata P, Blaschek HP, Barba de la Rosa AP, Santos L, De León-Rodríguez A. 2008. Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 626–630.
- Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volumen 2: The proteobacteria. Segunda edición. USA: Springer.
- Goh YJ, Lee JH, Hutkins RW. 2007. Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 5716–5724.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- Huitrón C, Pérez R, Gutiérrez L, Lappe P, Petrosyan P, Villegas J, Aguilar C, Rocha-Zavaleta L, Blancas A. 2013. Bioconversion of Agave tequilana fructans by exo-inulinases from indigenous *Aspergillus niger* CH-A-2010 enhances ethanol production from raw Agave tequilana juice. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 40:123–132.

- Jaramillo GD, Meléndez AP, Sánchez MOF. 2010. Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de lactobacilos y bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1 (2): 193-209.
- Kuzuwa S, Yokoi K, Kondo M, Kimoto H, Yamakawa A, Taketo A, Kodaira KI. 2012. Properties of the inulinase gene levH1 of *Lactobacillus casei* IAM 1045; cloning, mutational and biochemical characterization. *Gene*. 495: 154–162.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–695,
- Liu C, Gong F, Li X, Li H, Zhang Z, Feng Y, Nagano H. 2012. Natural populations of lactic acid bacteria in douchi from Yunnan Province, China. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*. 13(4): 298-306.
- MacFaddin JF. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Makras L, Van Acker G, De Vuyst L. 2005. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environment Microbiology*. 71:6531–6537.
- Mancilla-Margalli NA, López MG. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 7832–7839.
- Martel CM, Warrilow AGS, Jackson CJ, Mullins JGL, Togawa RC, Parker JE, Morris MS, Donnison IS, Kelly DE, Kelly SL. 2010. Expression, purification and use of the soluble domain of *Lactobacillus paracasei* beta-fructosidase to optimise production of bioethanol from grass fructans. *Bioresource Technology*. 101: 4395–4402.
- Müller M, Seyfarth W. 1997. Purification and substrate specificity of an extracellular fructanhydrolase from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* P 4134. *New Phytologist*. 136: 89–96.
- Müller M, Lier D. 1994. Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 76: 406–411.
- Petrick HAR, Ambrosio RE, Holzapfel WH. 1988. Isolation of a DNA probe for *Lactobacillus curvatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(2): 405-408.
- Saulnier DMA, Molenaar D, de Vos WM, Gibson GR, Kolida S. 2007. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Applied and Environment Microbiology*. 73:1753–1765.
- Virgen-Ortíz JJ, Ibarra-Junquera V, Osuna-Castro JA, Escalante-Minakata P, Mancilla-Margalli NA, Ornelas-Paz JJ. 2012. Method to concentrate protein solutions based on

dialysis–freezing–centrifugation: Enzyme applications. *Analytical Biochemistry*. 426: 4–12.