

Producción inducida de fructanasa de *Aspergillus sojae* utilizando agavinas

Vázquez-Vuelvas, O. F.,^{a,*} Díaz-Rivera, J. G.,^a Contreras-Esquivel, J. C.,^b Rodríguez-Pérez, M. A.,^a y Barragán-Vázquez, F. J.^a

^a Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Químicas. Laboratorio de Ingeniería Bioquímica. Km 9 Carretera Colima-Coquimatlán s/n. C.P. 28400. Coquimatlán, Colima. México. *oscar_vazquez@ucol.mx

^b Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Investigación en Alimentos. Laboratorio de Glicobiotecnología. Blvd. Venustiano Carranza esq. José Cárdenas Valdez s/n. C.P. 25280. Saltillo, Coahuila. México.

RESUMEN:

Las fructanasas con actividad específica sobre los fructanos del *Agave tequilana* son enzimas con actividad agavinasa. Al igual que las inulinasas, representan una herramienta importante para la manufactura de derivados alimenticios basados en contenido de fructosa. Las agavinasas se han reportado principalmente como inulinasas que actúan hidrolíticamente sobre polisacárido de fructano de agave, empleando diversos sustratos como fuente de carbono, así como diferentes microorganismos productores, entre ellos hongos filamentosos como *Aspergillus* sp. Se realizó un estudio del perfil de fermentación utilizando *Aspergillus sojae* y agavinas como fuente de carbono, para evaluar el perfil de consumo, la producción biomasa, y comportamiento del pH durante el bioproceso. Los extractos crudos se utilizaron para analizar la actividad catalítica empleando fructano de agave como sustrato. Los extractos de la fermentación resultaron activos para la actividad agavinasa al observar el incremento de azúcares reductores liberados en la mezcla de reacción, concluyendo entonces que *Aspergillus sojae* produce la enzima de manera inductiva en el sistema propuesto de fermentación líquida..

ABSTRACT:

Fructanase enzymes with specific action over *Agave tequilana* fructans are enzymes with agavinase activity. As well as inulinases, agavinases represent an important tool for manufacturing fructose-based food derivatives. The agavinases have been reported mainly as inulinasas with hydrolytic action over agave fructans polysaccharides, employing several substrates as a carbon source, as well as different microorganisms, among them *Aspergillus* sp. In this work, a fermentation profile study using *Aspergillus sojae* and agavins as substrate was carried out. The carbon source consume profile, biomass production and pH behavior along the bioprocess was evaluated. The crude extracts were analyzed for catalytic activity utilizing agavins as substrate. The fermentation extracts resulted active for agavinase activity when observing the increment of reducing sugars in the reaction mixture; then *Aspergillus sojae* produces the enzyme inductively in the liquid fermentation system employed..

Palabras clave:

Aspergillus sojae, agavinas, agavinasas, fructanasa, fermentación líquida.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

Los fructanos son polímeros de fructosa que tienen una unidad de glucosa inicial. Son macromoléculas que representan la mayor parte de carbohidratos de reserva, en el 15% de las plantas de especies floreadas (Muñoz-Gutiérrez et al., 2009). Las unidades monoméricas de los fructanos están predominantemente enlazadas con uniones glicosídicas $\beta(2-1)$, a los cuales se conocen comúnmente como inulinas (Muñoz-Gutiérrez, Rodríguez-Alegría, & López Munguía, 2009). Cuando sus uniones glicosídicas son predominantemente $\beta(2-6)$, se les clasifica como levanas. Sin embargo, existen derivados de fructanos con cadenas poliméricas ramificadas, que presentan estructuras con mayor complejidad, teniendo particularmente una combinación de enlaces $\beta(2-6)$ y $\beta(2-1)$. Este es el caso para los fructanos del *Agave tequilana* Weber variedad Azul, a los cuales, se les ha nombrado como agavinas (Mancilla-Margalli, López, & López, 2006).

El *Agave tequilana* Weber variedad azul es una planta de mucha importancia económica debido a su de alto valor comercial en México, ya que es la materia prima en la elaboración de muchas bebidas fermentadas y destiladas (Ávila-Fernández, Galicia-Lagunas, Rodríguez-Alegría, Olvera, & López-Munguía, 2011). Es una planta de alto contenido de azúcar, fibra y sustancias bioactivas. A partir de los núcleos o “piñas”, frescas o cocidas, se puede

extraer miel natural o jugos, para obtener polisacáridos, fructanos de agave, jarabes de alta fructosa y biocombustibles (Rubio-Piña, Quiroz-Moreno, & Sánchez-Teyer, 2016).

La biosíntesis de los fructanos puede presentar diferencias según su fuente de origen ya sea teniendo diferente grado de polimerización, ramificaciones, el tipo de enlace que una a la unidad de fructosa y la posición de las moléculas residuales de glucosa (Mancilla-Margalli & López, 2006). Los fructooligosacáridos (FOS) u oligofructosa, son fructanos con un grado de polimerización menor a 10, y son junto con la inulina, dos de los ingredientes más importantes en la formulación de alimentos funcionales, específicamente en los que incluyen los llamados prebióticos. Esta función consiste en que actúan como sustrato para las bacterias del colón; es decir, ayudan a la prevención de enfermedades como el cáncer, inhibiendo competitivamente el crecimiento de microorganismos que pueden ser patógenos y aumenta la formación de metabolitos benéficos (lactatos, butiratos, propionatos y acetatos) para el ser humano (Ávila-Fernández et al., 2011; Velázquez-Coronado, Mateos-Díaz, Flores, & Camacho, 2012).

Los FOS son producidos principalmente por síntesis enzimática a partir de sacarosa y fructosiltransferasas, así como mediante enzimas producidas por hongos, bacterias o levaduras (Ávila-Fernández et al., 2011). Las inulinasas microbianas se pueden dividir en dos clases de acuerdo con el patrón de hidrólisis, exo y endo (Pouyez et al., 2012). Dentro de los microorganismos fúngicos que producen inulinasas para la producción de FOS, del género *Aspergillus*, se encuentran *Aspergillus niger*, el cual se puede obtener de manera comercial a través de extractos enzimáticos Megazyme (Fructozyme) y Novozyme (Ávila-Fernández et al., 2011). Adicionalmente, *A. niger* CH-A-2010 (Huitrón et al., 2013) y *Aspergillus ficuum* también ha demostrado actividad inulinasa y fructansa (Pouyez et al., 2012). Dichos sistemas han empleado fructanos como inulina o azúcares de agave, como sustrato inductor. Existen reportes que indican que la producción de enzimas fructofuranosidasas tiene cierto grado de restricción desde el punto de vista metabólico al utilizar sustratos simples, la inducción puede promover una mejor productividad de fructanasas, aun que no es regla general (Chesini et al., 2013). Dado que los hongos filamentosos del género *Aspergillus* son productores de enzimas fructanasas, así como que *Aspergillus sojae* es un productor de enzimas polisacaridasas, junto con el hecho de que no se ha reportado la producción de fructanasas de este hongo; es posible considerar que el uso de *A. sojae* representa un sistema potencial de producción de fructanasas inducidas, empleando el sustrato específico fructano de agave o agavina.

En este trabajo se reporta la producción de una enzima hidrolítica fructanasa, generada a través de un hongo filamentososo (*Aspergillus sojae*) a partir de una fuente inducida de agavinas. El cultivo que se realizó fue en medio líquido en presencia de nutrientes; el cual se utilizó como extracto enzimático crudo para detectar la presencia de la enzima mediante reacciones de evaluación de la actividad fructanasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción del inóculo

Para el estudio cinético del crecimiento de la biomasa fúngica, el inóculo se cultivó con hongo de la cepa *A. sojae* ATCC 20235 (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, Virginia, E.U.A.) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, con 80 mL agar papa dextrosa. El cultivo se mantuvo a 30° C durante 8 días (Contreras Esquivel y Voget, 2004). Para la preparación del inóculo, se adicionaron 20 mL de solución de Tween 80 al 0.02% previamente esterilizada, y con un agitador y una barra magnética estéril se recogieron esporas para hacer una suspensión. El conteo de esporas se estimó utilizando una cámara de Neubauer.

Fermentaciones en medio líquido

Para la fermentación, el medio utilizado reportado previamente (Contreras-Esquivel, et al., 1999) con algunas modificaciones en su composición fue (g/L): K₂HPO₄ 1g; KCl 0.5g; MgSO₄ • 7H₂O 0.5g; FeSO₄ • 7H₂O 0.01g; triptona 5 g y fuente de carbono, glucosa y sacarosa, 10 g. El pH se ajustó a 4 con ácido fosfórico 1 M antes de esterilizar a 121° C por 15 minutos. La fuente de carbono se esterilizó separadamente del resto de los componentes del medio. Posteriormente, se colocaron 50 mL del medio líquido en matraces Erlenmeyer de 250 mL, y se inocularon 1 x 10⁶ esporas del microorganismo en cada matraz. La fermentación se llevó a cabo durante 114 horas con intervalos de muestreo a las 17, 30, 42, 55, 90 y 114 horas, a 30° C con 200 RPM en una incubadora con agitación orbital (CScientific, Mod. CVP-250).

Determinación de azúcares totales

La determinación de azúcares totales en las muestras de extracto crudo de los diferentes tiempos de fermentación con glucosa y sacarosa se realizó por el método fenol-ácido sulfúrico (Dubois, *et al.*, 1956). Se colocaron 250 µL del extracto de fermentación o estándar en un tubo, se añadió 250 µL de fenol al 5% (P/V) y se agitó en vortex. Se colocó la mezcla en baño de hielo durante 5 min. Se añadió 1 mL de H₂SO₄ concentrado con un dosificador de ácidos (Modelo Dispensette, Marca Brand) y se agitó nuevamente en el vortex. La mezcla fue llevada a ebullición durante 5 min. Se dejó enfriar en agua con hielo durante 10 min. Una muestra control blanco se preparó utilizando 250 µL de agua desmineralizada y se le aplicó el mismo procedimiento de reacción. Se leyeron las absorbancias de las mezclas de reacción a 488 nm en el espectrofotómetro (Marca VELAB, modelo VE-5000V). Una curva de calibración se preparó utilizando una solución estándar de fructosa (0 - 100 ppm, utilizando 5 estándares y un blanco de agua desmineralizada).

Producción de biomasa

La producción de biomasa se determinó mediante gravimetría. El micelio producido en los extractos de las diferentes fermentaciones se filtró en papel genérico de poro cerrado previamente pesado. La biomasa colectada, se lavó con 100 mL de agua destilada y se secó en una estufa a 70° C durante 48 horas (Huitrón *et al.*, 2013).

Actividad Enzimática

Para llevar a cabo para llevar la reacción enzimática (RE), se agregaron 50 µL de extracto enzimático y 50 µL de solución de agavina (fructano de agave facilitado por Nutriagaves de México S.A de C.V.) al 1% en buffer de acetatos 50mM pH 4.5. Una reacción control enzima (CE) y otro control sustrato (CS) se ensayaron simultáneamente y en las mismas condiciones. El CE es un tubo de ensaye con 50 µL de extracto enzimático y 50 µL de solución buffer de acetatos 50 mM pH 4.5; para el CS se agregaron 50 µL de buffer de acetatos y 50 µL de sustrato. Los tubos de ensaye son colocados en un baño maría a 40°C durante 1 horas de reacción. Una vez cumplido el tiempo se analizaron los azúcares reductores por el método de DNS (Miller, 1959). El reactivo DNS contiene 10 g/L de ácido dinitrosalicílico, 300 g/L de tartrato de sodio y potasio, y 16 g/L de hidróxido de sodio. Para la determinación de azúcares reductores, se colocaron 100 µL del reactivo DNS a la mezcla de reacción de actividad enzimática. Los tubos se calentaron a ebullición en agua durante 5 min, posteriormente se enfriaron en un baño de agua con hielo durante 5 min. Se les agregaron 1000 µL de agua desmineralizada y se agitó el tubo con ayuda de un vortex. Se leyeron los tubos a 540 nm en el espectrofotómetro (Marca VELAB, modelo VE-5000V). El blanco se preparó utilizando 100 µL de agua desmineralizada. Una curva de calibración se preparó utilizando soluciones estándar de fructosa en buffer de acetatos 50 mM y pH 4.5 (0 - 2000 ppm, utilizando 5 estándares y un blanco de agua desmineralizada). Los ensayos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de biomasa

La fermentación en medio líquido del hongo *Aspergillus sojae* se analizó desde el punto de productividad midiendo el crecimiento del microorganismo a durante el cultivo agitado. Los resultados de la producción de biomasa se muestran en la Figura 1. Se observa que durante las primeras 17 horas, el hongo se encuentra en una etapa de adaptación al medio, es decir el microorganismo comenzó a generar metabolitos que le permiten tener biodisponibilidad agavina, una fuente de carbono compleja; la producción es de 0.33 g/L hasta ese momento. La fase exponencial del cultivo se observa posterior a las 17 horas, presentando valores de 3.5 g/L a las 30 horas de fermentación, llegando hasta un valor máximo de 4.0 g/L a las 42 horas del bioproceso. Posteriormente, se observa una fase de estacionaria con una baja tendencia al decrecimiento en la biomasa, ya que la concentración de biomasa a las 114 horas de fermentación resultó ser de alrededor de 3 g/L. Este comportamiento en la gráfica de producción de biomasa durante un proceso de fermentación es característico de un proceso de autólisis (Tung, Miyata, & Iwahori, 2004) y coincide con la producción llevada a cabo por el hongo *Aspergillus niger* CH-A-2010 en presencia también de fructano de agave, donde el crecimiento de biomasa fue cercano a 3.6 g/L (Huitrón *et al.*, 2013), el cual representa una similitud de la producción reportada en este trabajo. El proceso de autólisis es causado por el incremento del micelio en el matraz, el cual genera que la viscosidad en el medio aumente y la disponibilidad de

azúcares y oxígeno se vea comprometida, promoviendo que el microorganismo llegue a la fase de muerte celular (Tung et al., 2004).

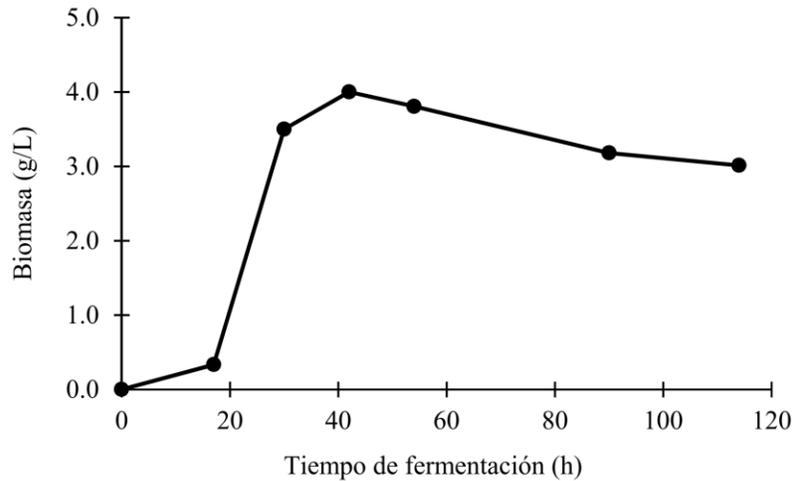


Figura 1. Perfil de producción de biomasa fúngica durante la fermentación.

Comportamiento del pH

El comportamiento que mostró el bioproceso con respecto al pH se puede observar en la Figura 2. De manera semejante al comportamiento de biomasa (Fig. 1), se detecta que durante las primeras 17 horas de cultivo, el microorganismo desarrolla su fase adaptación al medio. Este fenómeno se ha observado previamente en otras especies del género *Aspergillus*, y sucede debido a que las enzimas hidrolíticas que produce el microorganismo presentan actividad en medio ácido; por lo tanto, el valor de pH 4 promueve la etapa inicial del crecimiento (Papagianni, 2004; Tung et al., 2004), ya que la actividad enzimática incrementa la disponibilidad de sustrato sacarificado en el medio. El aumento en el pH se produce después de las 17 horas, justo cuando comienza el crecimiento exponencial de la producción de biomasa en el bioproceso; es decir, se observa una relación directa con el crecimiento del hongo en el medio, la cual es proporcional al aumento del pH. El aumento del pH está asociado a la presencia de amonio en el medio de fermentación, como resultado de la desaminación de aminoácidos que lleva a cabo el microorganismo durante su metabolismo (Tung et al., 2004). Como consecuencia, la presencia de nitrógeno amoniacal en el medio genera un ambiente básico (Lesniak & Podgorski, 2000; Tung et al., 2004), llegando a valores cercanos a 7, manteniéndose estable ahí, hasta que el bioproceso termina a las 114 horas, registrando un valor de pH de 7.

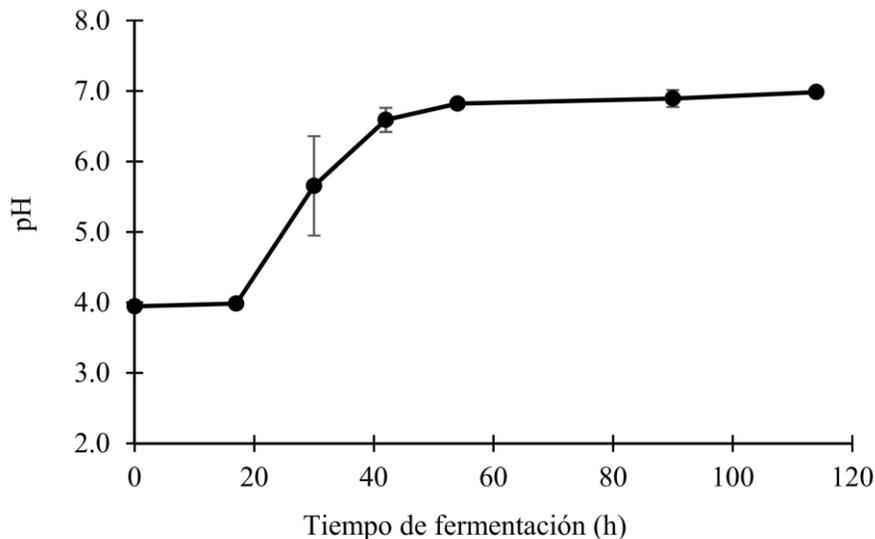


Figura 2. Comportamiento del pH durante la fermentación.

Consumo de la fuente de carbono

Los resultados de la determinación de azúcares totales presentes en los diferentes extractos enzimáticos se expone en la Figura 3. Como se puede observar, con el transcurso del tiempo la fermentación presenta una disminución en la concentración del sustrato en el medio de cultivo. Durante las primeras 17 horas se registró un valor cercano a 9500 mg/L, lo que indica una ligera disminución de la fuente de carbono y es coincidente con la etapa de adaptación mostrada en las Figuras 1 y Figura 2. En esta etapa, el hongo comienza a segregar las enzimas capaces de simplificar la fuente de carbono. Posterior al lapso de adaptación, la concentración de azúcares disminuye de manera pronunciada, ya que, al llegar a 54 h, el extracto mostró un valor cercano a 4200 mg/L de carbohidratos solubles, habiéndose consumido cerca del 60% del sustrato inicial. El consumo de la fuente de carbono tiene similitud con los dos parámetros anteriores, en los cuales se observan comportamientos exponenciales, posteriores a las 17 horas de fermentación. Finalmente, la concentración de azúcares totales al final de la fermentación tiende a un valor mínimo. El perfil mostrado del consumo de la fuente de carbono se asemeja al reportado para un hongo *Aspergillus kawachii* en presencia de fuentes de carbono como el yacón, una fuente de inulina (Chesini et al., 2013). La cinética de consumo que muestra *A. kawachii*, es marcadamente más rápida para tiempos de fermentación análogos al presente trabajo, ya que a las 40 h había consumido arriba del 80% de sustrato, debido a que utilizan una concentración de sustrato inicial de 2 g/L. Mientras tanto, en este trabajo se detectó que el 80% del sustrato se consumió hasta alrededor de las 80 h, habiendo iniciado con una concentración de 10 g/L; lo que representa un volumen de sustrato cinco veces mayor, reflejándose en un ritmo de consumo más lento.

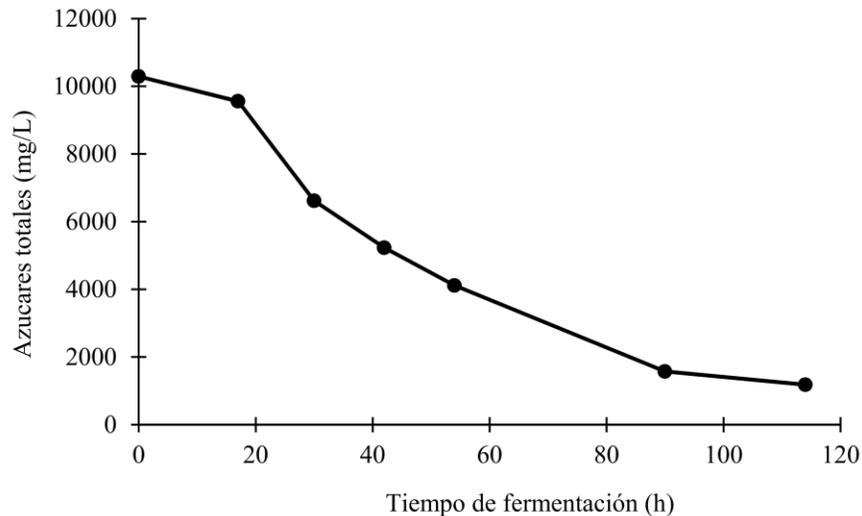


Figura 2. Perfil de consumo de sustrato agavina.

Actividad enzimática fructanasa

Los datos correspondientes a la actividad enzimática agavinasa exhibidos por los diferentes extractos crudos obtenidos en la fermentación, aparecen en la Figura 4. La actividad fructanasas muestra un comportamiento de incremento desde la primera muestra tomada de fermentación a las 17 horas, mostrado valor de 0.027 U/mL. De la misma forma al incremento al pH y a la producción de biomasa, la actividad agavinasa se incrementa, alcanzando un valor de 0.127 U/mL de extracto utilizado para hidrolizar el sustrato. La actividad catalítica se mantiene sin cambio a las 40 h de cultivo, para posteriormente, presentar un incremento constante hasta el final de la fermentación, alcanzando una actividad agavinasa máxima de 0.221 U/mL, es decir un aumento de 8 veces con respecto a mostrado al inicio del bioproceso. Este hecho confirma que la actividad metabólica del microorganismo produce la segregación extracelular de las enzimas necesarias para hacer biodisponible el sustrato complejo de fructano de agave o agavinas.

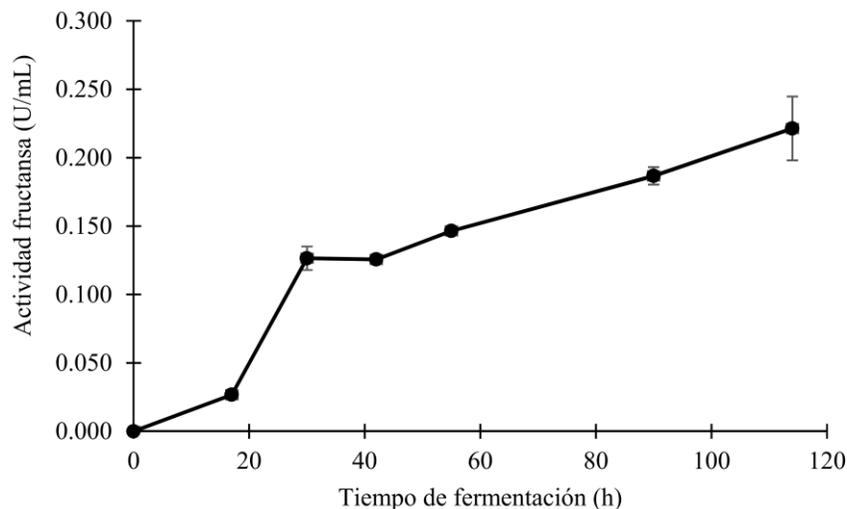


Figura 4. Actividad enzimática agavinasa mostrada por los extractos de fermentación.

Los resultados mostrados de actividad enzimática reportados para una fructanasa (inulinasa) producida por *Aspergillus kawachii*, presentan una tendencia semejante a los mostrados en la Figura 4. La actividad inulinasa mostradas por *A. kawachii* fue de 0.020 U/mL al utilizar inulina como fuente de carbono dicha fermentación, y de alrededor de 0.035 mU/mL al utilizar jugo de yacón (Chesini et al., 2013). Adicionalmente, *Aspergillus niger* CH-

A-2010 mostró un comportamiento creciente en la actividad inulinasa (actividad catalítica fructanasa sobre inulina), alcanzando actividades del orden de alrededor de 1 U/mL (Huitrón et al., 2013). Considerando que la actividad inulinasa de *A. niger* CH-A-2010 es evaluada a 50 °C, es decir 10 °C más que el utilizando en este trabajo, es posible atribuir, a la diferencia de temperatura, parte de la diferencia en actividad mostrada por *A. sojae* en el presente trabajo.

CONCLUSIÓN

La fermentación en medio líquido empleando *Aspergillus sojae* utilizando las agavinas como sustrato resultó ser un sistema de incubación adecuado. El perfil de fermentación indicó que el hongo crece adecuadamente, con buena productividad en biomasa, un comportamiento típico en cuanto al pH, así como refleja que el fructano de agave es un sustrato que, aunque complejo, es asimilable por el microorganismo. Estos resultados permiten conocer las características particulares del cultivo de *A. sojae* en medio líquido, conociendo incluso, aspectos morfológicos del cultivo mismo. Los resultados demuestran que el sistema enzimático desplegado extracelularmente por el hongo puede ser inducido por la fuente de carbono, resultando en la segregación de enzimas en el medio de cultivo, con la capacidad de degradar el polisacárido utilizado. La actividad enzimática agavinasa demostró la capacidad de degradación del sustrato al cuantificarse el incremento en los azúcares reductores formados durante la reacción de hidrólisis. Por lo tanto, la detección de la actividad catalítica fructanasa evaluada en agavinas, es un indicio de que la enzima agavinasa es un metabolito producido de manera inducida por el hongo *Aspergillus sojae*.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado a través del proyecto SEP-PRODEP UCOL-NPTC-250. Se Agradece especialmente a la empresa Nutriagaves de México S.A. de C.V por facilitar la muestra de fructano a este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Ávila-Fernández, Á., Galicia-Lagunas, N., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry*, 129(2), 380–386.
- Chesini, M., Neila, L. P., de la Parra, D. F., Rojas, N. L., Esquivel, J. C. C., Cavalitto, S. F., ... Hours, R. A. (2013). *Aspergillus kawachii* produces an inulinase in cultures with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3).
- Contreras Esquivel, J. C., Hours, R. A., Voget, C. E., & Mignone, C. F. (1999). *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(1), 48–52.
- Contreras Esquivel, J. C., & Voget, C. E. (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, 110(1), 21–28.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Huitrón, C., Pérez, R., Gutiérrez, L., Lappe, P., Petrosyan, P., Villegas, J., ... 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 and Biotechnology*, 40(1), 123–132.
- Lesniak, W., & Podgorski, W. (2000). Effect of amino acids and vitamins on citric acid biosynthesis. In S. Bielecki, J. Tramper, & J. Polak (Eds.), *Food Biotechnology* (pp. 251–255). Amsterdam: Elsevier Ltd.
- Mancilla-Margalli, N., López, A., & López, M. G. (2006). Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and *Dasyliirion* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832–7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Mancilla-Margalli, N., & López, M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from and *Dasyliirion* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832–7839.

- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrolalicylic acid reagent for determination of sugar. *Analytical Biochemistry*, 3, 426–428.
- Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., & López Munguía, A. (2009). Kinetic behaviour and specificity of β -fructosidasas in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry*, 44(8), 891–898. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.013>
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259.
- Pouyez, J., Mayard, A., Vandamme, A. M., Roussel, G., Perpète, E. A., Wouters, J., ... Michaux, C. (2012). First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: Discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity. *Biochimie*, 94(11), 2423–2430.
- Rubio-Piña, J., Quiroz-Moreno, A., & Sánchez-Teyer, L. (2016). A quantitative PCR approach for determining the ribosomal DNA copy number in the genome of *Agave tequilana* Weber. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 9–15.
- Tung, T. Q., Miyata, N., & Iwahori, K. (2004). Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(5), 329–335.
- Velázquez-Coronado, G., Mateos-Díaz, J., Flores, J., & Camacho, R. (2012). Producción de fructanohidrolasas fúngicas con especificidad sobre fructanos de agave. *Academia Mexicana de Investigación Y Docencia En Ingeniería Química*, 2220–2225.