

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
MOLÉCULA FLUORESCENTE PRODUCIDA POR
MICROORGANISMOS AISLADOS DE UNA CAVERNA

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

NAVARRO NATERAS LOURDES

PÉREZ SUÁREZ CYNTHIA ESMERALDA

DIRIGIDA POR

Dr. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN PARCIAL Y
CARACTERIZACIÓN DE UNA MOLÉCULA
FLUORESCENTE PRODUCIDA POR MICROORGANISMOS
AISLADOS DE UNA CAVERNA

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

NAVARRO NATERAS LOURDES
PÉREZ SUÁREZ CYNTHIA ESMERALDA

DIRIGIDA POR

Dr. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ

SINODALES

Dr. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ
DIRECTOR

Dr. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDÁREZ
SINODAL

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
SINODAL

DR. ALDO AMARO REYES
SINODAL

Four horizontal lines with handwritten signatures above them, corresponding to the four sinodales listed on the left.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Luminiscencia	2
1.2 Fluorescencia	3
1.3 Fluoróforos	4
1.4 Proteínas fluorescentes	6
1.5 Potencial biotecnológico de microorganismos	8
1.6 Levaduras	14
1.7 <i>Debaryomyces hansenii</i>	14
1.7.1 Descripción del género <i>Debaryomyces</i>	14
1.7.2 El genoma de <i>D. hansenii</i>	19
1.8 Optimización de medios de cultivo	19
1.8.1 Efectores internos y externos	21
1.8.2 Conservación de los cultivos	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 General	24
2.2 Específicos	24
3. METODOLOGÍA	25
3.1 Microorganismos	26
3.2 Secuenciación de microorganismos	26
3.3 Microscopia óptica	26

3.4 Microscopia de fluorescencia	26
3.5 Determinación de la temperatura más adecuada para el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	26
3.6 Determinación del valor de pH más adecuado para el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	27
3.7 Determinación de la velocidad de agitación más adecuada para el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	27
3.8 Evaluación de diferentes medios definidos sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	27
3.9 Evaluación de fuentes de carbono sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	28
3.10 Evaluación de fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	28
3.11 Evaluación de la relación Carbono/Nitrógeno sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	29
3.12 Cinética de crecimiento de <i>D. hansenii</i>	29
3.13 Métodos analíticos	30
3.13.1 Conteo en placa	30
3.13.2 Peso seco	30
3.13.3 Densidad óptica	31
3.14 Purificación parcial del compuesto fluorescente	31
3.14.1 Extracción con solventes	31
3.14.2 Cromatografía de capa fina	31
3.15 Caracterización del compuesto fluorescente	32
3.15.1 Espectrometría infrarroja (FTIR)	32
3.15.2 Espectroscopía Raman	32
3.15.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Microorganismos	34
4.2 Secuenciación de microorganismos	35

4.3 Selección de la cepa	36
4.4 Microscopía óptica	37
4.5 Microscopía de fluorescencia	38
4.6 Evaluación de la temperatura sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	38
4.7 Determinación del valor de pH más adecuado para el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	39
4.8 Evaluación del efecto de la agitación sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	41
4.9 Evaluación de diferentes medios definidos sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	42
4.10 Evaluación de fuentes de carbono sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	43
4.11 Evaluación de fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	44
4.12 Evaluación de la relación Carbono/Nitrógeno sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i>	45
4.13 Cinética de crecimiento de <i>D. hansenii</i>	46
4.14 Purificación parcial del compuesto fluorescente	49
4.14.1 Extracción con solventes.	49
4.14.2 Cromatografía de capa fina.	51
4.15 Espectrometría infrarroja (FTIR).	51
4.16 Espectroscopía Raman.	53
4.17 Resonancia magnética nuclear (RMN)	56
5. CONCLUSIONES	62
6. REFERENCIAS	63
7. ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Posiciones relativas de los espectros de absorción fluorescencia y fosforescencia.	3
2	Colección de proteínas similares a gfp y sus variantes disponibles para aplicaciones biotecnológicas. Gfp de <i>A. victoria</i> y sus mutantes se muestran sobre la barra. Los nombres de las proteínas siguen la nomenclatura indicada en referencias (Labas y col., 2002).	7
3	Cepas que presentaron fluorescencia con una longitud de onda de 365 nm. a) Muestra 1, <i>Actinomycetales bacterium</i> . b) Muestra 2, <i>Debaryomyces hansenii</i> . c) Muestra 3, <i>Kocuria sp.</i>	35
4	Placa cromatográfica del extracto obtenido de <i>D. hansenii</i> , revelada con luz ultravioleta (365 nm). a) Compuesto 1 y b) Compuesto 2.	37
5	Microscopía óptica de <i>D. hansenii</i> , objetivos 4X (b) y 10X (a). Cultivada en medio ypd.	37
6	Microscopía de fluorescencia, objetivo 100X. a) Sin filtro. b) Con filtro B.	38
7	Conteo en placa con diferentes temperaturas de incubación (log ufc/mL) y recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) de <i>D. hansenii</i> .	39
8	Conteo en placa con diferentes valores de pH (log ufc/mL) y recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) de <i>D. hansenii</i> .	40
9	Conteo en placa con diferentes velocidades de agitación (log ufc/mL) y recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) de <i>D. hansenii</i> .	41

10	Conteo en placa con diferentes medios de cultivo (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de <i>D. hansenii</i> .	42
11	Cultivo en medios definidos 2 (a) y 3 (b) sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i> .	43
12	Conteo en placa con diferentes fuentes de carbono (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de <i>D. hansenii</i> .	44
13	Evaluación del medio definido 3 con diferentes fuentes de carbono para el cultivo de <i>D. hansenii</i> .	44
14	Conteo en placa (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de <i>D. hansenii</i> con diferentes fuentes de nitrógeno.	45
15	Conteo en placa (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de <i>D. hansenii</i> con diferentes relaciones C/N, utilizando cloruro de amonio (NH ₄ Cl) como fuente de nitrógeno y glicerol (C ₃ H ₈ O ₃) como fuente de carbono.	46
16	Cinética de crecimiento de <i>D. hansenii</i> en un reactor biostat a plus con 4 L de volumen de operación. Conteo en placa de (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de <i>D. hansenii</i> .	47
17	Variación de las condiciones de operación (pH, pOD ₂ %, temperatura, rpm) durante la cinética de crecimiento de <i>D. hansenii</i> en un medio de cultivo limitante, en un reactor biostat	48

	a plus con 4 L de volumen de operación.	
18	Muestra del cultivo (48 h) de <i>D. hansenii</i> en el medio definido 3, analizado con objetivo 100X.	49
19	Reactor biostat a plus en el que se realizó la fermentación de <i>D. hansenii</i> con el medio definido 3. a) Tiempo de fermentación 2 h. b) Tiempo de fermentación 60 h.	49
20	Extracto celular en acetona. a) Acetona (izquierda) y acetona más sedimento celular (derecha). b) Acetona (izquierda) y acetona más sedimento celular (derecha) con luz ultravioleta (365 nm).	50
21	Evaluación de la relación más adecuada del disolvente para la fase móvil. a) Relación de disolventes. b) y d) Placas resultantes bajo luz ultravioleta (365 nm). c) Placas resultantes bajo luz ultravioleta (265 nm).	50
22	Cromatografía en capa fina. a) Cámara para cromatografía. b) Placa resultante bajo luz ultravioleta (365 nm). c) Placa resultante bajo luz ultravioleta (265 nm).	51
23	Espectro infrarrojo de acetona	52
24	Espectro infrarrojo del compuesto fluorescente en acetona	53
25	Espectro raman del compuesto 1.	54
26	Espectro raman del compuesto 2.	54
27	Secciones analizadas del compuesto 1 (b) y compuesto 2 (a) por espectroscopía Raman.	55
28	Resonancia magnética nuclear del compuesto 2.	57
29	Espectro bidimensional ¹ H-cosy (espectroscopía de correlación) del compuesto 2.	58
30	Resonancia magnética nuclear del compuesto 1.	58
31	Espectro bidimensional ¹ H-cosy (espectroscopía de correlación) del compuesto 1.	59
32	a) Equipo de resonancia magnética nuclear. b) Disolvente,	59

	acetona deuterada. c) Tubo. d) Muestra.	
33	2-penteno (CHEM-rmn H ⁻¹ estimación).	60
34	Propilamina (CHEM-rmn H ⁻¹ estimación).	61

ÍNDICE DE CUADROS

Figura		Página
1	Métodos utilizados para el estudio de Microorganismos encontrados en el ambiente (Eisen, 2007).	9
2	Áreas de aplicación y ejemplos de productos obtenidos por diferentes microorganismos (Ertola y col., 2006).	11
3	Asimilación de sustratos por <i>D. hansenii</i> (Breuer y Harms, 2006).	18
4	Análisis de secuenciación muestra 1.	35
5	Análisis de secuenciación muestra 2.	36
6	Análisis de secuenciación muestra 3.	36
7	Posibles asignaciones de frecuencias vibracionales obtenidas por Raman de los compuestos 1 y 2.	55
8	Posibles asignaciones a las frecuencias vibracionales de los protones obtenidas por H^{-1} -rmn del compuesto 2.	57
9	Protocolo de la predicción de H^{-1} rmn.	60
10	Protocolo de la predicción de H^{-1} rmn.	61

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar expresamos el más sincero agradecimiento a nuestro director de tesis, Dr. Jorge N. Gracida Rodríguez, por permitirnos participar en sus ideas y proyectos, así como por su apoyo, paciencia y dedicación. A nuestros sinodales, el Dr. Aldo Amaro Reyes, Dra. Blanca E. García Almendárez y el Dr. Carlos Regalado González, quienes tuvieron la paciencia para aconsejarnos y guiarnos durante el proceso.

Agradecemos al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación (FOFI) por su apoyo (Fondo: 1299, Programa: 20501155) y por el financiamiento del proyecto ya que facilitó los medios para la elaboración del mismo. Así mismo damos las gracias a la Dirección de Servicios Escolares y la Dirección de Investigación y Posgrado, cuyo personal nos apoyó en todo momento.

Del mismo modo a los Directores y Coordinadores de investigación por el tiempo que brindaron para revisar y mejorar el proyecto. Agradecemos también a todas las personas implicadas directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo.

Por su apoyo en el desarrollo del proyecto y el uso de sus instalaciones, agradecemos al Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (Ceaca) con el Dr. Gustavo Pedraza Aboytes, al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) con el Dr. Víctor Eric López y López, al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) con el Ing. David Zamora García y finalmente al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) con el Dr. Luis Antonio Ortiz Frade.

Finalmente a nuestras familias por su apoyo constante y por creer en nosotras en todo momento.

RESUMEN

Actualmente se estima que se han logrado aislar entre un 10 y 15 % del total de los microorganismos en el planeta. La investigación de microorganismos en cavernas es limitada en la actualidad, sin embargo representan un nicho de oportunidad por las condiciones extremas que ofrecen para el desarrollo de vida. En experimentos previos se muestreó dentro de una caverna (20°01'07" N, 97°31'16" O), en Cuetzalan Puebla, México; donde se identificó la presencia de un microorganismo que emite fluorescencia bajo luz UV. Se evaluaron las características morfológicas y se realizó la secuenciación para identificar su género y especie. *Debaryomyces hansenii*, la levadura resultante, que de acuerdo a la literatura y los experimentos mencionados puede crecer en condiciones limitantes. La autofluorescencia de *Debaryomyces hansenii* se comprobó por microscopia de fluorescencia. Posteriormente se evaluaron las condiciones de crecimiento más adecuadas y su relación con la síntesis de la molécula fluorescente. En donde se probó que las variables más adecuadas fueron, 20 °C, pH 7, glicerol como fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, en una relación C/N 7:1. Finalmente la purificación parcial se llevó a cabo en dos etapas: aislamiento del complejo por extracción con solventes orgánicos y cromatografía en capa fina, observando dos compuestos diferentes. Las muestras seleccionadas fueron analizadas para su caracterización por espectrometría infrarroja, espectroscopía raman y resonancia magnética nuclear, los análisis muestran una similitud entre los dos compuestos por lo tanto se infiere que se trata de moléculas de la misma familia. Las predicciones en base a las técnicas analíticas realizadas permitieron realizar un acercamiento estructural de la molécula fluorescente, concluyendo que se trata de un compuesto alifático con posibles grupos nitrogenados.

1. ANTECEDENTES

La fluorescencia es la emisión de luz de un color característico a una longitud de onda determinada. En ella las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética, tiene lugar únicamente durante el estímulo que la provoca (Lucas, 2009). Las técnicas cuyo principio se basa en la fluorescencia se han establecido firmemente, son ampliamente empleadas como herramientas en las ciencias analíticas y son ahora rutinariamente empleadas en la detección, cuantificación, identificación y caracterización de compuestos orgánicos e inorgánicos, estructuras y procesos biológicos (Wang, 1996). Su alta sensibilidad y selectividad inherente ha sido la mayor fuerza conductora para su desarrollo. Esta tendencia ha sido muy acelerada por los avances en reactivos e instrumentación de fluorescencia llevados a cabo hace algunos años (Haugland y col., 1996; Soper y col., 1994).

El desarrollo de fluoróforos ha permitido un avance significativo en las técnicas antes mencionadas. La mayoría de los fluoróforos son compuestos orgánicos con una estructura cíclica, ahora también se conocen inmunoconjugados de ficoproteínas y quelatos de metales (Fuentes y col., 1998). El número de oportunidades experimentales y de aplicaciones es extenso. Las moléculas fluorescentes, cuyos espectros o rendimientos cuánticos son sensibles a su entorno, son valiosas en el estudio de medios heterogéneos, medios organizados y medios biológicos, y muchos colorantes fluorescentes solvatocrómicos han sido desarrollados para estas aplicaciones (Reichardt, 1994; Suppan, 1997).

El descubrimiento de proteínas fluorescentes nativas de organismos acuáticos que poseen bioluminiscencia representó una revolución en la biología celular. Existen proteínas fluorescentes naturales que emiten fluorescencia en intervalos de distintos colores, como verde y rojo; este último proveniente del coral *Discosoma*

sp. (Shaner y col., 2004). Otras proteínas verdes fluorescentes se atribuyen a organismos como *Renilla reniformis* (Loening y col., 2007).

La proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein) que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible fue encontrada originalmente en especies de medusa *Aequorea aequorea* y descubierta en 1961 por Osamu Shimomura. Posteriormente fue aislada de la medusa *Aequorea victoria* (organismo de clase Hydrozoa) en 1962. El gen que codifica esta proteína ha sido clonado y se utiliza habitualmente en biología molecular. Esta proteína y sus derivados se han vuelto extremadamente útiles y unas de las proteínas fluorescentes para detección más utilizadas (Shimomura y col., 2004). Sin embargo, los organismos de la clase Hydrozoa y Anthozoa no son los únicos con la capacidad de sintetizar compuestos fluorescentes, ahora se conocen algunos microorganismos capaces de sintetizar compuestos con esta característica (Determann, 1998).

1.1 Luminiscencia

La luminiscencia es la emisión de luz desde cualquier sustancia y ocurre desde un estado electrónicamente excitado. La palabra luminiscencia, del latín *lumen* que significa luz, fue introducida como *luminescenz* por primera vez por el físico alemán e historiador de la ciencia Eilhardt Wiedemann en 1888 para describir “todos los fenómenos de luz que no están condicionados por el aumento de temperatura”, a diferencia de la incandescencia. Luminiscencia es “luz fría”, mientras que la incandescencia es “luz caliente”. La luminiscencia se clasifica en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado (Lakowicz, 2006). La diferencia entre estas radica entre el tiempo de emisión entre la absorción y emisión de luz, se da en el orden de 10^{-8} s en la fluorescencia y 10^{-3} s a 1s en la fosforescencia donde es mucho más lento el proceso. La fluorescencia se emite únicamente mientras dura el estímulo y la fosforescencia puede durar algunos minutos después luego de recibir el estímulo. Es un fenómeno físico mediante el cual ciertas sustancias absorben energía en forma de radiación

electromagnética emitiéndola en una longitud de onda mayor en un período de tiempo muy corto, es decir mientras dura el estímulo.

1.2 Fluorescencia

Es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las moléculas excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones (Medina, 2009). Los fotones emitidos por fluorescencia tienen menos energía que los absorbidos, es decir, poseen una menor frecuencia y emiten a una mayor longitud de onda (proceso de emisión de luz que acompaña a la transición electrónica en una molécula, desde el estado excitado S_1 hasta el nivel electrónico de menor energía, el estado fundamental S_0 (Figura 1)). La absorción de luz ocurre sólo si la energía de la radiación corresponde a la diferencia de energías entre los estados fundamental y excitado. Como consecuencia de este proceso, se generan sus correspondientes estados excitados, que se caracterizan por su energía, tiempo de vida y estructura (Fernández, 2001).

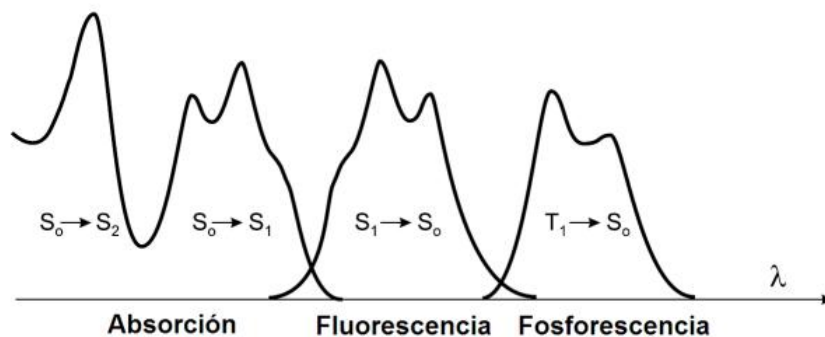


Figura 1. Posiciones relativas de los espectros de absorción fluorescencia y fosforescencia (Gidi, 2011).

El resultado de la fluorescencia es el proceso en el que ciertas moléculas son capaces de absorber energía de una longitud de onda específica y a volverá a

emitir en otra longitud de onda mayor, es decir con menor energía. Los fluoróforos son las moléculas que producen fluorescencia y se han descrito algunas características que generalmente estas moléculas poseen, como son sus grupos funcionales debido a la electronegatividad de sus electrones, principalmente son moléculas orgánicas poliaromáticas o heterocíclicas (Hrudayanath y col., 2012).

Cuando el fluoróforo absorbe luz uno de sus electrones pasa a un estado excitado (de mayor energía) que es inestable y al regresar a su estado basal, el diferencial de energía se libera en forma de luz pero en una longitud de onda mayor (menor energía) a la de excitación. La fluorescencia que se ha reportado con mayor utilidad en los diferentes trabajos es aquella que presenta grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y acíclicas con grupos carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados también pueden presentar fluorescencia (Zacharias y col., 2006).

1.3 Fluoróforos

Las moléculas que emiten fluorescencia se denominan fluoróforos y se consideran dos tipos: endógenos y exógenos.

Los endógenos, tejidos biológicos que emiten fluorescencia cuando son excitados con luz UV o visible. Esta fluorescencia ocurre de manera natural y frecuentemente se la llama autofluorescencia. Las moléculas responsables de la autofluorescencia en el tejido (oxi y deoxihemoglobina, melanina, mioglobina, NAD[P]H, etc.) han sido estudiadas (Richards y Sevic, 1996) y los correspondientes espectros de emisión y excitación han sido publicados también (Wagnières y col., 2008). Los fluoróforos endógenos se pueden clasificar en cuatro grupos: porfirinas, aminoácidos y proteínas, flavinas y nucleótidos (Gillenwater y col., 1998).

Por su parte, los exógenos, son moléculas artificiales que se unen químicamente a otras moléculas no fluorescentes para generar nuevas moléculas fluorescentes.

Las anteriores son muy sensibles a su entorno; por ejemplo, cambios en el pH. La mayoría de fluoróforos exógenos se derivan de la fluoresceína (Chang y col., 1997). La nueva generación de fluoróforos como el “dylight fluor” y bodipy (Thermo Fisher Scientific) son generalmente más fotoestables, brillantes y menos sensibles al pH que otros marcadores estándar (Demchenko, 2009).

La fluorescencia más intensa y útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en solución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación. La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima y los cambios correspondientes en los picos de fluorescencia. Empíricamente se encuentra que la fluorescencia está particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico (Medina, 2009).

La fluorescencia está asociada a diferentes grupos funcionales que se han descrito en numerosos trabajos, podemos encontrar anillos heterocíclicos con oxígenos, y en donde también se han utilizado ácidos carboxílicos como marcadores. Los oxobenzopiranos resultan moléculas interesantes debido a que su rango de emisión es alto, son fotoestables y son solubles en diferentes solventes. La emisión de fluorescencia puede asociarse a cambios de otras condiciones si se construye un sistema dependiente, crear sensores capaces de monitorear diferentes procesos complejos intracelulares, visualización de señales en cascadas y su actividad (como calcio y potasio), voltaje, cambios de pH, respuesta de segundos mensajeros, actividad enzimática, interacciones proteína-proteína y cambios conformacionales (Gálvez, 2004).

1.4 Proteínas fluorescentes

Desde 1990 las proteínas fluorescentes han sido invaluable como una herramienta para un gran número de técnicas. Su influencia en biología celular, biología molecular y en muchas otras disciplinas está incrementando. En el 2008 Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien ganaron el premio Nobel en Química por el descubrimiento y el desarrollo de GFP. Esta proteína ha resultado ser muy versátil y segura por sus características. Un aspecto interesante de GFP es que trabaja casi de manera autocatalítica, lo que significa que no requiere de enzimas o cofactores para su maduración, a excepción del oxígeno. De este modo GFP puede ser utilizada en un gran número de organismos. La proteína ha sido expresada exitosamente en bacterias, levaduras, plantas, nemátodos, invertebrados y vertebrados (Moeyaert, 2010).

La proteína verde fluorescente GFP tiene como característica un cromóforo p-hidroxilbenzilideneimidazolinona que se encuentra sujeto a la hélice, el cromóforo se forma por ciclación espontánea y la oxidación de tres aminoácidos (Ser, Try, Gly), sea crea un anillo fenólico por un ataque nucleofílico a partir de la formación de imidazolina y la reacción del grupo amino. Estas reacciones llevan consecuentemente a la proteína a producir absorbancia y fluorescencia. *Aequorea victoria* no requiere sustratos exógenos ni cofactores para producir fluorescencia.

La clasificación de las variantes de la GFP actualmente son varias, usadas específicamente para diferentes longitudes de absorción y emisión. Son diversas porque toman en cuenta distintas características, como la estructura del cromóforo. (Zacharias y Tsien, 2006). Desde el momento en el que fue notorio el potencial que tiene la GFP en diversas áreas se inició una investigación por proteínas fluorescentes con propiedades espectroscópicas diferentes. La investigación de proteínas similares (Figura 2) expandió significativamente el intervalo de colores disponibles para aplicaciones biotecnológicas (Mikhail y col., 2002).

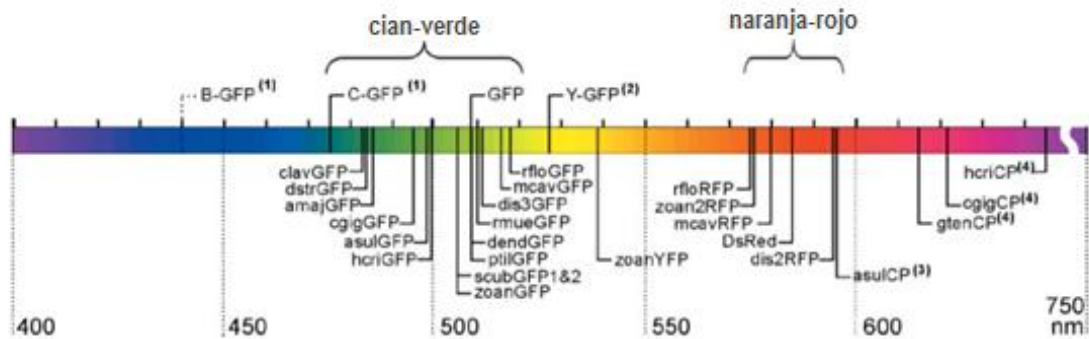


Figura 2. Colección de proteínas similares a *gfp* y sus variantes disponibles para aplicaciones biotecnológicas. *Gfp* de *A. victoria* y sus mutantes se muestran sobre la barra. Los nombres de las proteínas siguen la nomenclatura indicada en referencias (Labas y col., 2002).

Son múltiples las aplicaciones de las proteínas verdes fluorescentes, entre las más comunes está el uso como marcadores y a su vez como indicador de estados químicos fisiológicos intracelulares en todo tipo de células, reflejando la expresión de la proteína de interés o su ubicación subcelular. La proteína verde fluorescente resulta excelente marcador debido a que no tienen interferencia con el mecanismo fisiológico de la célula.

Actualmente la fluorescencia asociada a moléculas usadas como marcadores se utiliza en conjunto con otras técnicas que ofrecen una ventaja superior en el análisis de resultados, como ejemplo la microscopia de fluorescencia que es utilizada en tejidos *in vivo*, de esta manera se puede apreciar la dinámica del sistema. La identificación de compuestos mediante el marcaje es una de las metodologías más usadas con fines bioanalíticos, donde se utilizan materiales radiactivos o compuestos que adsorben en la región ultravioleta o infrarroja de el espectro electromagnético. El uso de moléculas orgánicas es importante para diferentes aplicaciones, las moléculas fluorescentes orgánicas utilizadas generalmente forman enlaces covalentes o no covalentes con la muestra a

analizar, interactuando y formando conjugados que absorban diferentes longitudes de onda dependiendo del compuesto (Sameiro, 2009).

La fluorescencia que es emitida por la excitación de las moléculas con luz ultravioleta en biomoléculas es producida por las proteínas y los aminoácidos, el uso de estas herramientas en biotecnología se ha extendido como ejemplo en el control de fermentaciones en biorreactores, así como la detección de bacterias capaces de agruparse u organizarse en biopelículas o exopolisacáridos que forman canales de circulación con diferentes nutrientes, que a su vez funcionan como una barrera resistente de contaminación para muchos experimentos. Particularmente el interés de nuevas moléculas que funcionen como fluoróforos con absorción y emisión en longitudes de onda visible es de mucha importancia en los procesos biológicos (Trejos y col., 2009).

1.5 Potencial biotecnológico de microorganismos

Actualmente se estima que se han logrado aislar entre un 10 y 15 % del total de los microorganismos (bacterias, levaduras, protozoos, etc.) existentes en el planeta, por lo que todavía hay un gran número de ecosistemas (cavernas, volcanes, medios salinos, etc.) que ofrecen una variedad desconocida de ellos (Schabereiter y col., 2002). En este punto recae la importancia del estudio de nuevas especies y de ecosistemas con condiciones diferentes. Esto puede enriquecer el campo de aplicación para mejorar, optimizar y generar alternativas a problemas de interés primario.

Desde su descubrimiento en 1670 por Anton van Leeuwenhoek, se ha obtenido una gran cantidad de información sobre los microorganismos y su importancia en la salud humana, agricultura, industria, ecosistemas, ciclos bioquímicos globales y sobre su origen y evolución. Uno de los pasos más importantes en el estudio de cualquier ecosistema involucra la identificación de los tipos de organismos. Sin embargo, la apariencia física no provee una imagen taxonómica válida de los microorganismos. La apariencia evoluciona tan rápido que dos especies

relacionadas pueden lucir completamente diferentes y dos especies sin relación pueden lucir de la misma manera. Por esta razón es importante identificar con precisión cada microorganismo y posteriormente es necesario realizar evaluaciones para visualizar su potencial. A través de los años se han desarrollado diversas técnicas para cumplir estos propósitos, cada una con diferentes ventajas y desventajas como se puede apreciar en el Cuadro 1 (Eisen, 2007).

Cuadro 1. Métodos utilizados para el estudio de microorganismos encontrados en el ambiente (Eisen, 2007).

Método	Características	Comentarios
Microscopia	Los fenotipos pueden ser estudiados a través de microscopios. En conjunto con otros métodos, como tinción, la microscopia puede ser utilizada para identificar especies y hacer inferencias sobre sus procesos biológicos.	La apariencia de los microorganismos no es un indicador confiable.
Cultivo	Las células de microorganismos son cultivadas individualmente. Puede realizarse en medios líquidos o sólidos.	Esta es la mejor manera para aprender sobre la biología de un microorganismo en particular. Sin embargo gran parte de los microorganismos no pueden ser cultivados debido a los requerimientos que presentan.
rRNA-PCR	Los aspectos clave de este método son los siguientes: a) Los organismos unicelulares poseen los mismos genes rRNA. b) PCR es utilizado para realizar millones de copias de cada gen presente en la muestra, esto amplifica la señal de rRNA que se encuentra relacionada con genes presentes en los organismos. c) Los análisis filogenéticos y de secuenciamiento brindan información de los genes sobre su	Este método revolucionó la microbiología en 1980 permitiendo la caracterización e identificación de los tipos de microorganismos presentes en las muestras. A pesar de las ventajas obtenidas por esta técnica, el proceso puede no ser adecuado en algunas situaciones.

	ubicación en el árbol de la vida, esta información es utilizada para inferir el tipo de microorganismo y su procedencia. d) El número de cada microorganismo es estimado en base a los resultados obtenidos.	
Secuenciamiento genómico	Se aísla el DNA de los microorganismos y se rompe en fragmentos, posteriormente son secuenciados. Los fragmentos son ensamblados en piezas más grandes en base a los análisis del proceso y finalmente el genoma completo puede ser determinado relacionando las secuencias obtenidas.	Esta técnica ha sido aplicada ampliamente en una gran cantidad de microorganismos e incluso en especies multicelulares. Ha brindado un mayor entendimiento de la biología y de la evolución. Sin embargo, aun presenta limitaciones en su proceso.
Metagenómica	En este caso el DNA se asila de muestras ambientales y es secuenciado posteriormente. Es posible seleccionar secciones particulares para los análisis y de este modo obtener información sobre una gran cantidad de microorganismos.	La metodología utilizada permite obtener información sobre los genomas y realizar predicciones sobre las funciones biológicas de una gran cantidad de microorganismos sin la necesidad de cultivarlos.

Aproximadamente el 99 % de todas las especies de microorganismos en ambientes externos no se manejan bajo condiciones de laboratorio y representan una fuente importante para la producción de metabolitos. Se ha reportado que muchos de ellos producen compuestos de interés con nuevas estructuras o modos de acción, algunos ejemplos pueden observarse en el Cuadro 2 (Ling y col., 2015).

Las cuevas son un nicho de oportunidad para la investigación de nuevos microorganismos y la producción potencial de metabolitos valiosos a partir de estos. Las cuevas son lugares con escasos nutrientes, ecosistemas oscuros con bajas temperaturas y humedad relativamente alta en la gran mayoría. A pesar de

las condiciones extremas que ofrecen para el desarrollo de vida, son colonizadas por una gran diversidad de microorganismos con propiedades extremófilas, como diversidad microbiana psicrófila y psicrotolerante capaz de crecer bajo estas condiciones (Schabereiter y col., 2002a; Barton y Northup, 2007). Se ha relacionado la actividad microbiana con los procesos de desintegración y formación de salitre, con la acumulación de minerales y óxidos, coloraciones y depósitos de sustancias (Castanier y col., 2000). Actualmente se ha publicado en varios trabajos acerca del aislamiento de bacterias psicrotolerantes provenientes de ecosistemas con temperaturas bajas y su actividad enzimática, las cuevas aun siguen siendo ecosistemas inexplorados como objeto de investigación (Engel, 2010).

Uno de los mecanismos esenciales para la adaptación de los microorganismos a ambientes fríos es la actividad de sus enzimas a bajas temperaturas. Hay un creciente interés en microorganismos psicrotolerantes y su actividad enzimática en estas temperaturas por su gran potencial. Ofreciendo numerosas ventajas económicas y ecológicas, debido a estas propiedades únicas, podrían ser de gran utilidad en diferentes campos biotecnológicos, como por ejemplo la industria alimentaria, la biotransformación, biorremediación, biología molecular, biosensores, biomarcadores, etc. (Russell, 1998; Cabeza y col., 2011; Cavicchioli y col., 2011).

Cuadro 2. Áreas de aplicación y ejemplos de productos obtenidos por diferentes microorganismos (Ertola y col., 2006).

Área	Microorganismos	Productos
Salud	<i>Bordetella pertusis</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Propionebacterium sp.</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Streptomyces sp.</i> Varias <i>Bacillus sp.</i> <i>Rhizopus nigricans</i> <i>Curvularia lunata</i>	Vacuna triple Vitamina B12 Penicilina, estreptomicina Tetraciclina y otros antibióticos Compuestos esteroidales

	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>E. coli</i> recombinante <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Recombinante	Interferon, insulina Vacuna contra virus hepatitis B
Alimentos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Saccharomyces sp.</i> Varios <i>Corynebacterium</i> y <i>Brevibacterium sp.</i> Varias y auxotróficas diversas <i>Acetobacter aceti</i> <i>Bacillus sp.</i> Varios <i>Blakeslea trispora</i> <i>Streptomyces chrestomyceticus</i> <i>Dunaliella sp.</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus sp.</i> Varias <i>Penicillium sp.</i> Varias	Levadura de panificación Yoghurt Vino, cerveza, sidra Ácido glutámico y otros aminoácidos Vinagre Saborizantes Carotenoides Quesos
Producción vegetal	<i>Rhizobium sp.</i> (varios) <i>Giberella fujikuroi</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Verticillium lecanii</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>	Inoculantes de leguminosas Ácido giberélico (estimulante del crecimiento vegetal) Bioinsecticidas bacterianos y fúngicos
Producción animal	<i>Candida utilis</i> , y otros <i>Clostridium</i> (varios) <i>Pasteurella multocida</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Brucella abortus</i>	Proteína unicelular Vacunas
Insumos industriales	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zymomonas sp.</i> <i>Clostridium acetobutlicum</i> <i>Bacillus sp.</i> (varios) <i>Aspergillus</i> (varios) <i>Trichoderma reseei</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Xanthomonas campestris</i>	Etanol Butanol, acetona Enzimas industriales (amilasas, proteasas, celulasas, glucosa isomerasa, pectinasas) Ácido cítrico Ácido glucónico Goma xantano
Minería	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> y otras sp.	Cobre, uranio y otros
Servicios	Especies aerobias y anaerobias varias	Efluentes purificados

Nuestro conocimiento sobre la microbiología presente en cuevas es escaso. Pueden ser consideradas como ambientes extremos (fuentes de nutrientes escasas, altas concentraciones de sales, poca luz, temperatura, etc.) y por lo tanto proveen nichos ecológicos para microorganismos altamente especializados (Schabereiter y col., 2002b). Esos microorganismos llamados extremófilos, producen enzimas que son funcionales bajo condiciones extremas (Van den Burg, 2003). Por lo tanto existe un gran potencial en las cuevas para estudiar los microambientes que se generan. En estudios realizados en estos ecosistemas se han encontrado una gran variedad de microorganismos con potencial biotecnológico (Vasileva y col., 2013). Entre ellos se han encontrado levaduras con potencial para la producción de nuevos metabolitos.

La importancia de las levaduras se conoce desde hace mucho tiempo y con el desarrollo de la industria. Se están utilizando no sólo para la elaboración de un gran número de productos fermentados (cerveza, vino, quesos y embutidos), sino también para la producción de antibióticos, vitaminas, enzimas, etc. *Debaryomyces hansenii* es un microorganismo versátil, no patógeno, oleaginoso, osmotolerante y halotolerante, lo que representa un campo de investigación para el estudio de su potencial biotecnológico, por lo tanto el interés en el estudio de la fisiología y la bioquímica de esta levadura está incrementando. Actualmente es empleada en el sector de alimentos y está creciendo su uso para la producción de una gran variedad de compuestos químicos (glicerol, amonio, miocina, etc.) (Breuer y Hauke, 2006).

1.6 Levaduras

Las levaduras por definición son hongos unicelulares, usualmente de forma ovalada, con estados vegetativos que se reproducen predominantemente por gemación o fisión, dando por resultado crecimiento unicelular (Ochoa y Vázquez, 2004).

Tienen una amplia aplicación en la biotecnología tradicional y moderna. Desde la antigüedad se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas por fermentación. Actualmente son utilizadas como fuentes de obtención de vitaminas del complejo b, pigmentos, cofactores, proteínas de organismos unicelulares, biomasa y otros productos con valor añadido. En las últimas décadas se han venido utilizando como hospederos para la obtención de proteínas heterólogas de organismos eucariontes por vías de la ingeniería genética. Por estas razones se hace imprescindible la identificación exacta y rápida de las levaduras de interés industrial, clínico y ambiental. Aunque son variadas las aplicaciones en el campo de la biotecnología que se le atribuyen a las levaduras, aún quedan muchos hábitats naturales por explorar en busca de nuevas especies, de forma tal que puedan diseñarse tecnologías novedosas protagonizadas por estos microorganismos (Orberá, 2004).

1.7 *Debaryomyces hansenii*

1.7.1 Descripción del género *Debaryomyces*

Debaryomyces hansenii es una levadura clasificada como no convencional, característicamente eurihalina y criotolerante, fue aislada originalmente del mar siendo clasificada como levadura marina (Segal y col., 2010). El género *Debaryomyces* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae* y, dentro de él se reconocen 15 especies: *D. carsonii*, *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. etchellsii*, *D. hansenii*, *D. maramus*, *D. melissophilus*, *D. nepalenses*, *D. occidentalis*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae*, *D. udenii*, *D. vanrijiae* y *D. yamadae* (Kurtzman y Fell, 1998, Barnett y col. 2000). La comparación de las secuencias de ARN ribosomal dio lugar a la transferencia de varias especies de otros géneros y, principalmente, de la especie *Schwanniomyces occidentalis* al género *Debaryomyces* (Kurtzman y Robnett, 1991). Se ha secuenciado el genoma completo de *D. hansenii*, con lo que se abre paso a futuras exploraciones sobre las funciones de los genes que en su mayoría son desconocidas (Prista y col., 2002, Sherman y col., 2004).

Estudios filogenéticos basados en el análisis de la secuencia ribosomal de RNA codificando genes mostraron que las especies de *Debaryomyces* son muy heterogéneas y están distribuidas en cinco clases nombradas de acuerdo a sus representantes *D. hansenii*, *D. polymorphus*, *D. etchellsii*, *D. melissophilus* y *D. occidentalis* (Saluja y Prasad, 2007). Este grupo heterogéneo de levadura ha sido asignado recientemente a tres géneros, *Debaryomyces*, *Schwanniomyces* y *Priceomyces*. De estos, *Debaryomyces* comprende únicamente las especies relacionadas estrechamente con *D. hansenii* (Kurtzman y Suzuki, 2010).

La especie *Debaryomyces hansenii* se subdivide en dos subespecies, *hansenii* y *fabryii*. Estas subespecies se pueden distinguir por la diferente movilidad electroforética de sus respectivas glucosa-6-fosfato deshidrogenasas y por las temperaturas máximas de crecimiento que presentan, 31-35 °C para la subespecie *hansenii* y 36-39 °C para la subespecie *fabryii* (Kurtzman y Fell, 1998 y Barnett y col., 2000). Se ha reportado que la temperatura óptima de crecimiento es de 20-25 °C, pero llega a crecer en temperaturas entre 5-10 °C e incluso hay reportes que indican su crecimiento en temperaturas menores de 0 °C (Breuer y Harms, 2006). Por otro lado, se conoce que *D. hansenii* crece a pH diferentes, entre 4 y 9, aunque no tan eficiente como en el intervalo de 5 a 7. Adicionalmente, la levadura muestra poco crecimiento en ausencia de oxígeno. (Ochoa y Vázquez, 2004).

La diferenciación de las levaduras pertenecientes a *D. hansenii* (*D. hansenii* y *D. fabryii*) nunca ha sido sencilla utilizando métodos moleculares y fenotípicos tradicionales. Se realizan acercamientos para su identificación, como la determinación de secuencias rDNA, la reasociación de los valores DNA:DNA, así como la caracterización de la temperatura máxima de crecimiento o la presencia o ausencia de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Kurtzman y Robnett, 1998; Nakase y Suzuki, 1985a, 1985b).

Las especies de *Debaryomyces* son haploides y homotalicas, aunque cepas diploides o parcialmente diploides han sido caracterizadas también recientemente.

(Jacques y col., 2009; Suzuki y col., 2011). *D. hansenii* es un ascomiceto, esto es, una levadura con capacidad de reproducción sexual por ascosporas. *Candida famata* es la forma imperfecta (carece de reproducción sexual) de *D. hansenii*. Su reproducción asexual es por gemación multipolar. Se aísla de diversos ecosistemas como el suelo, maderas, el mar, ríos, lagunas, plantas, alimentos y muestras clínicas.

D. hansenii puede proliferar en una gran variedad de nichos ecológicos, para lo que necesariamente tiene que desplegar una respuesta fisiológica adaptativa (Segal y col., 2010). Debido a esta característica se pueden aprovechar metabolitos producidos por las respuestas adaptativas que presenta. Por ejemplo, se ha registrado que varios tipos de levaduras marinas de los géneros *Candida* y *Debaryomyces* aisladas de zonas costeras han sido registradas como productoras de alcohol, casi tan eficientes como las levaduras convencionales. *D. hansenii* ha sido de utilidad en procesos industriales para la producción de xilitol a partir de extractos de madera (Ochoa y Vázquez, 2004).

Esta levadura muestra propiedades importantes, *D. hansenii* es una especie caracterizada por su tolerancia a NaCl y por su resistencia a pH ácido (Kurita y Yamazaki, 2002). Tiene además una tolerancia elevada al estrés químico, provocado porque concentraciones elevadas de diversos sustratos pueden ser utilizadas para su cultivo. Por ejemplo, desde hace más de 30 años se demostró que esta levadura tiene la capacidad de resistir altas concentraciones de NaCl por lo que originalmente se le consideró el modelo eucariótico ideal para estudios de halotolerancia.

Posteriormente, se demostró que esta levadura puede acumular altas concentraciones de Na⁺ intracelular, que el Na⁺ mejora su funcionalidad bajo diferentes condiciones de estrés y que la acumulación de sodio intracelular, hasta de 800 mM, no ejerce algún efecto tóxico en su metabolismo (Prista y col. 2002), se ha detectado también que *D. hansenii*, acumula glicerol como soluto compatible y

debido a estas características se considera como un organismo halófilo de comportamiento sodio-incluyente (Ochoa y Vázquez, 2004). Otro ejemplo es la capacidad que presenta para sintetizar, acumular y almacenar lípidos, esto puede ser ventajoso para la producción biotecnológica de productos naturales y artificiales (Breuer y Harms, 2006). Debido a las diferencias fenotípicas entre cadenas, así como variaciones en su habilidad para asimilar y fermentar diferentes fuentes de carbono (Cuadro 3), la expresión de diferentes actividades lipasas y proteasas y sus diversas condiciones óptimas de crecimiento se ha demostrado que *D. hansenii* es altamente heterogénea, y por lo tanto versátil (Breuer y Harms, 2006).

En general, no se conoce mucho acerca del metabolismo del género *Debaryomyces*. No obstante, se sabe que las especies de este género son anaerobias facultativas y que pueden metabolizar diferentes azúcares como la glucosa, sacarosa, galactosa, lactosa, almidón soluble, etanol, glicerol, succinato, D y L-lactato y citrato (Nakase y col., 1998). La especie *D. hansenii* posee lipasas intra- y extracelulares que hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos, que posteriormente son metabolizados fundamentalmente por β -oxidación (Sorensen y Samuelsen, 1996; Sorensen, 1997,). Son capaces de asimilar numerosas fuentes de nitrógeno como sulfato amónico, urea, nitrito, bases púricas y aminoácidos (Orberá, 2004). No son capaces de asimilar nitrato y CoQ9 es la ubiquinona principal en las membranas mitocondriales (Suzuki y col., 2011). Los compuestos nitrogenados son esenciales para el crecimiento y metabolismo de levaduras. Éstas pueden utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno como sulfato amónico, urea, bases nitrogenadas, aminoácidos y también péptidos gracias a que poseen actividades peptidásicas que permiten la hidrólisis de éstos en aminoácidos libres. De hecho es conocido que la adición de peptonas, triptonas y otros hidrolizados de origen animal o vegetal estimulan el crecimiento de las levaduras (Hofman-Bang, 1999).

Cuadro 3. Asimilación de sustratos por *D. hansenii* (Breuer y Harms, 2006).

Glucosa	+	N-Acetil-D-glucosamina	V
Galactosa	+	Metanol	--
L-Sorbose	V	Etanol	+/W
Sacarosa	+	Glicerol	+
Maltosa	+	Eritritol	V
Celobiosa	+	Ribitol	+
Trealosa	+	Galacitol	V
Lactosa	V	D-Manitol	+
Melibiosa	V	D-Glucitol	+/W
Rafinosa	+	α -Metil-D-glucosido	+
Melezitosa	V	Salicina	+/W
Inulina	V	D-Gluconato	+/W
Almidón soluble	V	DL-Lactato	V
D-Xilosa	+	Succinato	+
L-Arabinosa	+/W	Citrato	V
D-Arabinosa	V	Inositol	--
D-Ribosa	V	Hexadecano	V
L-Ramnosa	V	Nitrato	--
D-Glucosamina	V	Nitrito	V
2-Ceto-D-gluconato	+	5-Ceto-D-gluconato	V
Sacarato	--		
+ positivo; W bajo; V variable; -- negativo.			

Las principales enzimas proteolíticas se localizan en la vacuola (lisosoma), aunque no exclusivamente ya que existen proteasas en el citoplasma, en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi, en las mitocondrias y en las membranas que rodean a todos estos orgánulos (Leonhard y col., 2000). En resumen, el proteasoma y las proteasas vacuolares tienen unas especificidades amplias y participan conjuntamente en la degradación masiva de proteínas, necesaria para el recambio proteico, siendo estimuladas cuando existe una limitación de nitrógeno o alta demanda de éste, por ejemplo, en la meiosis o en la esporulación. Los datos bioquímicos de los que se disponen, indican que las proteasas vacuolares se encargan de mantener el nivel basal de recambio proteico de las proteínas de vida larga y de las grandes adaptaciones necesarias cuando se produce un estrés por limitación de nutrientes, y que el proteasoma es el responsable de la degradación

rápida de proteínas de vida corta, incluyendo las proteínas aberrantes. Por el contrario, las proteasas de la ruta secretora tienen unas especificidades muy restringidas y actúan en el procesamiento de proteínas a lo largo de su maduración y de péptidos tales como la feromona o factor α y la toxina *killer* (Bolumar, 2005).

1.7.2 El genoma de *D. hansenii*

La secuenciación del genoma de la cepa *D. hansenii var hansenii* CBS767 reveló que el genoma se compone de siete cromosomas cuyos tamaños están entre 1.25 Mpb a 2.33 Mpb para un total de 12.2 Mpb sin incluir el ADN ribosómico (Dujon y col., 2004). El proyecto Génolevures, una investigación comparativa de genomas de la clase hemiascomicetos, ha reportado que *D. hansenii* parece tener una capacidad codificante alta, equivalente a un 79.2 % del genoma, con 6906 secuencias codificantes que han sido detectadas (Lepingle y col., 2000). Este organismo es también la levadura que posee el genoma más redundante, con 49.2 % comparado con un 40 % en *S. cerevisiae* (Llorente y col., 2000). La flexibilidad que presenta *D. hansenii* en sus características genéticas podrían ser beneficiosas en aplicaciones biotecnológicas, sin embargo no se puede evitar que su complejidad pueda complicar el control de estas mismas aplicaciones (Breuer y Harms, 2006).

1.8 Optimización de medios de cultivo

Para cualquier organismo una eficiente producción de biomasa y de los metabolitos de interés depende en gran medida de las fuentes de nutrientes, su composición y un adecuado balance entre estas. La relación carbono-nitrógeno (C/N) es un factor importante. Aunque la relación C/N de la biomasa fúngica es alrededor de 20:1, se ha encontrado que el valor óptimo de esta relación en los medios de cultivo usados para el crecimiento de hongos y levaduras es específico para cada especie y, en general, es superior al valor presente en la biomasa (Torres y col., 2011). Adicionalmente a una adecuada fuente de carbono y nitrógeno, otros elementos como el azufre, fósforo, potasio y magnesio son esenciales para el crecimiento, ya que forman parte de la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos, ATP, y participan

como cofactores en diversas reacciones enzimáticas entre otras muchas funciones. Igualmente, las vitaminas también juegan un papel esencial en el metabolismo, en su función como coenzimas (Torres y col., 2011).

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autótrofo, que corresponde a microorganismos que obtienen la fuente de carbono del CO₂ como las algas, algunas bacterias, y los heterótrofos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Los requerimientos de factores de crecimiento comprenden ciertos aminoácidos y vitaminas del grupo B como tiamina, riboflavina, ácido pantotémico, niacina, etc., que representan para muchas bacterias y levaduras factores esenciales en los medios sin los cuales no se produce crecimiento celular. Otro factor esencial está determinado por las condiciones del sistema, si es aerobio o anaerobio (Ertola y col., 2012). Por estos motivos es importante adecuar las condiciones de los medios de cultivo para obtener resultados óptimos.

El diseño de un medio de cultivo para un proceso de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Un diseño adecuado considera la evolución de los parámetros de cada proceso. Por este motivo se deben tener en cuenta todos los aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos utilizados. En general, las condiciones de cultivo son tradicionalmente optimizadas por la estrategia de una variable a la vez, es decir, cambiando un factor mientras se mantienen constantes los otros. Aunque esta estrategia es sencilla y no exige aplicar un análisis estadístico, requiere un gran número de experimentos y la interacción entre factores es ignorada (Díaz y col., 2005).

La preparación de medios de cultivo para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa de mucha importancia para asegurar la productividad de los mismos. Un proceso de fermentación es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos en consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas (Ertola y col., 2012). Los medios pueden clasificarse considerando la naturaleza química de los componentes:

- Medios sintéticos o químicamente definidos, cuya composición es específica en base a los requerimientos del microorganismo estudiado.
- Medios complejos en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soja, etc. que aportan las sustancias fundamentales, pero son químicamente indefinidas y de composición variable.

1.8.1 Efectores internos y externos

El comportamiento de un microorganismo en crecimiento es el resultado de la interacción que se produce entre el microorganismo y el medio ambiente en el reactor, y es el resultado de los llamados efectores intra y extra celulares. Los efectores internos están representados por la dotación genética intrínseca del organismo considerado y por sus mecanismos de regulación metabólica. Estos últimos pueden ser modificados por alteraciones del medio ambiente o por los efectores externos. Por lo tanto, el comportamiento de los microorganismos es el resultado de la influencia de las variables de naturaleza física y química que constituyen los efectores externos. Los efectores externos de naturaleza física están vinculados con las condiciones de operación que se utilizan en los reactores y son por ejemplo la temperatura, la agitación, aireación, etc; es decir, están

constituidos por las variables de manipulación física que se fijan o se programan en el curso del proceso de producción. Los efectores externos de naturaleza química están representados por la presencia de componentes en los medios de fermentación. Los componentes de los medios deben cumplir con todos los requerimientos nutricionales, de crecimiento, de formación de productos y además suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular (Ertola y col., 2006). Los elementos básicos para un medio de cultivo pueden resumirse en:

- Macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg.
- Micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro.
- Factores de crecimiento, que están constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc.

1.8.2 Conservación de los cultivos

En todo trabajo de Microbiología es necesario conocer las características del microorganismo con el cual se va a trabajar (propiedades morfológicas y bioquímicas). En este sentido, tanto en la conservación como en el desarrollo del cultivo se deberían usar las mismas técnicas metodológicas para evitar variaciones o pérdida de las características de la cepa empleada. Los objetivos de la conservación de los cultivos se podrían resumir en los siguientes aspectos (Ertola y col., 2006):

- Preservación de la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades.
- Preservación de los niveles de productividad inicial.
- Facilitar el manejo y transporte del cultivo.

Finalmente, este trabajo se centró en la purificación de la molécula que emite fluorescencia a partir de *D. hansenii*, una levadura asilada de una caverna, lo que representa un área de oportunidad para su estudio. Inicialmente se analizaron las condiciones más adecuadas para el cultivo de la cepa y posteriormente se estableció una metodología para la purificación parcial del compuesto de interés seleccionando las condiciones más adecuadas para su separación. La purificación parcial se llevó a cabo en dos etapas: aislamiento del complejo por extracción con solventes orgánicos, cromatografía en capa fina, el análisis para su caracterización estructural por espectrometría infrarrojo, resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía Raman.

2. OBJETIVOS

2.1 General

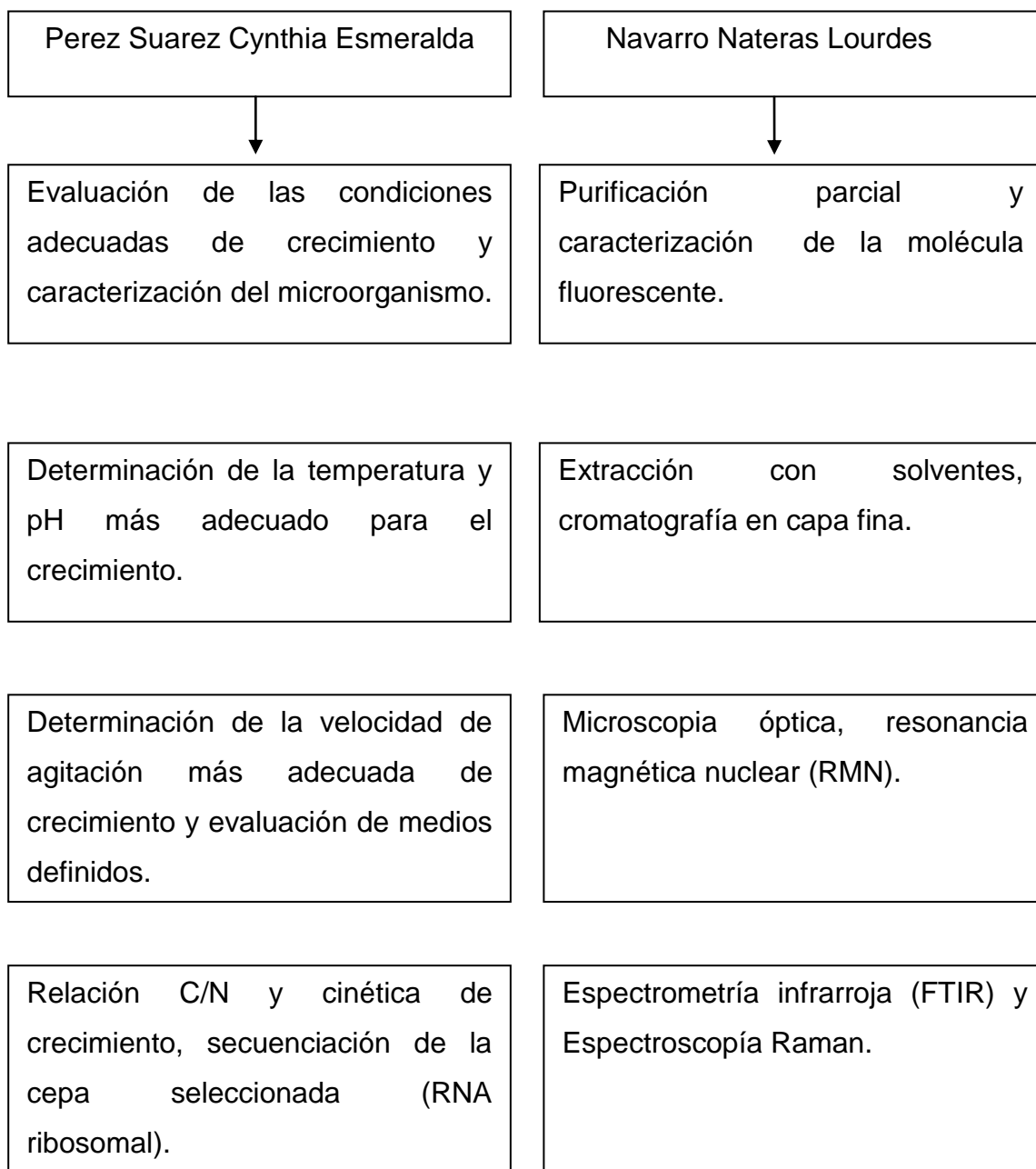
Evaluar y seleccionar las condiciones más adecuadas de crecimiento para *Debaryomyces hansenii*. Purificar parcialmente y caracterizar químicamente la molécula fluorescente producida por la levadura seleccionada.

2.2 Específicos

- Evaluar el efecto de la temperatura, pH, velocidades de agitación, fuentes de carbono y nitrógeno, así como la relación C/N sobre el crecimiento del microorganismo seleccionado.
- Seleccionar un medio definido conveniente para evaluar la cinética de crecimiento del microorganismo seleccionado
- Purificar parcialmente y caracterizar estructuralmente el compuesto fluorescente a partir de análisis de FTIR, Raman y RMN.

3. METODOLOGÍA

Las actividades serán divididas de la siguiente manera en la tesis colectiva “Purificación parcial y caracterización de una molécula fluorescente producida por un microorganismo aislado de una caverna”.



3.1 Microorganismos

En estudios previos el microorganismo fue aislado de la caverna Atepolihui (20°01'07" N, 97°31'16"), en Cuetzalan Puebla, México, se muestreó asépticamente de paredes y techo. La cepa se preservó en glicerol al 35 % - 25 °C (Morales y col., 2010). Para el aislamiento se realizaron siembras de diluciones de las muestras y se inocularon medios ricos a 30 °C, 24 h (caldo nutritivo e infusión cerebro-corazón). De las cepas obtenidas se seleccionó una que bajo luz UV (365 nm, Scorpion scientific 14UV100E-140110-04) emite fluorescencia.

3.2 Secuenciación de de microorganismos

Se enviaron las cepas seleccionadas al Instituto Politécnico Nacional para la identificación a género y especie de los microorganismos. Utilizaron el método de secuenciación de los espaciadores internos transcritos 16S.

3.3 Microscopía óptica

Se trabajó con un microscopio óptico (Leica DM500) con mandos de enfoque macro y micrométricos coaxiales, revólver cuádruple de giro interno (4x, 10x, 40x, 100x). Las muestras celulares fueron tomadas de medios líquidos y colocadas directamente para realizar el análisis morfológico.

3.4 Microscopía de fluorescencia

Este estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Se trabajó con un microscopio olympus CX41 con fuente olympus U-RFL 50. Para el estudio se utilizó el filtro b (CX-DMB-2) con el espejo dicróico DM500, el filtro de excitación BP475 y el filtro de barrera O515IF. Se manejó una longitud de onda entre 400 - 500 nm.

3.5 Determinación de la temperatura más adecuada para el crecimiento de *D. hansenii*

Se evaluó el crecimiento de la cepa seleccionada con 3 temperaturas distintas (20, 30, y 37 °C) utilizando medio ypd (extracto de levadura, peptona, dextrosa) con pH

7. Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio, cada muestra se realizó por duplicado y adicionalmente un control (medio estéril). Se inocularon los medios y se incubaron con agitación (150 rpm) por 72 h.

3.6 Determinación del valor de pH más adecuado para el crecimiento de *D. hansenii*

Se evaluó el crecimiento de la cepa seleccionada con 5 valores de pH distintos (4, 6, 7, 8 y 10) utilizando medio ypd. El pH se ajustó con ácido clorhídrico 1 M y con NaOH 1 M. Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio, cada muestra se realizó por duplicado y adicionalmente un control (medio estéril). Se inocularon los medios y se incubaron con agitación (150 rpm) por 72 h, 30 °C.

3.7 Determinación de la velocidad de agitación más adecuada para el crecimiento de *D. hansenii*

Se evaluó el crecimiento de la cepa seleccionada con 4 velocidades de agitación distintas (sin agitación, 100, 150 y 200 rpm) y adicionalmente un sistema anaerobio, utilizando medio ypd (pH 7). Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio, cada muestra se realizó por duplicado y adicionalmente un control (medio estéril). Se inocularon los medios y se incubaron con agitación por 72 h, 30 °C.

3.8 Evaluación de diferentes medios definidos sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Se seleccionaron 3 medios definidos utilizados en investigaciones anteriores para levaduras y se evaluó el crecimiento de nuestra cepa. En los tres casos la fuente de carbono indicada se sustituyó por glicerol y la fuente de nitrógeno por cloruro de amonio. Se enlistan a continuación:

Medio 1 (Vigliotta y col., 2007), utilizado para el estudio de *Debaryomyces hansenii* (g/L), K₂HPO₄ (0.5 g); MgSO₄ 7H₂O (0.5 g); NaCl (0.3 g); MnSO₄ (20 g); Amonio (0.5 g); Nitrito (1 g).

Medio 2 (Morales, 2012), utilizado para el estudio de fosfobacterias, KH_2PO_4 (4 g); Na_2HPO_4 (6 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g); $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (10 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mg); H_3BO_3 (10 μg); $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (11.19 μg); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (124.6 μg); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (78.22 μg); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (16.8 mg); H_2O (1 L).

Medio 3 (Sawan y Sathyanarayana, 2009), implementado en el estudio de *Debaryomyces nepalensis*, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (10 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g); MgSO_4 (0.1 g); K_2HPO_4 (3 g); Na_2HPO_4 (6 g); H_2O (1 L).

Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio, cada muestra se realizó por duplicado y adicionalmente un control (medio estéril). Se inocularon los medios (pH 7) y se incubaron con agitación (200 rpm) por 72 h, 30 °C

3.9 Evaluación de fuentes de carbono sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Se evaluaron 5 fuentes de carbono (glucosa, xilosa, lactosa, ácido cítrico y glicerol) y como fuente de nitrógeno se utilizó cloruro de amonio. Se seleccionó el medio en el que se encontró mayor producción de biomasa, el pH se ajustó a 7 con ácido clorhídrico 1 M y con NaOH 1 M. Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio, cada muestra se realizó por duplicado y adicionalmente un control (medio estéril). Se inocularon los medios y se incubaron con agitación (200 rpm) por 72 h, 30 °C.

3.10 Evaluación de fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Se evaluaron 5 fuentes de nitrógeno (nitrate de amonio, nitrate de potasio, sulfato de amonio, urea y cloruro de amonio) y como fuente de carbono se seleccionó glicerol. Se seleccionó el medio en el que se encontró mayor producción de biomasa, el pH se ajustó a 7 con ácido clorhídrico 1 M y con NaOH 1 M. Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio, cada muestra se realizó por duplicado y adicionalmente un control (medio estéril). Se inocularon los medios y se incubaron con agitación (200 rpm) por 72 h, 30 °C.

3.11 Evaluación de la relación carbono/nitrógeno sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Se evaluaron 6 relaciones de carbono-nitrógeno (4:1, 7:1, 8:1, 12:1, 16:1 y 20:1; mol de carbono/mol de nitrógeno), utilizando como fuente de carbono glicerol y como fuente de nitrógeno cloruro de amonio. Se seleccionó el medio en el que se encontró mayor producción de biomasa, el pH se ajustó a 7 con ácido clorhídrico 1 M y con NaOH 1 M. Se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio, cada muestra se realizó por duplicado y adicionalmente un control (medio estéril). Se inocularon los medios y se incubaron con agitación (200 rpm) por 72 h, 30 °C.

3.12 Cinética de crecimiento de *D. hansenii*

Con base en los resultados de los experimentos anteriores se seleccionaron las características más adecuadas (medio definido 3, temperatura 20 °C, pH 7, glicerol como fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno) para el crecimiento de la cepa.

La fermentación se realizó en el Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional (CIBA-IPN). Se preparó el preinóculo con 100 mL del medio definido 3, en un matraz de 250 mL y se inoculó con una asada de la cepa. Se incubó con agitación (150 rpm) por 48 h, 20 °C.

La fermentación por lote (batch) se realizó en un reactor (sartorius biostat a plus) con volumen efectivo de 5 L. Se utilizaron 4 L del medio definido 3 y antes de esterilizar el pH fue ajustado a 7.0 con NaOH 1 M. Posteriormente se agregó el preinóculo para iniciar la fermentación. No se controló el pH. No se usaron antiespumantes. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura controlada de 30 °C, 500 rpm Orozco y col. (2008) reportan que es la velocidad de agitación óptima, flujo de aire 5 L/min reportan que es el flujo de aire óptimo. Se tomaron muestras cada 12 h en un periodo de 72 h.

3.13 Métodos analíticos

3.13.1 Conteo en placa

Se realizó el conteo de células viables por el método Miles-Misra. Se realizaron diluciones de muestras de los medios inoculados, se tomaron 10 μL y se colocaron en 990 μL de agua estéril (se realizaron diluciones extras en casos necesarios). Se colocaron gotas de 20 μL en agar ypd y se incubaron por 48 h, 30° C, posteriormente se realizó el conteo. La viabilidad se expresó en ufc/mL (Miles y Misra, 1938).

3.13.2 Peso seco

Curva de calibración: Para la obtención de biomasa, es necesario realizar previamente una curva de calibración, ésta se realizó por el cultivo control. Se realiza obteniendo 3 muestras del cultivo cada ciertos intervalos de tiempo, estas muestras de 12 mL cada una se deben depositar en un tubos Falcon de 15 mL (llevados previamente a peso constante). De las muestras, 2 mL deben ser medidos en el espectrofotómetro para registrar su absorbancia y los 10 mL restantes de cada muestra deben ser destinados para obtención de biomasa por peso seco.

Biomasa por peso seco: los 3 tubos con muestra se colocaron en la centrifuga (centrifuge 5804 R, Eppendorf) por 5 minutos a 5000 rpm/minuto. Se retiró el sobrenadante y se guarda el sedimento celular. Se agregó a los tubos 10 mL de agua destilada y se resuspende. Los tubos se llevaron a una estufa a 90 °C por 24 horas. Trascurrido el tiempo los tubos fueron retirados e introducidos en un desecador para prevenir que las muestras absorban la humedad del ambiente. Finalmente se obtuvieron los pesos con una balanza analítica (Muñoz y Catrila, 2013).

La biomasa se obtendrá con la siguiente ecuación:

$$\text{Biomasa} \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{(\text{peso tubo} + \text{muestra seca}) - (\text{peso inicial del tubo})}{\text{volumen inicial}}$$

3.13.3 Densidad Óptica

El crecimiento celular se midió monitoreando la densidad óptica del medio con una absorbancia de 570 nm (biorad microplate reader, benchmark, con el software microplate manager). Se colocaron 200 μL del medio en cada pocillo y se tomó lectura a 570 nm. Como blanco se utilizó el medio sin inocular.

3.14 Purificación parcial del compuesto fluorescente

3.14.1 Extracción con solventes

Se analizó mediante extracción líquido-sólido con diferentes solventes. Se realizaron pruebas de solubilidad con diferentes disolventes (cloruro de etilo, cloroformo, etano, metanol, acetona y hexano). Muestras de biomasa fueron colocadas en dichos disolventes (5 mL) para después ser observadas bajo luz UV. Visualmente se comparó en cuál de los disolventes se observaba fluorescencia después de contener la muestra y de separar los sólidos.

3.14.2 Cromatografía de capa fina

Posteriormente a las evaluaciones realizadas se concentraron los medios para la separación de la biomasa producida. Se centrifugó el concentrado a 10,000 rpm, 20 °C, 15 min. Se recuperó el sedimento celular y fue resuspendido en acetona, donde mostró solubilidad previamente la molécula. Para la cromatografía se seleccionó como fase estacionaria sílice gel y como fase móvil se evaluaron relaciones de acetato de etilo/etanol 98 % (9:1, 7:3 y 1:1). Se reveló con luz UV (Scorpion

scientific 14UV100E-140110-04). Una vez identificadas las bandas obtenidas, son removidas por separado y colocadas en el solvente adecuado, las muestras son filtradas para realizar cromatografía nuevamente.

3.15 Caracterización del compuesto fluorescente

3.15.1 Espectrometría infrarroja (FTIR)

Se analizaron las fracciones obtenidas de la cromatografía en capa fina para la identificación de grupos funcionales del compuesto de interés. Los estudios se realizaron en el Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA) en la Universidad Autónoma de Querétaro con un espectrómetro de Perkin Elmer, spectrum 100. Para el análisis de datos se utiliza el programa omnic 2013.

Las muestras fueron diluidas en acetona y se colocaron 300 μL directamente en el equipo. Se realizaron 16 escaneos para su lectura.

3.15.2 Espectroscopia Raman

El análisis se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) con un espectrofotómetro (thermo scientific) con un láser de longitud de onda de 780 nm, con una potencia de 14 mW en un intervalo de 10 a 3300 cm^{-1} . El objetivo del microscopio del equipo es de 10x/0.25 BD. Para el análisis de los datos se utilizó el programa omnic 2013.

Para la preparación de las muestras se concentraron directamente 500 μL de cada compuesto en un portaobjetos.

3.15.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se realizaron los espectros de RMN (^{13}C , ^1H) en el CIDETEQ con un espectrómetro (eft-60 de Anasazi Instruments Inc.). La frecuencia de trabajo fue de 60 MHz. Para el análisis de los datos se utiliza un software que consta de dos

partes, PNMR para el control del espectrómetro y adquisición de datos y NUTS para el proceso e impresión de datos.

Se analizaron las dos bandas resultantes del proceso de cromatografía, se disolvieron individualmente con 5 mL de acetona D6 (D, 99.9%) + 0.05% V/V TMS (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) y fueron sonicadas por 120 s (branson CPXH). Para el análisis de ^1H se realizaron 64 escaneos y para ^{13}C se realizaron 84 escaneos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Microorganismos

De los microorganismos obtenidos en la caverna se seleccionó la cepa que bajo luz ultravioleta (365 nm) presentó fluorescencia. Se realizaron diluciones para el cultivo y el análisis de la misma en placas con agar nutritivo y cerebro-corazón. De las diluciones se obtuvieron 3 diferentes morfologías y posteriormente se secuenciaron las muestras (secuenciación de los espaciadores internos transcritos 16S) para identificar los microorganismos. Se observan las colonias de las cepas (Figura 3), donde 5a fue identificada como *Actinomyetales bacterium*, 5b como *Debaryomyces hansenii* y 5c como a *Kocuria sp.*

Debido al uso de diferentes medios de cultivo se observaron diferentes morfologías en la misma cepa. Está reportado que los microorganismos pueden presentar dimorfismos según las características de la forma de cultivo. Los microorganismos son complejos morfológicamente, difieren según el tipo de cultivo, según la naturaleza del medio de crecimiento y del ambiente físico. Muchos genes y mecanismos fisiológicos están involucrados en el proceso de morfogénesis.

En cultivos sumergidos una gran cantidad de factores contribuyen al desarrollo de cualquier morfología. Los factores que afectan la morfología pueden incluir el tipo y concentración de la fuente de carbono, niveles de nitrógeno y fosfato, minerales traza, oxígeno disuelto, dióxido de carbono, pH y temperatura. Por otro lado, algunos factores físicos que también afectan la morfología incluyen el tipo de fermentadores, sistemas de agitación, reología y el tipo de cultivo (lote, lote alimentado o continuo). Por esta razón, es difícil deducir la relación entre las variables de un proceso, la formación del producto y la morfología resultante (Papagianni, 2003).

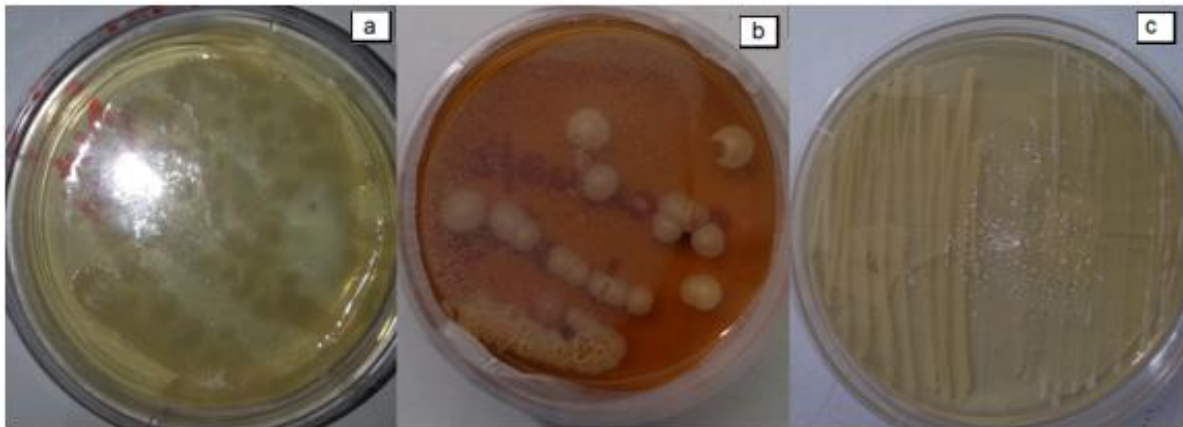


Figura 3. Cepas que presentaron fluorescencia con una longitud de onda de 365 nm. a) Muestra 1, *Actinomycetales bacterium*. b) Muestra 2, *Debaryomyces hansenii*. c) Muestra 3, *Kocuria sp.*

4.2 Secuenciación de microorganismos

Para la identificación del género y especie de las cepas se enviaron al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN). El método que se utilizó fue mediante secuenciación de los espaciadores internos transcritos y/o dominios NL1/NL4, ITS1/ITS2 y 26S. El alineamiento de secuencias se hizo según la página electrónica NCBI (blast). Para la muestra 1 la compatibilidad que presentó fue del 99.7 % con *Actinomycetales bacterium* (Cuadro 6). En el caso de la muestra 2, la compatibilidad fue de un 98.4 y 100 % del total de pares de bases analizadas con *Debaryomyces hansenii* (Cuadro 5). Finalmente, en el caso de la muestra 3 se obtuvo compatibilidad del 99.8 % con *Kocuria sp* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de secuenciación muestra 1.

Cebadores	Nombre	Puntuación	Identidad (%)
16s	<i>Kocuria palustris</i>	2482	(1392/1406) 99.0%
	<i>Kocuria sp.</i>	2477	(1393/1408) 98.9%
	<i>Actinomycetales bacterium</i>	2464	(1399/1403) 99.7%

Cuadro 5. Análisis de secuenciación muestra 2.

Cebadores	Nombre	Puntuación	Identidad (%)
ITs	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1113	(623/633) 98.4%
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1113	(623/633) 98.4%
	<i>Debaryomyces fabryi</i>	1113	(623/633) 98.4%
26s	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1068	(592/592)100.0%
	<i>Debaryomyces vindobonensis</i>	1068	(592/592)100.0%
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1068	(592/592)100.0%

Cuadro 6. Análisis de secuenciación muestra 3.

Cebadores	Nombre	Puntuación	Identidad (%)
16s	<i>Kocuria palustris</i>	2387	(1328/1330) 99.8%
	<i>Kocuria palustris</i>	2387	(1328/1330) 99.8%
	<i>Kocuria sp.</i>	2385	(1327/1329) 99.8%

4.3 Selección de la cepa

Una vez identificados los microorganismos, se realizaron pruebas a las tres cepas para evaluar la presencia de la característica de interés. Las tres cepas fueron analizadas bajo luz ultravioleta (365 nm) individualmente y todas presentaron fluorescencia. Posteriormente las cepas fueron cultivadas en medio nutritivo durante 48 h, 200 rpm y 30 °C. Una vez transcurrido el tiempo el medio se centrifugó y se guardó el sedimento celular para análisis posteriores. El sedimento celular fue resuspendido en acetona y la solución resultante fue evaluada por cromatografía en capa fina (Figura 4). Se observó mayor intensidad de fluorescencia a simple vista en la muestra 2 que corresponde a *D. hansenii*. Con base en los resultados la levadura *Debaryomyces hansenii* se utilizó para las evaluaciones posteriores.

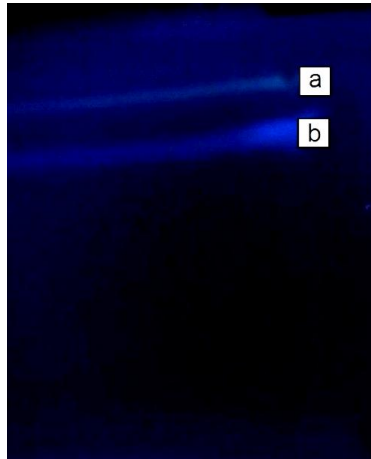


Figura 4. Placa cromatográfica del extracto obtenido de *D. hansenii*, revelada con luz ultravioleta (365 nm). a) Compuesto 1 y b) Compuesto 2.

4.4 Microscopía óptica

La levadura seleccionada se observó al microscopio (Leica DM500). La muestra para el análisis fue tomada con 48 h de incubación en medio de cultivo ypd, se observó un crecimiento abundante (Figura 5). Las células presentaron forma ovoide o esférica, blanquecinas y con bordes uniformes. Se infiere que la molécula fluorescente se encuentra a nivel de membrana debido a que se puede observar directamente en presencia de luz UV, sobre toda la superficie celular.

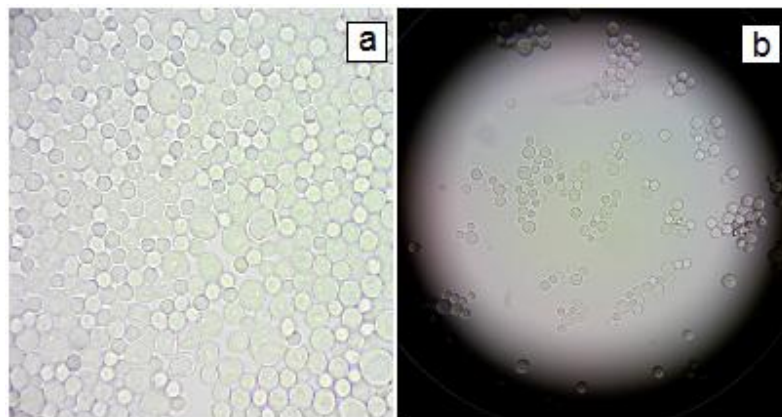


Figura 5. Microscopía óptica de *D. hansenii*, objetivos 4X (b) y 10X (a). Cultivada en medio ypd.

4.5 Microscopía de fluorescencia

D. hansenii se observó al microscopio (olympus CX41). La muestra para el análisis fue tomada con 48 h de incubación en medio de cultivo ypd, se observó un crecimiento abundante. La muestra analizada presentó fluorescencia utilizando el filtro b (Figura 6), corroborando que la emisión de fluorescencia se encuentra a nivel membrana. Esto nos indica que la levadura genera autofluorescencia y puede tener una aplicación potencial.

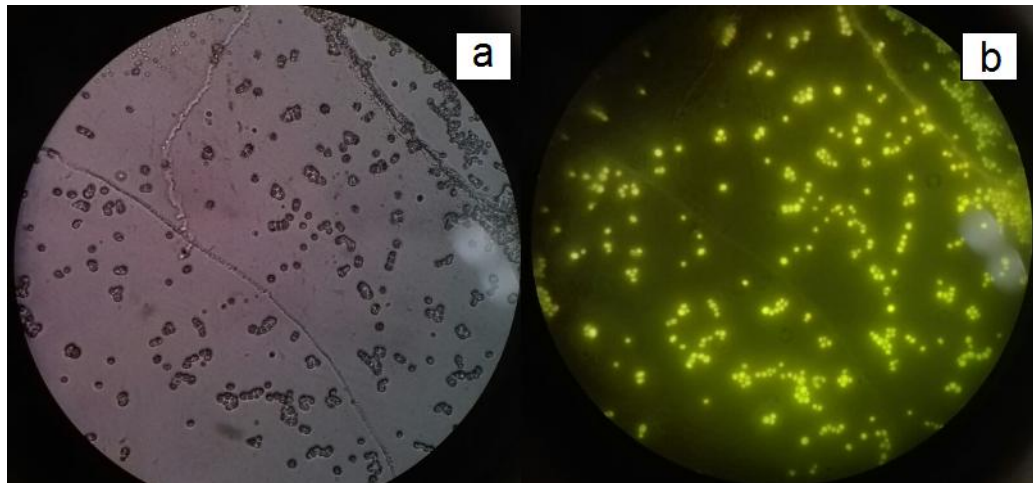


Figura 6. Microscopía de fluorescencia, objetivo 100X. a) Sin filtro. b) Con filtro B.

4.6 Evaluación de la temperatura sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Los resultados del estudio indicaron que a 20 °C la producción de biomasa es mayor, con un equivalente en peso seco a 9.17 g/L (Figura 7). Estos datos concuerdan con el conteo de células viables, siendo la temperatura de 20 °C la que presenta un mayor crecimiento con 9.22 Log₁₀ UFC/mL. Es evidente que a 37 °C el crecimiento de la levadura es menor. Datos de literatura establecen que la variante *D. hansenii hansenii* crece a una temperatura máxima de 35 °C, por tal motivo se puede descartar la variante *D. fabryi*. Los resultados obtenidos concuerdan con reportes de Ochoa y Vázquez (2004). Debido a que *D. hansenii* crece en intervalos

de temperatura de 20 - 30° C puede considerarse como psicotrófica (Yadav y Tyag, 2005).

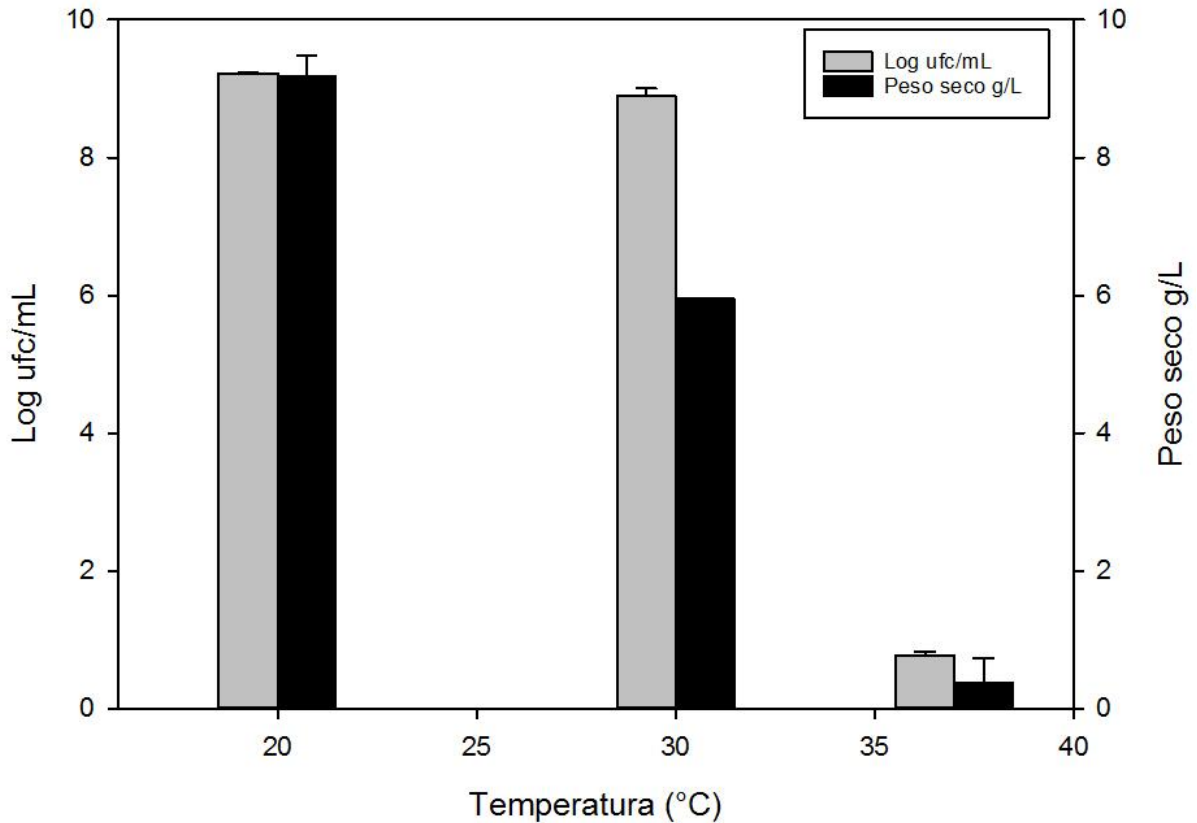


Figura 7. Conteo en placa con diferentes temperaturas de incubación (log ufc/mL) y recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) de *D. hansenii*.

4.7 Determinación del valor de pH más adecuado para el crecimiento de *D. hansenii*

El pH con el cual se aísla un microorganismo en su ambiente natural, como regla general, no puede ser considerado como óptimo para su crecimiento, por ese motivo es necesario evaluar las condiciones más adecuadas. Los resultados del estudio indican que hay una mayor producción de biomasa (6.6 g/L) utilizando el pH 7 (Figura 8) y concuerda con los datos obtenidos en UFC/mL siendo el pH 7 el de

mayor cantidad de células viables. Es notorio que la levadura presenta un desarrollo semejante con valores de pH de 6 y 8, sin embargo los niveles de biomasa disminuyen en valores de pH de 4 y 10, aproximadamente un 78.78 y 53.03 % respectivamente. Los valores obtenidos coinciden con reportes que indican que *D. hansenii* crece preferentemente con pH entre 5 y 7 (Ochoa y Vázquez, 2004). Orozco y col. (1998) reportaron niveles de biomasa de 5.2 g/L, usando un medio con una composición similar a la que se usó en porcentaje (2 de glucosa, 0.3 de peptona y 0.2 de extracto de levadura) y pH 7 donde también se realizó la toma de muestra en 48 h, lo cual coincide con los nuestros resultados.

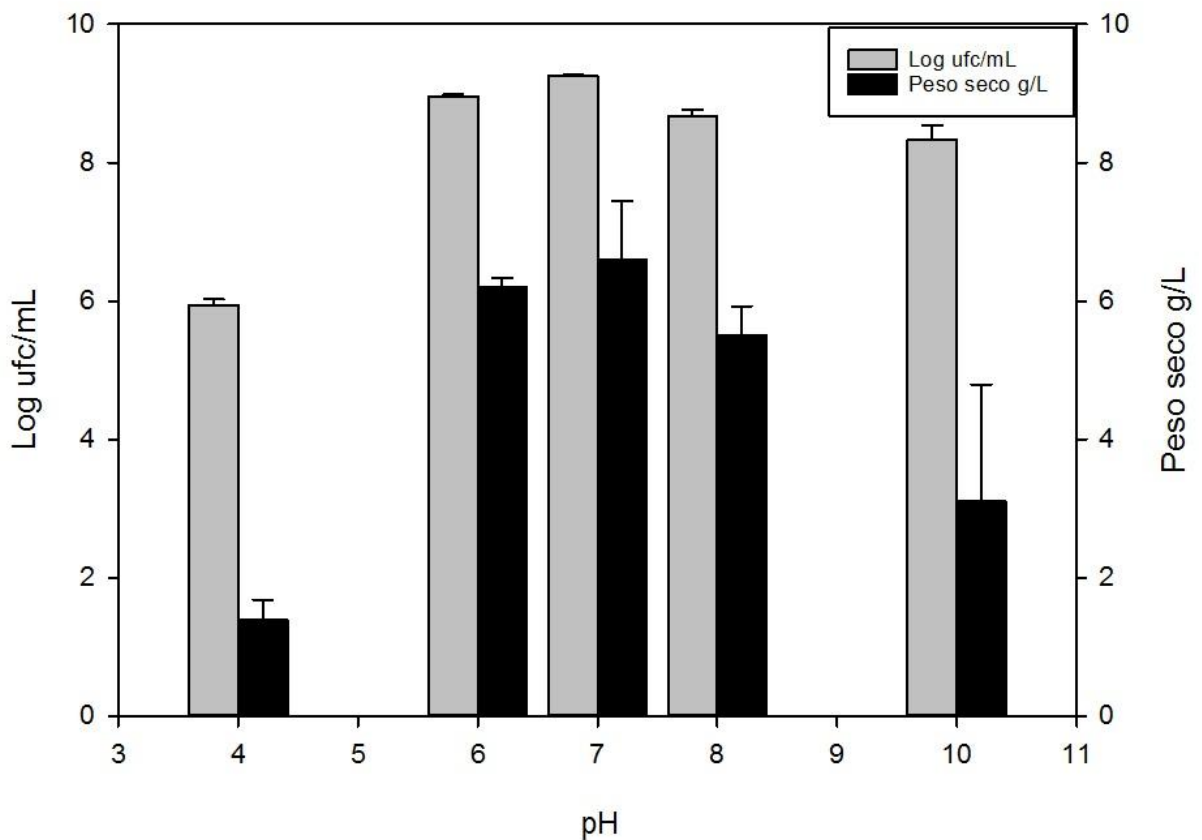


Figura 8. Conteo en placa con diferentes valores de pH (log ufc/mL) y recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) de *D. hansenii*.

4.8 Evaluación del efecto de la agitación sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Los resultados del estudio indicaron que hay una mayor producción de biomasa (9.45 g/L) manteniendo una velocidad de agitación de 150 rpm (Figura 9). Esto coincide con los datos obtenidos en UFC/mL. Se observó que el incremento en la producción de biomasa y en la concentración de células viables es proporcional al aumento en la velocidad de agitación. Los reportes indican que la levadura tiene un mayor crecimiento cuando se emplean 500 rpm (Ochoa y Vázquez, 2004). No se analizaron velocidades de agitación más elevadas debido a que el equipo utilizado en el presente trabajo no cuenta con mayor capacidad para agitar. Con base en los resultados se esperaba que velocidades de mayor agitación puedan incrementar los niveles de biomasa.

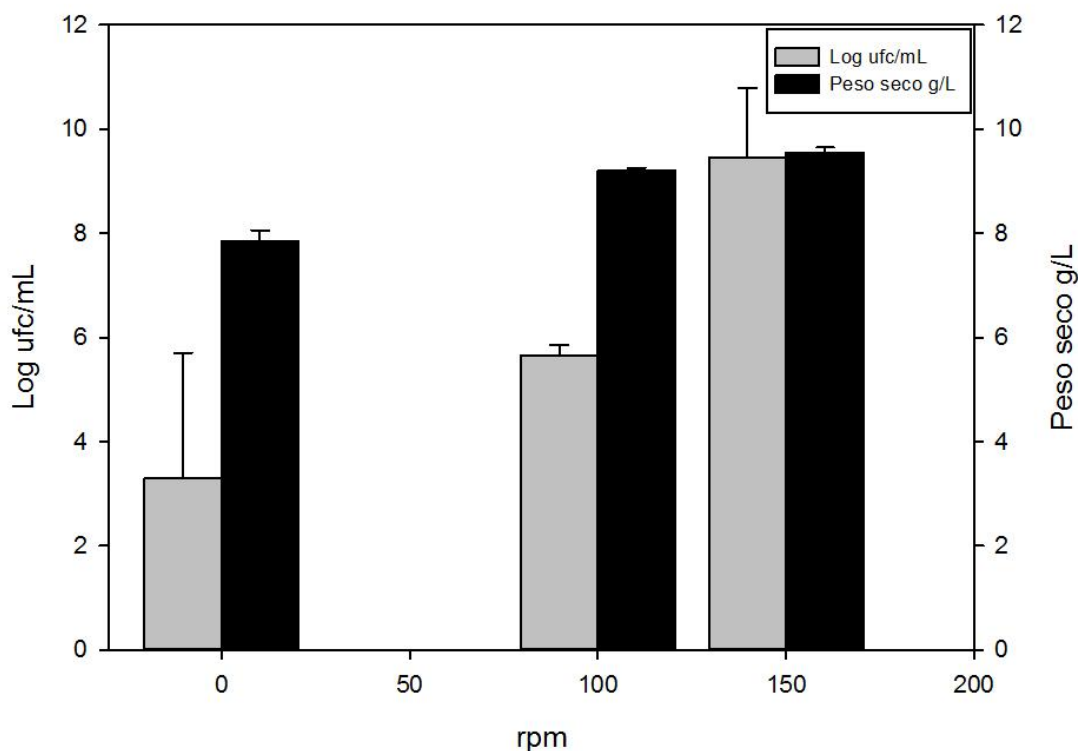


Figura 9. Conteo en placa con diferentes velocidades de agitación (log ufc/mL) y recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) de *D. hansenii*.

4.9 Evaluación diferentes medios definidos sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Los medios definidos se evaluaron como se especificó en la metodología, fueron modificados unificando las fuentes de carbono y nitrógeno para observar el efecto que presentan los otros componentes. Los resultados de acuerdo al conteo de células viables (Figura 10) indicaron un mayor crecimiento en los medios 2 y 3 (con 0.6 g/L de células totales y 8.7173 Log₁₀ UFC/mL). Sin embargo, los resultados de absorbancia y producción de biomasa no fueron coherentes con dichos resultados, probablemente debido a las diferencias en la composición de los medios y a la presencia de sólidos suspendidos (Figura 11). Con base en los resultados y en las características del medio, se seleccionó el medio definido 3 para realizar las evaluaciones posteriores.

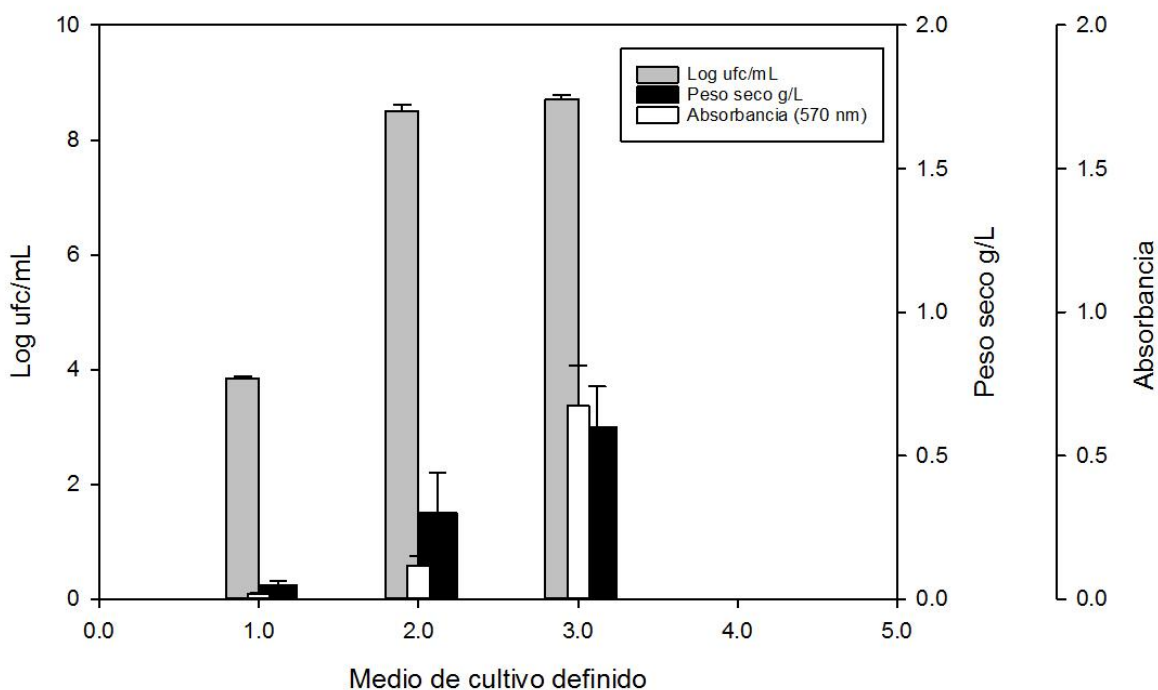


Figura 10. Conteo en placa con diferentes medios de cultivo (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de *D. hansenii*.

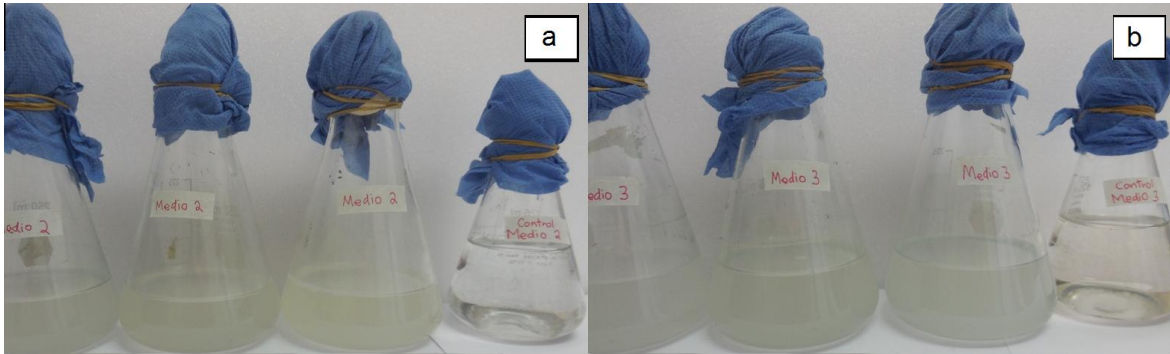


Figura 11. Cultivo en medios definidos 2 (a) y 3 (b) sobre el crecimiento de *D. hansenii*.

4.10 Evaluación de fuentes de carbono sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Para evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono en el comportamiento de la levadura se utilizó el medio 3 con glicerol, glucosa, lactosa, ácido cítrico y xilosa, individualmente. En todos los experimentos se utilizó la relación C/N 7:1 con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno. Se puede observar (Figura 12) que la levadura presentó un mayor conteo de células viables utilizando glicerol con 7.6516 Log_{10} UFC/mL. Por esta razón se seleccionó el glicerol como fuente de carbono para los siguientes experimentos.

Los contrastes en los resultados de biomasa, absorbancia y células viables pueden deberse al comportamiento de las fuentes de carbono utilizadas, a simple vista el color y la consistencia de cada medio es diferente (Figura 13). En la evaluación de peso seco se obtuvieron diferencias debido a los sólidos insolubles y posiblemente a este factor se debe el aumento en la cantidad resultante de biomasa por litro.

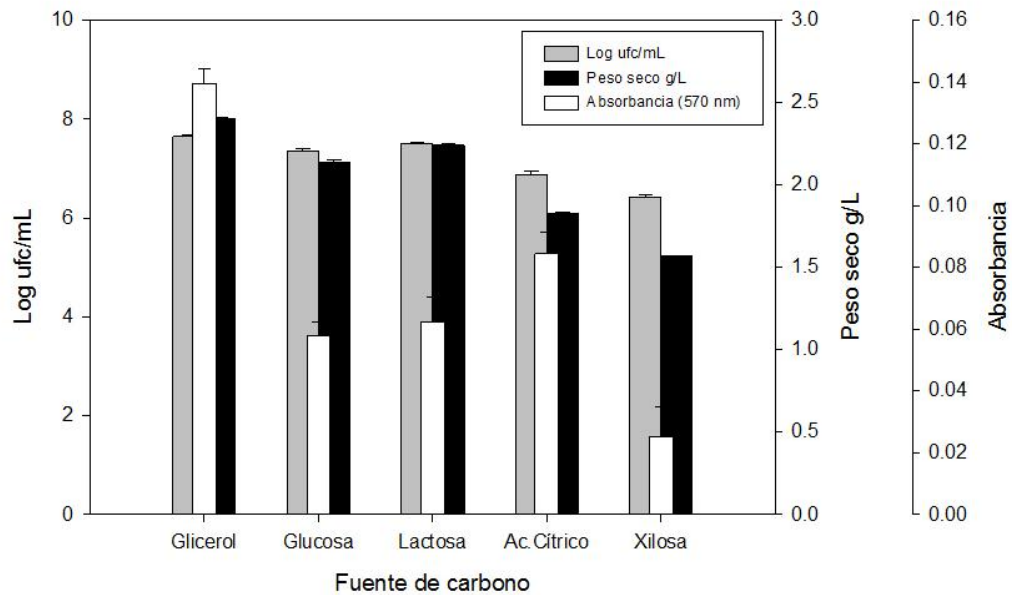


Figura 12. Conteo en placa con diferentes fuentes de carbono (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de *D. hanseni*.



Figura 13. Evaluación del medio 3 con diferentes fuentes de carbono para el cultivo de *D. hanseni*.

4.11 Evaluación de fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de *D. hanseni*

Para evaluar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el comportamiento de la levadura se utilizó el medio 3 con nitrato de amonio, urea, nitrato de potasio, cloruro de amonio y sulfato de amonio. En todos los experimentos se utilizó la

relación C/N 7:1 con glicerol como fuente de carbono. Se puede observar (Figura 14) que la levadura presentó un mayor conteo de células viables utilizando cloruro de amonio (7.57 Log₁₀ UFC/mL). Con base en los resultados se seleccionó el cloruro de amonio como fuente de nitrógeno para los siguientes experimentos.

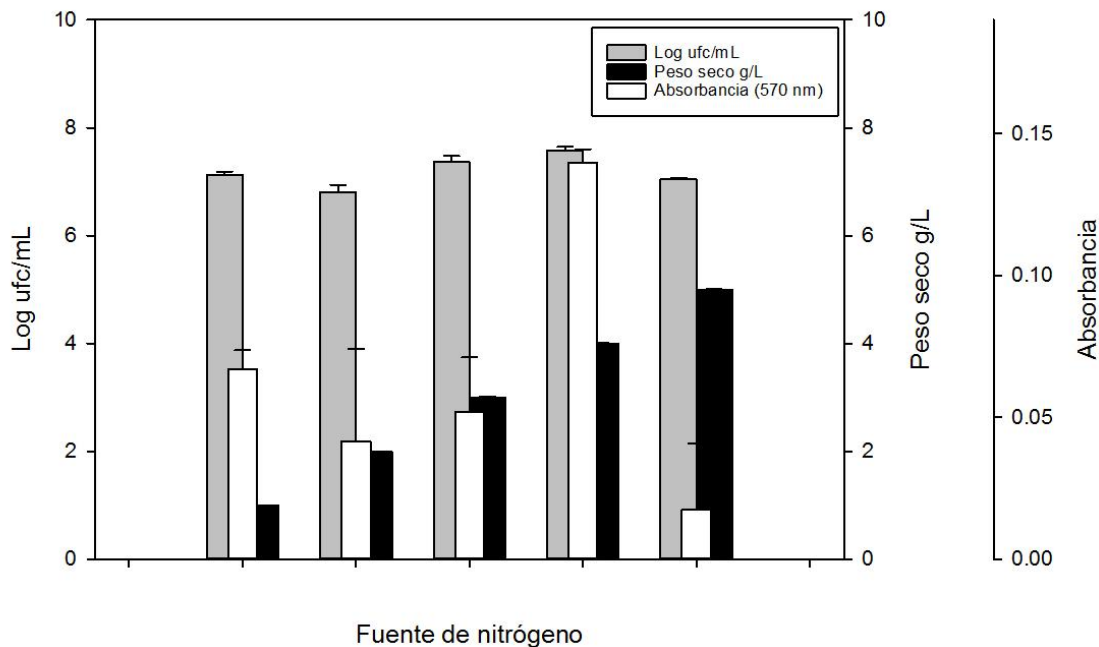


Figura 14. Conteo en placa (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de *D. hansenii* con diferentes fuentes de nitrógeno.

4.12 Evaluación de la relación Carbono/Nitrógeno sobre el crecimiento de *D. hansenii*

Uno de los parámetros más importantes es la relación carbono/nitrógeno, debido a que el contenido de estos macronutrientes en el medio de cultivo determina la competencia en el crecimiento entre las poblaciones de microorganismos (Ferrara y Ramírez, 2010). Debido a los valores obtenidos en el conteo de células viables y totales se demostró que la relación más eficiente para la producción de biomasa es de 7:1 (Figura 15).

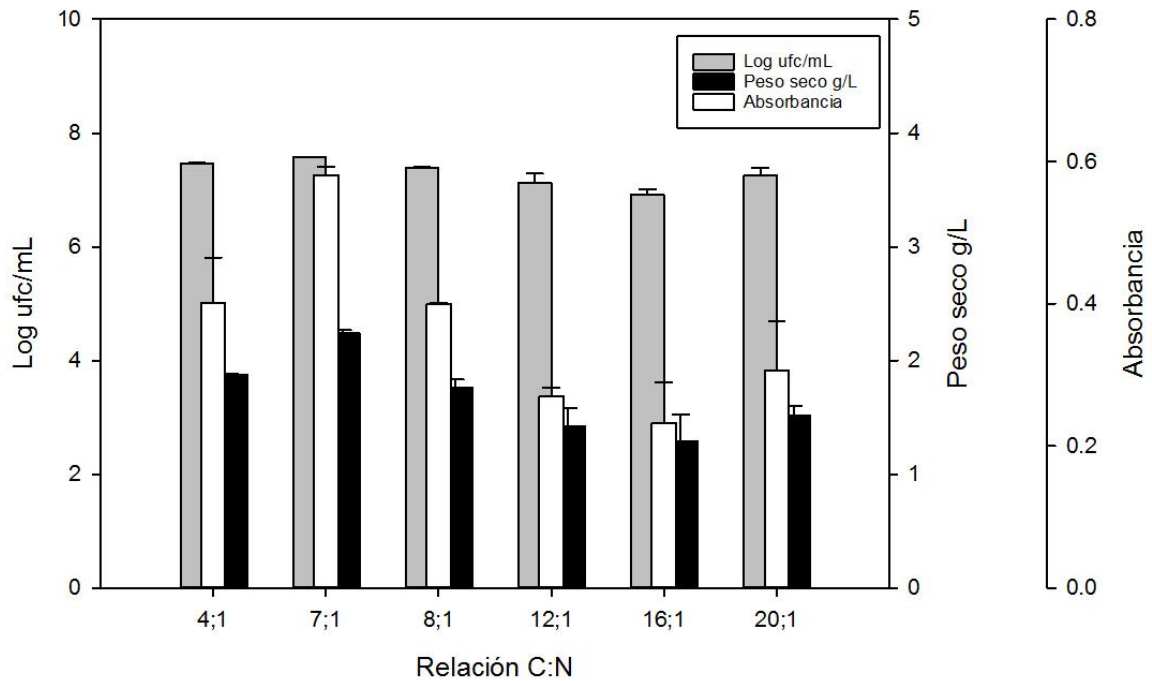


Figura 15. Conteo en placa (log ufc/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de *D. hansenii* con diferentes relaciones C/N, utilizando cloruro de amonio (NH₄Cl) como fuente de nitrógeno y glicerol (C₃H₈O₃) como fuente de carbono.

4.13 Cinética de crecimiento de *D. hansenii*

El modelo realizado permite evaluar la productividad del microorganismo bajo condiciones aeróbicas (Figura 19). El modelo fue probado utilizando las condiciones más adecuadas de crecimiento (pH 7, temperatura 20° C, relación C/N 7:1, como fuente de carbono y de nitrógeno, glicerol y cloruro de amonio respectivamente) obtenidas en los experimentos anteriores. Sin embargo, la temperatura de 20° C que resultó ser la más adecuada no pudo implementarse debido a los costos implicados para mantenerla por el tiempo necesario, por este motivo el experimento fue realizado a 30° C. Por otro lado la velocidad de agitación fue modificada debido a los reportes que indican un mejor crecimiento con una mayor velocidad de agitación. Orozco y col. (1998), indican que 500 rpm y un flujo de aire de 5 L/min promueven una mayor producción de biomasa en *D. hansenii*.

La cinética de crecimiento de *D. hansenii* muestra un tiempo de latencia de aproximadamente 6 h, mientras que la fase de crecimiento exponencial se da entre las 6 y 52 h, a partir de las 52 h se presenta la fase estacionaria. Después de 60 h se infiere que la fuente de carbono fue consumida casi completamente por la disminución en el crecimiento (Figura 16). El valor del parámetro cinético obtenido para la levadura en el medio definido 3 con glicerol como única fuente de carbono, fue la velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) igual a 0.00334 h^{-1} .

Los resultados anteriores coinciden con el consumo de OD que indican un consumo acelerado al inicio, sin embargo se presentó una alteración con los resultados posteriores debido a una falla en el equipo que apagó el control de OD a las 8 h de haber iniciado el experimento, lo que provocó una modificación en los parámetros iniciales de esta variable (Figura 17).

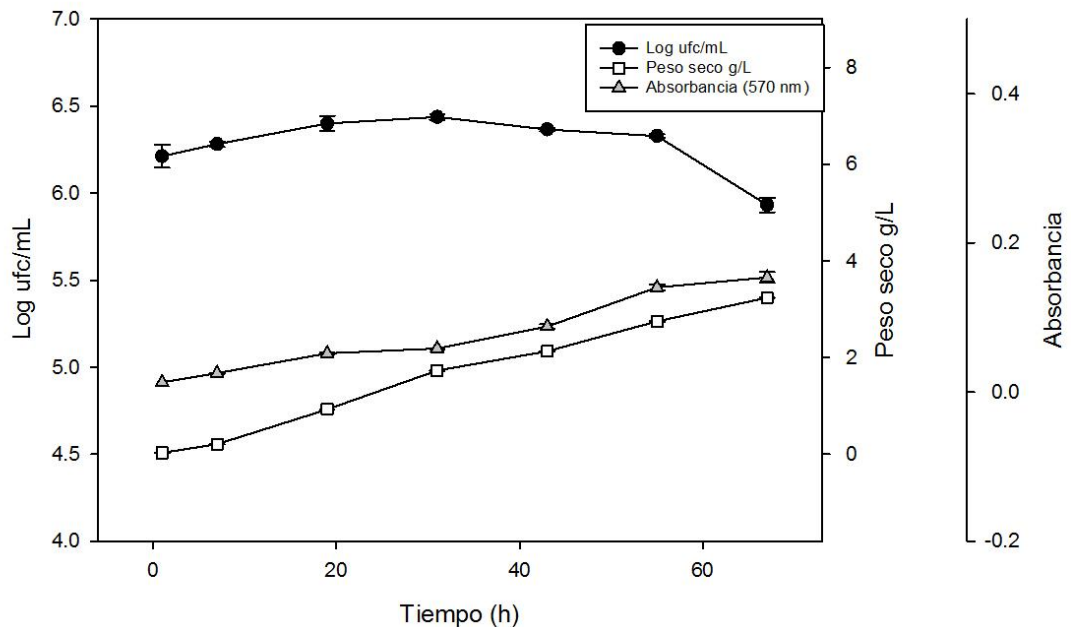


Figura 16. Cinética de crecimiento de *D. hansenii* en un reactor biostat a plus con 4 L de volumen de operación. Conteo en placa de (log UFC/mL), recuento de biomasa total en un volumen definido (peso seco g/L) y densidad óptica (absorbancia 570 nm) del crecimiento resultante de *D. hansenii*.

En el experimento se observó que la velocidad de agitación fue excesiva debido a los cambios morfológicos que se identificaron en el microorganismo (Figura 18) durante las tomas de muestra, como una disminución considerable en el tamaño celular, sin bordes definidos y formas irregulares. Son muchos los reportes de la literatura que hablan sobre el efecto de la agitación, aireación y oxígeno disuelto en los cultivos, los efectos del estrés hidrodinámico en cultivos celulares depende del sistema que se utilice (matraz, biorreactor, etc.). La velocidad de agitación es una de las variables más importantes para el crecimiento de las levaduras. Un proceso con una agitación adecuada promueve un mayor crecimiento, no solo por el incremento en la difusión del oxígeno, sino también por la dispersión homogénea de células y nutrientes en el reactor. Si durante el proceso la velocidad de agitación es excesiva, se pueden formar burbujas que crean espacios muertos en el medio de cultivo y perjudican el crecimiento celular (Orozco y col., 1998). Durante todo el proceso se observó (Figura 17) que tanto la temperatura como el pH se mantuvieron estables.

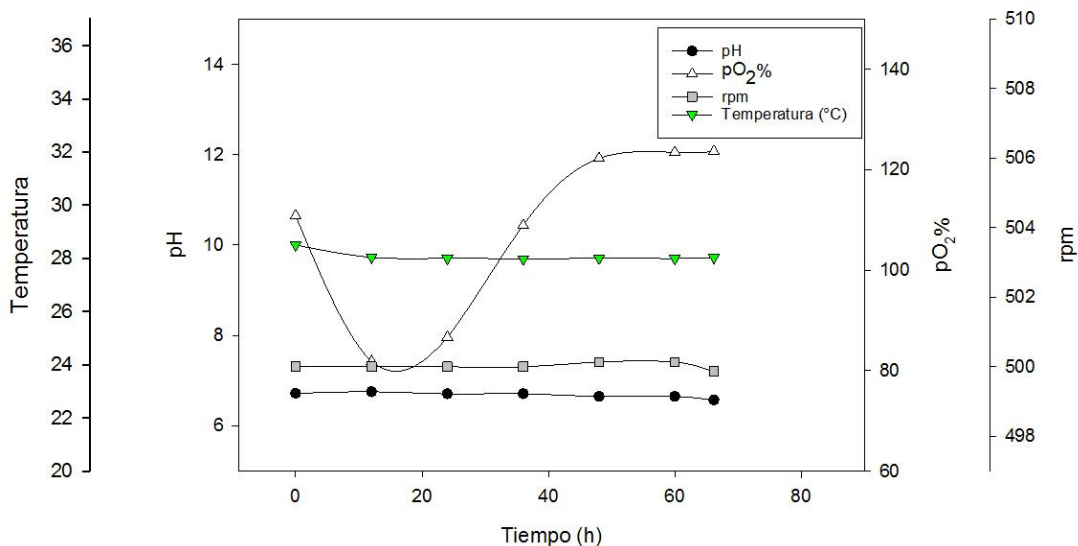


Figura 17. Variación de las condiciones de operación (pH, pOD₂ %, temperatura, rpm) durante la cinética de crecimiento de *D. hansenii* en un medio de cultivo limitante, en un reactor biostat a plus con 4 L de volumen de operación.



Figura 18. Muestra del cultivo (48 h) de *D. hansenii* en el medio definido 3, analizado con objetivo 100X.



Figura 19. Reactor biostat a plus en el que se realizó la fermentación de *D. hansenii* con el medio definido 3. a) Tiempo de fermentación 2 h. b) Tiempo de fermentación 60 h.

4.14 Purificación parcial del compuesto fluorescente

4.14.1 Extracción con solventes

Previamente se habían evaluado el comportamiento de la muestra con diversos solventes (etanol, cloroformo, acetona y hexano). Se identificó a la acetona como el solvente con mayor afinidad a la molécula de interés. Por tal motivo fue utilizada para resuspender el sedimento celular obtenido (Figura 20). Posteriormente se

realizaron evaluaciones para seleccionar la fase móvil más adecuada para la cromatografía en capa fina, se tomó como variable la combinación de solventes que definiera mejor las bandas presentes. En ese sentido se eligió acetato de etilo/etanol y se evaluaron relaciones 1:1, 7:3 y 9:1 (Figura 21) para observar el comportamiento de la separación. Se seleccionó la relación 1:1 al presentar una mejor separación de las bandas.

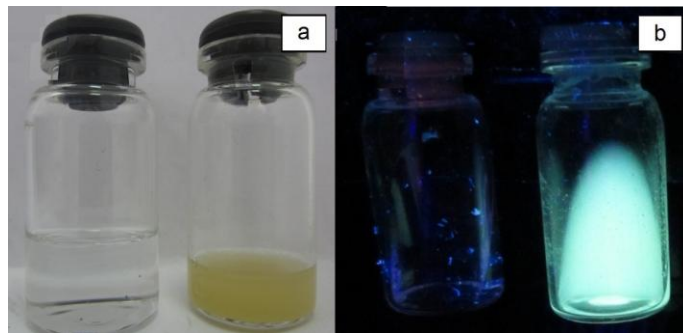


Figura 20. Extracto celular en acetona. a) Acetona (izquierda) y acetona más sedimento celular (derecha). b) Acetona (izquierda) y acetona más sedimento celular (derecha) con luz ultravioleta (365 nm).

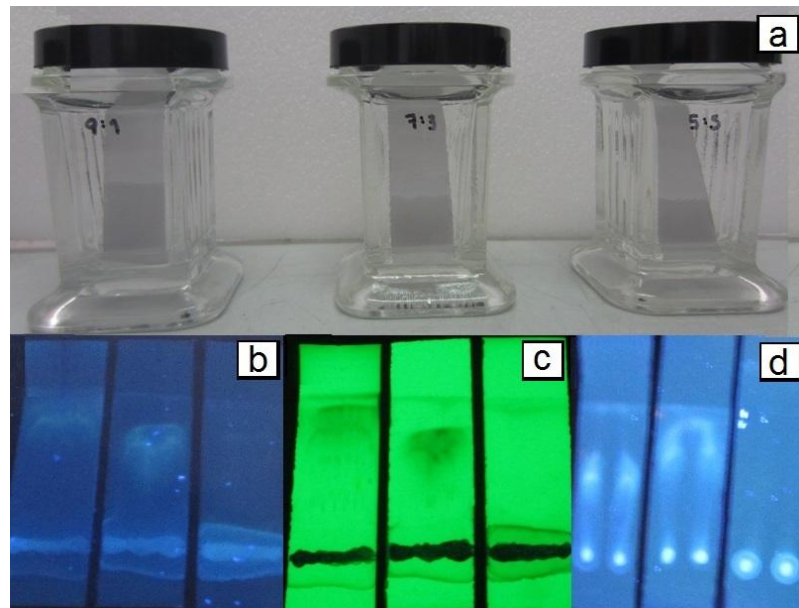


Figura 21. Evaluación de la relación más adecuada del disolvente para la fase móvil. a) Relación de disolventes. b) y d) Placas resultantes bajo luz ultravioleta (365 nm). c) Placas resultantes bajo luz ultravioleta (265 nm).

4.14.2 Cromatografía de capa fina

La muestra se corrió en una placa cromatográfica obteniendo 2 bandas correspondientes a moléculas que posiblemente pertenecen a la misma familia. Las dos bandas que se obtuvieron fueron cortadas y resuspendidas individualmente en acetona, las soluciones fueron filtradas y nuevamente se corrieron las muestras en placas para cromatografía (Figura 22). Las bandas resultantes se cortaron y se resuspendieron en acetona. La solución fue filtrada y finalmente se evaporó el solvente para analizar las muestras resultantes por resonancia magnética nuclear.

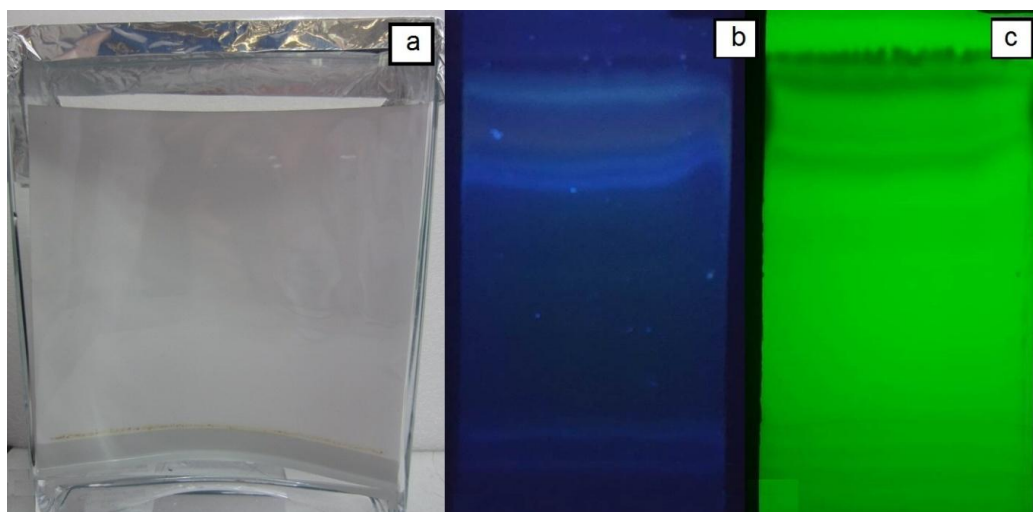


Figura 22. Cromatografía en capa fina. a) Cámara para cromatografía. b) Placa resultante bajo luz ultravioleta (365 nm). c) Placa resultante bajo luz ultravioleta (265 nm).

4.15 Espectrometría infrarroja (FTIR)

En el espectro obtenido de la acetona (Figura 23) se aprecian señales en los valores de las frecuencias de vibración en 3500, 1715, 1300-1100 cm^{-1} correspondientes al espectro característico de la acetona (Pretsch y col., 2009) las cuales se descartan para analizar únicamente las señales correspondientes al compuesto de interés.

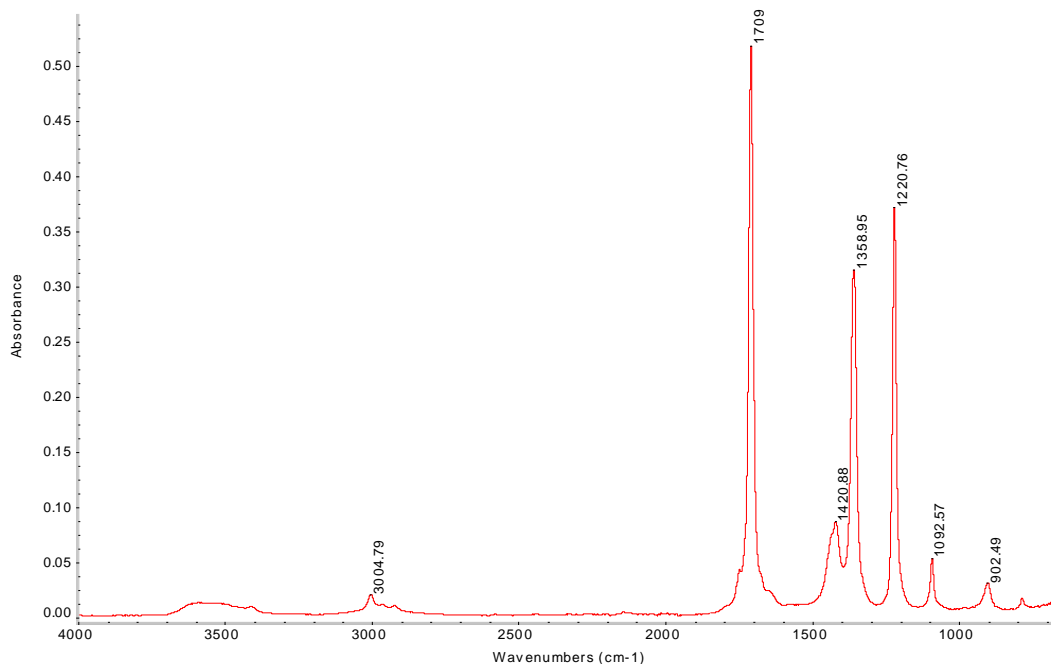


Figura 23. Espectro Infrarrojo de acetona

En el espectro obtenido del compuesto se observan frecuencias vibracionales (3500, 1715, 1300-1100 cm^{-1}), que corresponden al espectro de la acetona, también se observa una señal en 1642 cm^{-1} (Figura 24) que es característica para enlaces $\text{C}=\text{C}$ o $\text{CH}=\text{CH}_2$ (Pretsch y col., 2009). La intensidad de una señal en IR está relacionada al momento dipolar, desde el estado fundamental a un estado excitado, por esta razón detecta vibraciones basadas en la absorción. Debido a la afinidad entre el compuesto de interés y el disolvente, en el análisis de FTIR se aprecia una señal diferente a las correspondientes del espectro de acetona.

La teoría de dispersión de Raman muestra el fenómeno resultante del mismo tipo de cambios vibracionales cuantificables asociados a la región de absorción infrarroja. Sin embargo, las técnicas pueden diferenciarse entre sí por la longitud de onda que incide en la radiación correspondiente a la región media infrarroja. La dispersión del espectro de Raman y el espectro de la absorción infrarroja muestran generalmente un parecido entre sí. No obstante, existen diferencias entre los tipos de grupos activos en infrarrojo y Raman, por lo que esta técnica es complementaria

y no competitiva con infrarrojo. Un aspecto importante de la espectroscopía Raman es que el agua no causa interferencia en los análisis realizados (Skoog y col., 1998). Por esta razón se realizó el análisis de espectroscopia Raman que brinda información sobre interacciones no polares, la técnica es capaz de diferenciar moléculas en especies químicas que son muy similares, por lo cual, se esperaría obtener señales que indiquen la interacción de moléculas que no se observaron en el espectro de FTIR.

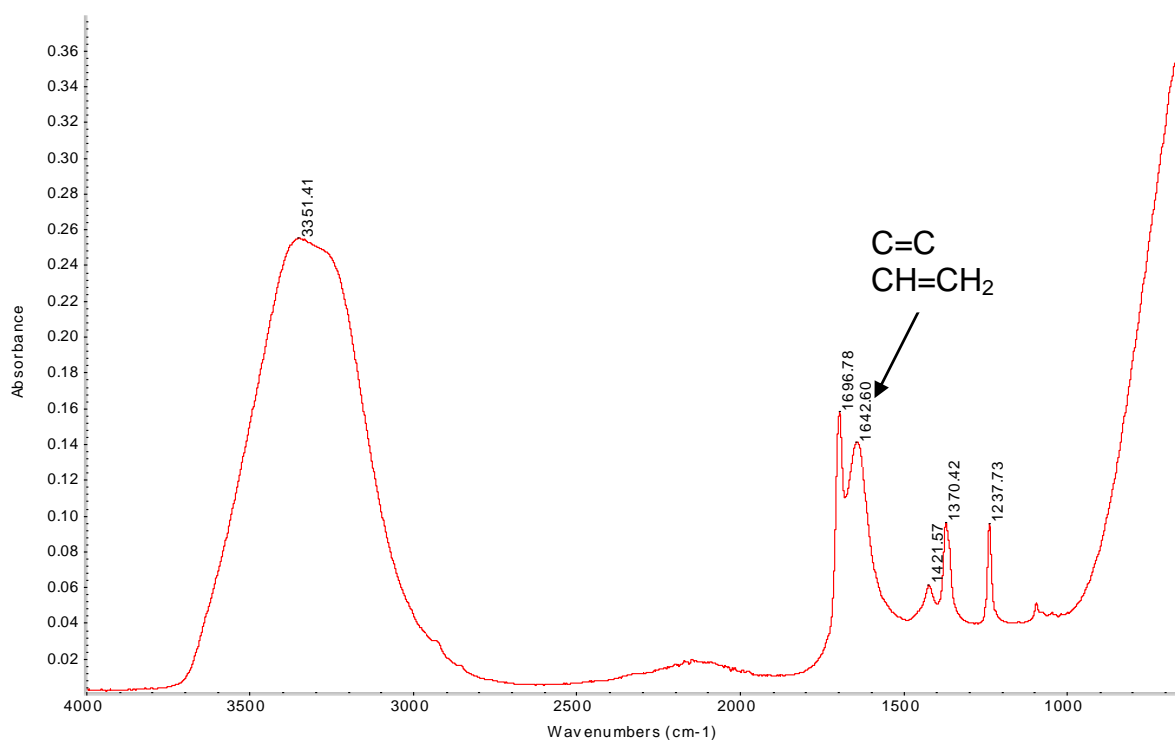


Figura 24. Espectro infrarrojo del compuesto fluorescente en acetona

4.16 Espectroscopía Raman

Se analizaron los compuestos 1 y 2 por espectroscopía Raman (Figura 25 y 26, respectivamente), se observaron una serie de señales de dispersión Raman con frecuencias de vibración semejantes en los dos compuestos (3174, 2771, 1481 cm⁻¹), lo que nos indica que los compuestos podrían pertenecer a la misma familia.

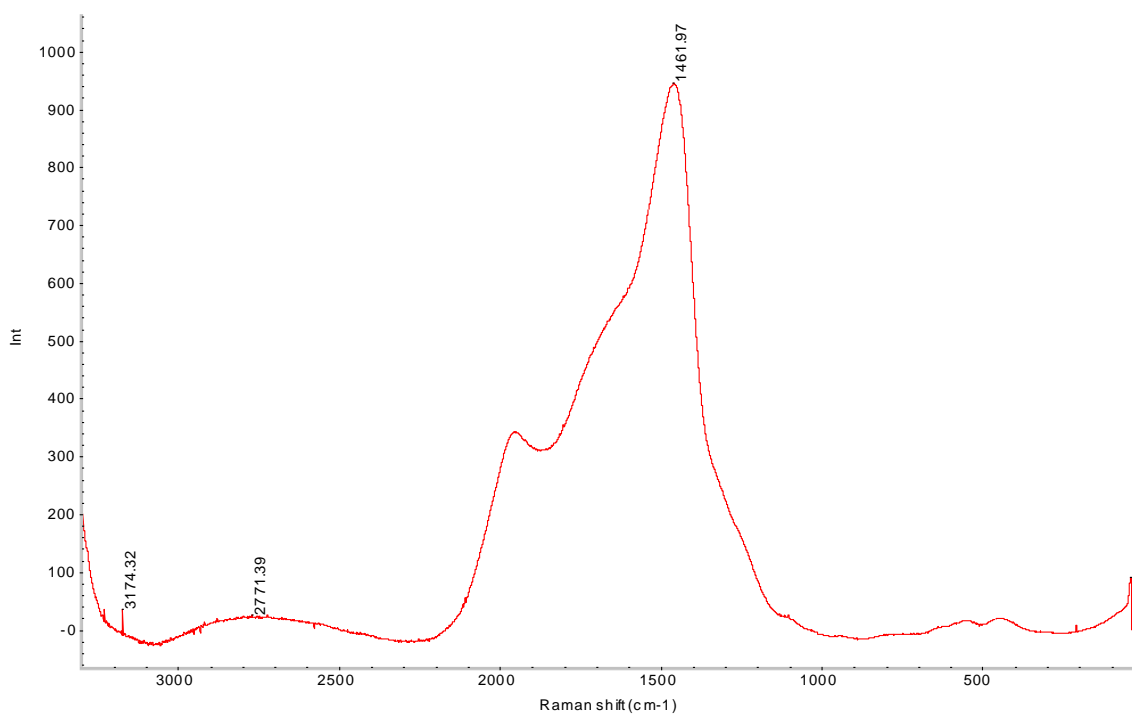


Figura 25. Espectro raman del compuesto 1.

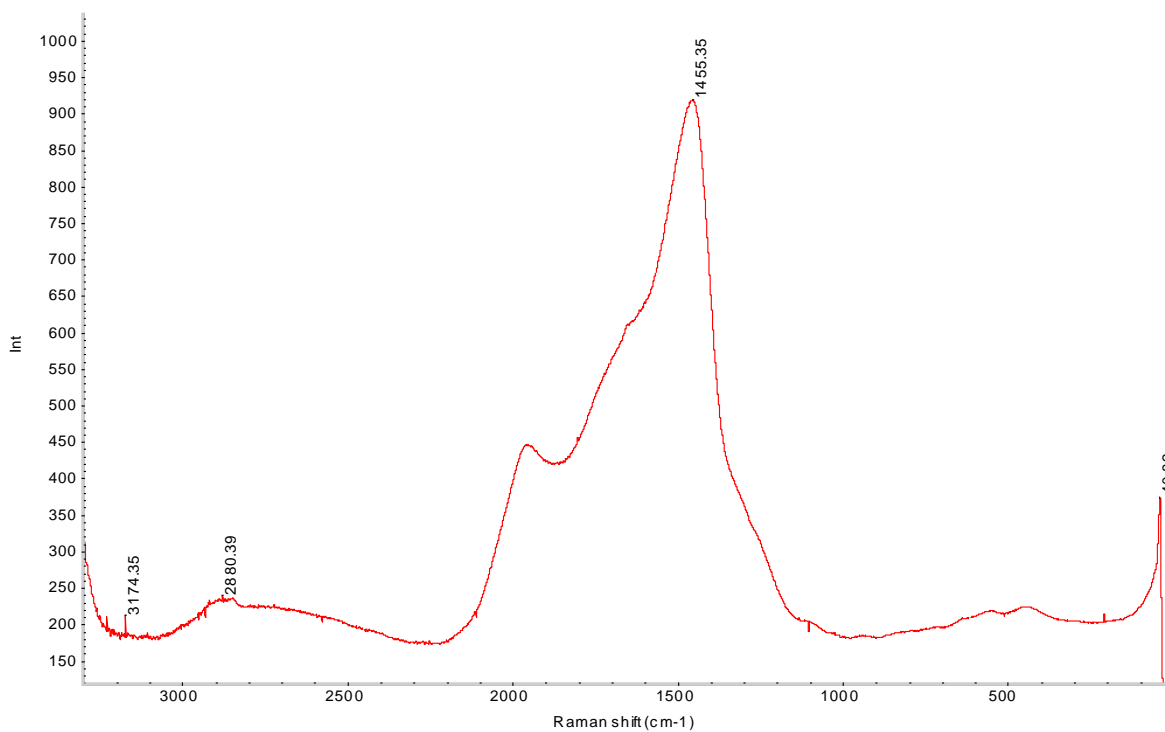


Figura 26. Espectro raman del compuesto 2.

En el Cuadro 7 se presenta una posible asignación de las señales correspondientes al espectro del compuesto de acuerdo a sus frecuencias de vibración. Los espectros obtenidos en FTIR y Raman nos indican la presencia de enlaces sencillos y/o dobles de carbono-carbono, la señal en 3174 cm^{-1} podría corresponder a la presencia de un grupo nitrogenado (Pretsch y col., 2009).

Cuadro 7. Posibles asignaciones de frecuencias vibracionales obtenidas por Raman de los compuestos 1 y 2.

Asignación	Señal (cm^{-1})
CH_2	1470
C-C, C=C	2880
CH saturado/insaturado	2920
NH	3000-3300

La Figura 27 señala la sección de la muestra que fue analizada por espectroscopía Raman, al observar las muestras con el objetivo presentaban una apariencia heterogénea. Se visualizaron estructuras cristalinas dispersas, para el análisis se enfocó a secciones similares (cristales) en las dos muestras.

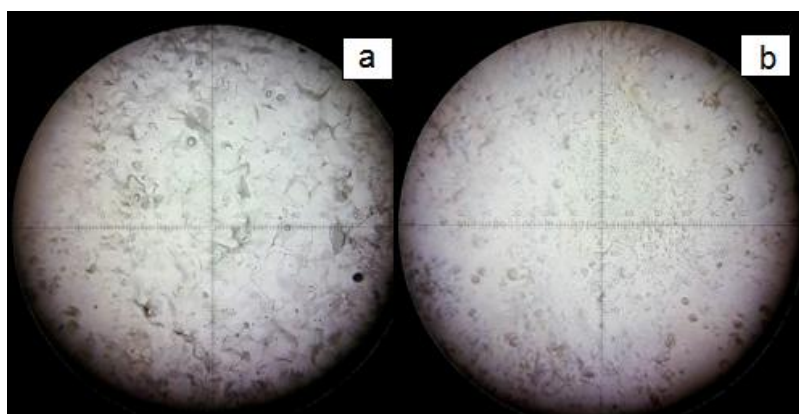


Figura 27. Secciones analizadas del compuesto 1 (b) y compuesto 2 (a) por espectroscopía Raman.

4.17 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Para el análisis ^1H -RMN la muestra fue disuelta en acetona deuterada, se observó formación de precipitados, se procedió a sonicar la muestra durante dos minutos. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se obtuvieron para los dos compuestos. En el ^1H -RMN del compuesto 2 (Figura 28) se aprecian 4 señales que integran para 1, 3, 2, y 5 protones, con valores de desplazamiento químico entre $\delta(\text{H})=0$ ppm y $\delta(\text{H})=5$ ppm lo que podría indicar hidrógenos unidos a compuestos alifáticos o alifáticos unido a otro grupo funcional.

En $\delta(\text{H})=1.98$ ppm se aprecia un quintuplete que podría hacer referencia a un $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, en $\delta(\text{H})=1.10$ se observa un singulete que puede representar CH_2 , en $\delta(\text{H})=3$ y $\delta(\text{H})=3.38$ que pueden indicar la presencia de protones asociados a un grupo nitrogenado (Cuadro 8).

Sin embargo esta información no es concluyente, para poder realizar un acercamiento preciso es necesario conocer el peso molecular de la molécula y así asignar los protones con base en la distribución de la masa molar del compuesto incorporando también el análisis de ^{13}C -RMN, la multiplicidad de los acoplamientos spin-spin en los espectros no se puede definir de manera correcta, las causas pueden ser debido a que la muestra no fue homogénea en su totalidad o había otros compuestos complejos, indicando que el grado de pureza de la muestra no era el óptimo.

Utilizar un equipo con mayor sensibilidad también puede ser una solución, el imán genera un campo magnético estable que define la frecuencia de resonancia de cada núcleo, entre mayor sea el campo magnético la señal podrá definirse mejor. Para estos análisis se utilizó un equipo de 60 MHz y actualmente el equipo con el mayor campo magnético es de 950 MHz.

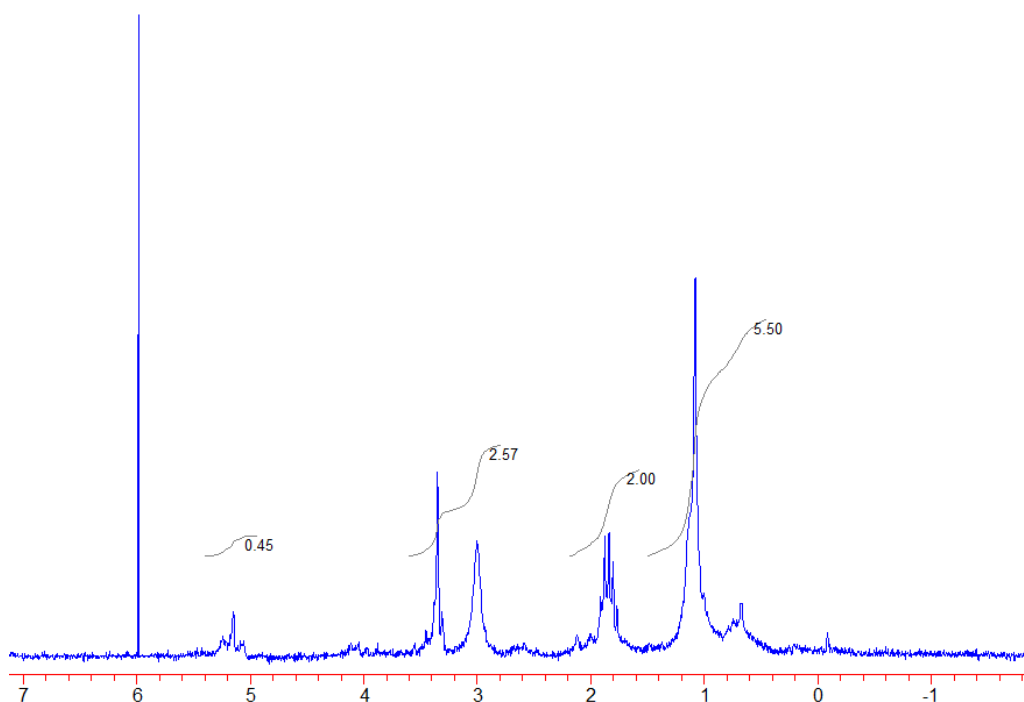


Figura 28. Resonancia magnética nuclear del compuesto 2

Cuadro 8. Posibles asignaciones a las frecuencias vibracionales de los protones obtenidas por ^1H -rmn del compuesto 2.

Asignación	Señal (PPM)
$\text{CH}_2\text{-CH}_3$	1.98
CH_2	1.10
CH	3.0
NH	3.38

El acoplamiento de los protones antes descrito se confirmó mediante un experimento de correlación (Figura 29) homo nuclear H-H (cosy). Se aprecia la interacción de los protones en dos dimensiones, donde se identifican dos conjuntos de spines que corresponden a las posibles predicciones que se hicieron en los espectros de FTIR y Raman.

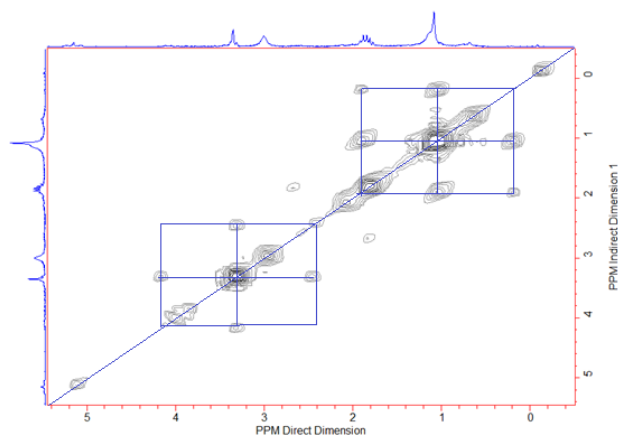


Figura 29. Espectro bidimensional ^1H -cosy (espectroscopía de correlación) del compuesto 2.

En el ^1H -RMN del compuesto 1 (Figura 30) las señales que se observan se encuentran en frecuencias similares a las que se observan en el espectro del compuesto 2, a excepción de dos señales en $\delta(\text{H})=2.4$ y $\delta(\text{H})=2.95$, que se integran para dos protones, posiblemente un CH_2 . Los resultados indican que las muestras analizadas son muy similares entre sí, tratándose de compuestos de la misma familia.

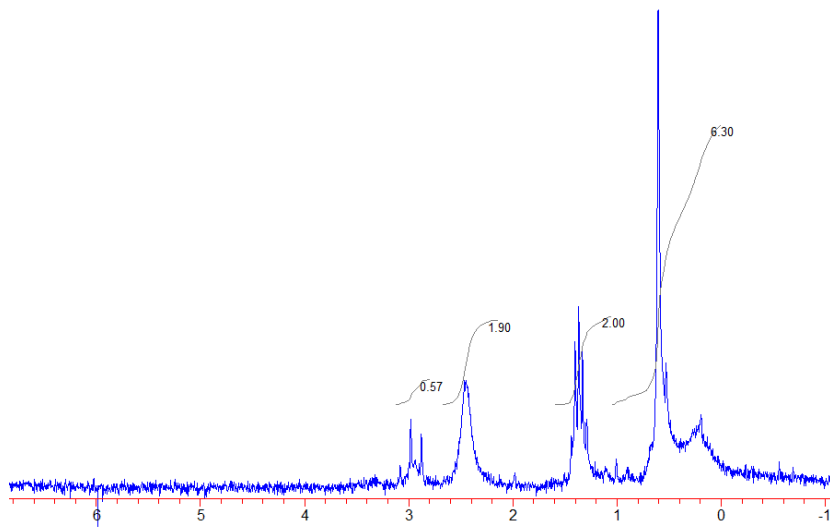


Figura 30. Resonancia magnética nuclear del compuesto 1

El acoplamiento de los protones homo nuclear H-H (cosy) para el compuesto 1 presentó un solo conjunto de spines a diferencia del compuesto dos, sugiriendo una molécula con menor peso molecular (Figura 31).

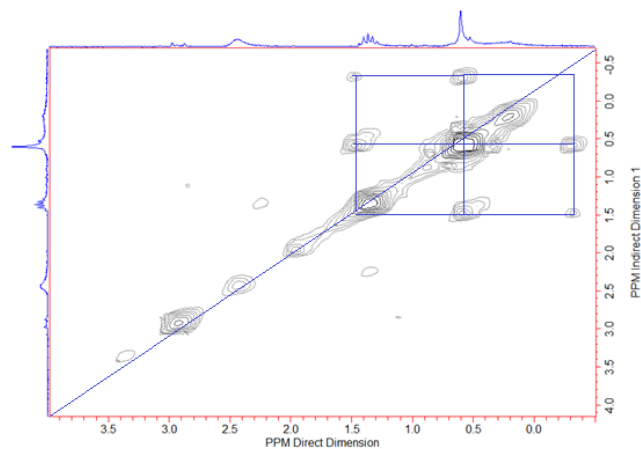


Figura 31. Espectro bidimensional ^1H -cosy (espectroscopía de correlación) del compuesto 1.

Los espectros de ^{13}C -RMN no presentaron señales, como anteriormente se mencionó esto podría deberse a la baja sensibilidad del equipo (Figura 32).

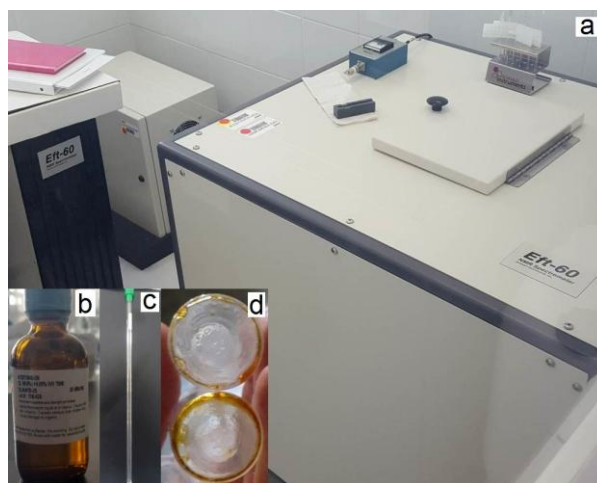


Figura 32. a) Equipo de resonancia magnética nuclear. b) Disolvente, acetona deuterada. c) Tubo. d) Muestra.

Se realizaron 2 posibles predicciones (Figura 33 y 34) con equipo con mayor sensibilidad también puede ser una solución, el imán genera un campo magnético estable que define la frecuencia de resonancia de cada núcleo, mientras mayor sea el campo magnético la señal será mejor definida. Para base a los resultados obtenidos en FTIR, Raman y RMN. Las señales que se observan entre 2 y 1.5 ppm coinciden a la posible asignación que se dio (Cuadro 9 y 10) al compuesto 2. El compuesto de interés es una cadena alifática ligada probablemente a grupos funcionales nitrogenados o con dobles enlaces C=C.

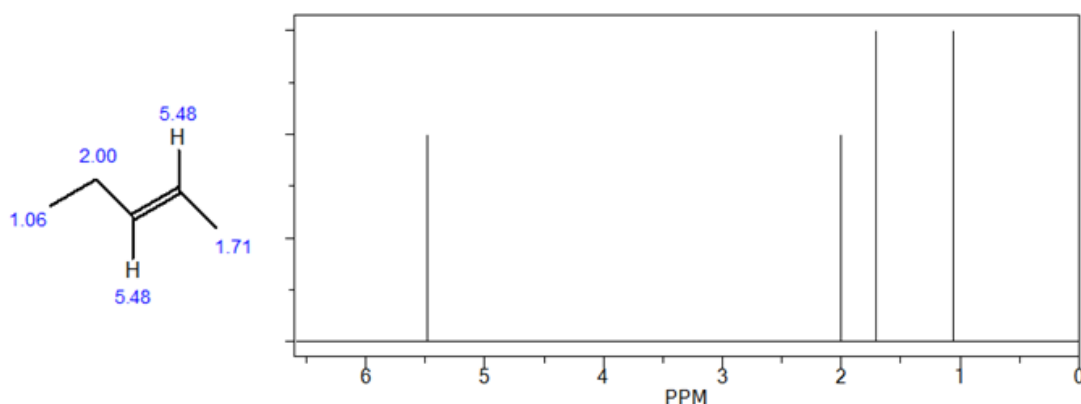


Figura 33. 2-penteno (CHEM-rmn H¹ estimación)

Cuadro 9. Protocolo de la predicción de H¹rmn

Asignación	Señal	Base + Inc.	Comentario (ppm rel. To TMS)
CH ₃	1.06	0.86	metil
CH ₂	2.00	1.37	metileno
CH ₃	1.71	0.86	metil
		0.85	1 alfa -C=C
H	5.48	5.25	1-etileno

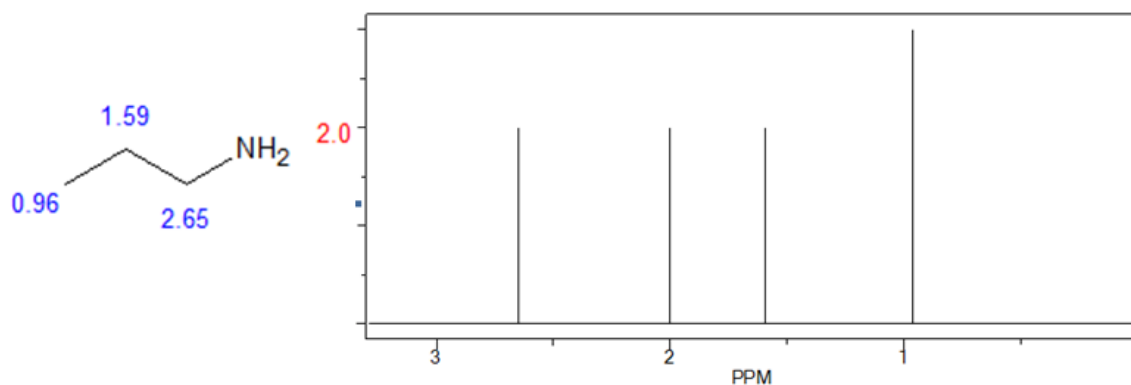


Figura 34. Propilamina (CHEM-rmn H¹ estimación)

Cuadro 10. Protocolo de la predicción de H¹ rmn

Asignación	Señal	Base + Inc.	Comentario (ppm rel. To TMS)
CH ₃	0.96	0.86	metil
CH ₂	1.59	1.37	metileno
CH ₂	2.65	1.37	metileno
NH ₂	2.0	2.0	amina

Para concluir la caracterización de la molécula o se tenga un acercamiento más preciso y certero del compuesto fluorescente es necesario continuar la experimentación realizando un análisis de espectrometría de masas para conocer el peso molecular y llegar a una predicción de la estructura molecular concreta de acuerdo a los resultados obtenidos en FTIR, Raman y RMN. Por otra parte, es necesario mejorar el método de purificación del compuesto para evitar interferencias de otros elementos y asegurarse del grado de pureza. Otro aspecto importante recae en utilizar un equipo con mayor sensibilidad para RNM.

5. CONCLUSIONES

Para este experimento podemos inferir que se utilizó la variante *D. hansenii hansenii* que presenta una temperatura máxima de crecimiento de 35 °C. Fue posible demostrar que *D. hansenii* tiene capacidad de adaptación en condiciones limitantes, como los medios definidos que se utilizaron en los experimentos. Se evidenció que la producción de biomasa disminuye considerablemente (83 % aproximadamente) en comparación al crecimiento que presenta en medios ricos como ypd y nutritivo. *D. hansenii* creció con valores de pH entre 4 -10 y diferentes temperaturas, siendo 20 °C y pH 7, las condiciones más favorables. Las fuentes de carbono y de nitrógeno más eficientes para su crecimiento fueron glicerol y cloruro de amonio respectivamente, en una relación C/N 7:1.

Finalmente, fue posible realizar un acercamiento de los grupos funcionales presentes en la muestra que emite fluorescencia, donde se concluyó que posiblemente es un compuesto alifático que puede presentar grupos funcionales nitrogenados.

6. REFERENCIAS

Barnet J, Payne R, Yarrow D. Yeast: Characterization and identification. 3a edición. Cambridge University Press, **2000**;vol.1:336-337.

Barton H, Northup D. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. J Cave Karst Stud **2007**;69:163-178.

Bolumar J. Caracterización del sistema proteolítico de *Debaryomyces Hansenii* aislada de embutidos curados. Departamento de Medicina preventiva, Salud Pública, **2005**;3:65-78.

Breuer U, Harms H. *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. En Centre of Environmental Research Leipzig-Halle, department of environmental microbiology, Germany: Yeast **2006**:415-37.

Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, Mohd O, Siddiqui K, Williams T. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. Microbial Biotechnol **2011**; 4: 449-460.

Cabeza M, Baca F, Puentes E, Loto F, Baigorí M, Morata I. Selection of psychrotolerant microorganisms producing cold-active pectinases for biotechnological processes at low temperature. Food Technol Biotech **2011**; 49: 187-195.

Castanier S, Gaële M, Perthuisot J. Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals. En: Springer-Verlag, Ed. Springer Heidelberg. Microbial sediments. Germany: **2000**:32-39.

Chang J, Graber H, Barbour R. Imaging of fluorescence in highly scattering media. IEEE T Bio-Med Eng **1997**;44:810-22.

Chang R. Química. 7a edición. México. McGraw-Hill Interamericana, **2007**.

Deesuth O, Laopaiboon P, Prasit J, Laopaiboon L. Optimization of nitrogen and metal ions supplementation for very high gravity bioethanol fermentation from sweet sorghum juice using an orthogonal array design. Energies **2012**; 5:3178-3197.

Demchenko A. Introduction to Fluorescence Sensing. Ed. Springer. Ukraine: **2009**:125-130.

Díaz A, Flórez J, Cortes A. Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027). *Revista Colombiana de Biotecnología*, **2005**;7:51-58.

Determann S, Lobbes J, Reuter R, Rullkötter J. Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria. *Mar Chem* **1998**;62:137-156.

Dujon B, Sherman D, Fischer G. Genome evolution in yeasts. *Nature* **2004**;430: 35–44.

Eisen J. Environmental Shotgun Sequencing: Its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *Plos Biology* **2007**;5:384-388.

Engel A. Microbial diversity of cave ecosystems, geomicrobiology, molecular and environmental perspective. Springer; **2010**; 219-238.

Ertola R, Yantorno O, Mignone C. *Microbiología Industrial*. Departamento de educación, cultura, ciencia y tecnología. Washintong, D.C. **2006**:41-63.

Ertola R, Yantorno O, Mignone C. Medios de fermentación, optimización. Departamento de microbiología y genética. Salamanca. **2012**:32-56.

Ferández E. Síntesis y estudio fotofísico de sondas fluorescentes. CSIC **2001**;2:16-18.

Ferrara de G, Ramírez A. Influencia de la relación C:N en la remoción de nitrógeno usando un sistema combinado de reactores por carga secuencial. *Revista de la facultad de ingeniería universidad central de Venezuela* **2003**;25:40-65.

Fuentes A, Castiñeiras L, Queraltó C. *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. 2a edición. Ed. Reverté: Barcelona, **1998**; Vol.1:110-125.

Gálvez E. Nuevas sondas moleculares fluorescentes basadas en cambios de la intensidad de emisión debida a interacciones dipolares inducidas. Instituto de Carboquímica, CSIC. **2004**; 33:5-16.

Gidi Y. Síntesis y estudio fotofísico de derivados vinílicos del naftoxazol [monografía en internet]. Chile, Facultad de ciencias Químicas y farmacéuticas, **2011** [consultado 2015 abril 23]. Disponible en: repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112095/gidi_ya.pdf?sequence.

Gillenwater A, Jacob R, Richards R. Fluorescence spectroscopy: a technique with potential to improve the early detection of aerodigestive tract neoplasia. *Head Neck Surg* **1998**;1:556-562.

Haugland P, Spence Z, Johnson D. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6a. edición. Michigan EUA: Molecular Probes **1996**:679.

Hofman J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol* **1999**;12:35-71.

Hrudayanath T, Bikash C, Rashmi R, Sushil K. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Ann Microbiol* **2012**;1590: 46-61.

Jacques N, Mallet S, Casaregola S. Delimitation of the species of the *Debaryomyces hansenii* complex by intron sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* **2009**;59:1242–1251.

Kurita O, Yamazaki E. Growth under alkaline conditions of the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Curr Microbiol* **2002**;45:277-280.

Kurtzman C, Fell J, Boekhout T. The yeast a taxonomic study. 5a. edición. EUA:Elsevisier,2011;vol.1:3-65.

Kurtzman C, Robnett C. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*. **1998**;7:61-72.

Kurtzman C, Robnett C. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, **1998**;73:331– 371.

Kurtzman C, Suzuki M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* **2010**;5:2–14.

Labas Y, Gurskaya N, Yanushevich Y, Fradkov A, Lukyanov K, Lukyanov S, Matz M. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**; 99:4256-4261.

Lakowicz J. Principles of fluorescence spectroscopy. 3a edición. New York: Ed. Springer, **2006**;Vol.2:330-385.

Leonhard K, Guiard B, Pellicchia G, Tzagoloff A, Neupert W, Langer T. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Molecular Cell* **2000**;5:629-638.

Lepingle A, Casaregola S, Neuveglise C. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii var. hansenii*. *FEBS Lett* **2000**;487:82-86.

Ling L, Schneider T, Peoples A, Spoering A, Engels I, Conlon B, Mueller A, Schaerberle T, Dallas Hughes, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman V, Douglas R. Cohen C, Fetterman A, Millett W, Nitti A, Zullo A, Chen C, Lewis K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **2015**;517:455-458.

Llorente B, Durrens P, Malpertuy A. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 20. Evolution of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **2000**;487:122–133.

Loening A, Fenn T, Gambhir S. Crystal structures of the Luciferasa and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. *J Mol Biol* **2007**;374:1017-1028.

Lucas J. El descubrimiento de las proteínas fluorescentes y su utilidad en la investigación biomédica. *An Real Acad Nac F* **2009**;75:99-112.

Medina P. Técnicas matemáticas para la reconstrucción de imágenes de fluorescencia con aplicaciones en biomedicina. *PIM* **2009**;1:26-28

Mikhail A , Konstantin A, Lukyanov A, Sergey A. Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *BioEssays* **2002**;24:953-959.

Miles A, Misra S, Irwin J. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hig Epid Microb Im* **1938**;38:732-749.

Morales H, Campos J, Olalde V. Aislamiento y caracterización de fosfobacterias. *Epidemiología y biología molecular de parásitos y microorganismos* **2012**;4:14-17.

Morales Y, Duque E, Rodríguez O. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Biotechnol Apl* **2010**;14:11.

Moeyaert B. Structural insight into fluorescent protein properties by rational design and characterization of photoconvertible, photoswitchable and phototoxic fluorescent proteins. *OFS Leuven* **2010**;1:12-20.

Muñoz M, Catrilaf G. Estimación de parámetros cinéticos de *Sccharomyces cerevisiae* en sistema de fermentación batch bajo distintas condiciones de crecimiento [monografía de internet]. Chile, Universidad Tecnológica de Chile, **2013** [consultado 2015 febrero 12]. Disponible en: http://www.researchgate.net/profile/Miguel_Munoz_Flores.

Sameiro T. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem Rev* **2009**;109:190-212.

Nakase T, Suzuki M. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Loder et Kreger-Van Rij and related species. I. Chemotaxonomic investigations. *J Gen Appl Microbiol* **1985a**;31:49-69.

Nakase T, Suzuki M. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Loder et Kreger-Van Rij and related species. II. Practical discrimination and nomenclature. *J Gen Appl Microbiol* **1985b**;31:71-86.

Nakase T, Suzuki M, Phaff H, Kurtzman C. *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. En: *The yeast. A taxonomic study.* Kurtzman 4a edición. Elsevier Science: **1998**;157-173.

Ochoa J, Vázquez R. Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológica. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México: **2004**;39-50.

Orberá T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Centro de estudios de Biotecnología Industrial. *Revista Iberoamericana de Micología* **2004**;21:15-19.

Orozco M, Hernandez N, Valle F, Gonzalez B, Ochoa J. Cell yield and superoxide dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different cultura conditions. *J Mar Biotechnol* **1998**;6:255-259.

Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* **2003**;22:189-259.

- Pretsch** E, Buhlmann P, Badertscher M. Structure determination of organic compounds. 4a edición, Ed. Springer: **2009**:157-335.
- Prista** C, Soeiro A, Vesely P, Almagro A, Ramos J, Loureiro C. Genes from *Debaryomyces hansenii* increase salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* W303. FEMS Yeast Res. 2002;2:151-157.
- Reichardt** C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. Chem Rev **1994**; 94:2319-2358.
- Richards** K, Sevick M. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. Annu Rev Phys Chem **1996**; 47:555-606.
- Russell** J. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. Adv Biochem Eng Biotechnol **1998**;61:1-21.
- Saluja** P, Prasad S. *Debaryomyces singareniensis* sp.nov., a novel yeast species isolated from coal mine soil in India. FEMS Yeast Res **2007**;7:482-488.
- Sawan** K, Sathyanarayana N. Osmotic adaptation in halotolerant yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: role of osmolytes and cation transport. Extremophiles **2009**;13:793-805.
- Schabereiter** G, Saiz J, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. FEMS Microbiology Letters **2002**;211:7-11.
- Schabereiter** G, Saiz J, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Culture-independent analyses of bacterial communities on paleolithic paintings and surrounding rock walls in karstic caves (Altamira, Tito Bustillo, La Garma and Llonin). Coalition Newsletter **2002**; 5:7-10.
- Skoog** A, Holler F, Timothy A, Nieman. Principles of instrumental analysis. 5a edición, Ed. Brooks/cole Thomson learning:**1998**:463-481.
- Segal** C, Rodarte B, Vilchis P, Rodríguez P, Valdés V, Lois A. Explorando las catalasas de *Debaryomyces hansenii*. Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM. Current Microbiology **2010**;3:105-136.

Shaner N, Campbell R, Steinbach P, Giepmans B, Palmer A, Tsien R. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **2004**;1222:1567-72.

Sherman D, Durrens P, Beyne E, Nikolski M, Souciet L, Genolevures C. Genolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res* **2004**;32:315-318.

Shimomura O, Tsuji A, Matsumoto M, Maeda M, Kricka L, Stanley P. Bioluminescence and chemiluminescence, progress and perspectives. Held at Pacifico Yokohama, Japan **2004**;27-34.

Soper S, McGown L, Warner I. Molecular Fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry. *Anal Chem* **1994**;70:428-444.

Sorensen B, Samuelsen H. The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat lipases of the meat starter culture organisms *staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. *Int J Food Microbiol* **1996**;32:59-71.

Sorensen B. Lipolysis of pork fat by the meat starter culture *Debaryomyces hansenii* at various environmental conditions. *Int J Food Microbiol* **1997**;34:187-193.

Suppan P, Ghoneim N. *Solvatochromism*. *Roy Soc of Ch* **1997**; 13: 272.

Suzuki M, Prasad S, Kurtzman C. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5a edición. Vol.2. Ed. Elsevier: **2011**;361–371.

Torres M, Quintero C, Atehortua L. Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. Programa de Bioingeniería, Universidad de Antioquia. *Revista Colombiana de Biotecnología* **2011**;13:103-109.

Trejos V, Alzate J, Gómez M. Descripción matemática y análisis de estabilidad de procesos fermentativos. *DYNA* **2009**;158:111-121.

Van den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* **2003**;6:213-218.

Vasileva E, Kambourova M, Tomova A, Lazarkevich I, Tomova I. Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *Int J Speleol* **2013**;42:65-76.

Vigliota G, Giacomo M, Carata E, Massardo D, Salvatore M, Tredici, Silvestro D, Paolino M, Pontieri P, Giudice L, Parente D, Alifano P. Nitrite metabolism in *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**;75:633-645.

Wagnières G, Star W, Wilson C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. **2008**; 68:603-632.

Wang X, Herman F. Fluorescence imaging spectroscopy and microscopy. John Wiley New York **1996**; 24:483-516.

Yadav P, Tyagi R. Industrial biotechnology. Ed. Discovery Publishing House. India:**2005**:88-90.

Zacharias A, Tsien Y. Molecular biology and mutation of green fluorescent protein. *Methods Biochem Anal* **2006**;47:83-120.

7. ANEXOS

Secuencia de *Debaryomyces hansenii* CCFEE 5368, subunidad mayor ribosomal gen RNA, secuencia parcial

Puntuación = 1068, Identidad = (592/592) 100.0%

Query: 1 CAAGACGGGTGGCTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGTCAAAAGACGCAGTCCTCGGT 60
Subject: 597 CAAGACGGGTGGCTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGTCAAAAGACGCAGTCCTCGGT 538
Query: 61 CTAGACAGGCAGTATCAACCAAGGCTATAAACTCCACCGAAGTAGAGCCACATTCCTTA 120
Subject: 537 CTAGACAGGCAGTATCAACCAAGGCTATAAACTCCACCGAAGTAGAGCCACATTCCTTA 478
Query: 121 GTCATTATCCTACCATCCAAACCGATGCTGGCCCAGTAAGCTGCGAGGAACCCAACCAAG 180
Subject: 477 GTCATTATCCTACCATCCAAACCGATGCTGGCCCAGTAAGCTGCGAGGAACCCAACCAAG 418
Query: 181 AAGGAAAGGATCGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTAC 240
Subject: 417 AAGGAAAGGATCGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTAC 358
Query: 241 GTACTTTTTCACTCTCTTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTTCGCT 300
Subject: 357 GTACTTTTTCACTCTCTTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTTCGCT 298
Query: 301 ATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATT 360
Subject: 297 ATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATT 238
Query: 361 CCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACTTTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGG 420
Subject: 237 CCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACTTTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGG 178
Query: 421 ATTCTCACCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCAACCTCAAAGTT 480
Subject: 177 ATTCTCACCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCAACCTCAAAGTT 118
Query: 481 ACCTTCTTCAAATTACAACCTCGGACACCGAAGGTGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGC 540
Subject: 117 ACCTTCTTCAAATTACAACCTCGGACACCGAAGGTGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGC 58
Query: 541 CGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCT 592
Subject: 57 CGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCT 6

Secuencia de *Debaryomyces hansenii* TJY18c 26S subunidad mayor ribosomal gen RNA, secuencia parcial

Puntuación = 1067, Identidad = (591/591) 100.0%

Query: 2 AAGACGGGTGGCTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGTCAAAAGACGCAGTCCTCGGTC 61
Subject: 603 AAGACGGGTGGCTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGTCAAAAGACGCAGTCCTCGGTC 544
Query: 62 TAGACAGGCAGTATCAACCAAGGCTATAAACTCCACCGAAGTAGAGCCACATTCCTTAG 121
Subject: 543 TAGACAGGCAGTATCAACCAAGGCTATAAACTCCACCGAAGTAGAGCCACATTCCTTAG 484
Query: 122 TCATTATCCTACCATCCAAACCGATGCTGGCCCAGTAAGCTGCGAGGAACCCAACCAAGA 181
Subject: 483 TCATTATCCTACCATCCAAACCGATGCTGGCCCAGTAAGCTGCGAGGAACCCAACCAAGA 424
Query: 182 AGGAAAGGATCGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACG 241
Subject: 423 AGGAAAGGATCGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACG 364
Query: 242 TACTTTTTCACTCTCTTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTTCGCTA 301
Subject: 363 TACTTTTTCACTCTCTTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTTCGCTA 304
Query: 302 TCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATT 361
Subject: 303 TCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATT 244
Query: 362 CCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACTTTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGA 421
Subject: 243 CCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACTTTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGA 184
Query: 422 TTCTCACCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCAACCTCAAAGTTA 481
Subject: 183 TTCTCACCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCAACCTCAAAGTTA 124
Query: 482 CCTTCTTCAAATTACAACCTCGGACACCGAAGGTGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGC 541
Subject: 123 CCTTCTTCAAATTACAACCTCGGACACCGAAGGTGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGC 64
Query: 542 GCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCT 592
Subject: 63 GCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCT 13