

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Instituto de Investigaciones
Biomedicas

U.A.C.P. y P. del C.C.H.



OBTENCION Y USO DE MUTANTES HIPERPRODUCTORAS
DE *Aspergillus* sp. EN LA PRODUCCION DE
PECTINASAS EXTRACELULARES A PARTIR DE
DESECHOS AGROINDUSTRIALES.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

PRESENTA :

G.F.B. Sara Elena Solis
Pereira

MEXICO, D.F. 1989



03062
rej.
16.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

J U R A D O

Presidente	Dr. Carlos Huítrón Vargas
Vocal	Dr. Fernando Bastarrachea Avilés
Secretario	Dr. Gustavo Viniegra González
Suplente	Dr. Miguel Lara Flores
Suplente	Dr. Lino Díaz de León

INDICE

1.0	INTRODUCCION.....	1
2.0	ANTECEDENTES	
2.1.0	Pectinasas.....	5
2.2.0	Sustancias pécticas.....	5
2.3.0	Clasificación de las pectinasas.....	7
2.4.0	Importancia comercial de las pectinasas.....	9
2.5.0	Microorganismos productores de pectinasas....	10
2.6.0	Regulación de la síntesis de pectinasas.....	12
2.7.0	Manipulación de genética para la hiperproducción de enzimas.....	13
3.0	MATERIALES Y METODOS	
3.1.0	Microorganismo.....	19
3.2.0	Medios de cultivo	
3.2.1	Medios para la propagación y conservación de cepas.....	19
3.2.2	Medios de producción de pectinasas.....	20
3.3.0	Método de mutagénesis.....	21
3.4.0	Método para la preselección de mutantes hiperproductoras.....	22
3.5.0	Método para la preselección de mutantes insensibles a represión por glicerol.....	23
3.6.0	Producción de pectinasas	
3.6.1	Preparación del inóculo.....	23
3.6.2	Producción de actividad pectinolítica en matraz.....	23
3.6.3	Producción de actividad pectinolítica en fermentador.....	24
3.7.0	Determinación de la actividad pectinolítica	
3.7.1	Actividad pectinolítica por grupos reductores.....	24

3.7.2	Actividad pectinolítica por viscosimetría.....	25
3.7.3	Actividad pectinolítica para clarificar el jugo de manzana.....	27
3.8.0	Determinación de la protefna extracelular	28
3.9.0	Determinación de la protefna intracelular	28
3.10.0	Determinación de la concentración directa de grupos reductores en el medio de cultivo	29
3.11.0	Determinación del pH óptimo en la actividad pectinolítica	29
3.12.0	Dialisis de los sobrenadantes en columna sephadex B-15	29
4.0	RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1.0	Método de preselección de mutantes hiperproductoras de pectinasas extracelulares.	31
4.2.0	Evaluación de la actividad pectinolítica extracelular de la cepa silvestre	36
4.3.0.	Obtención de mutantes hiperproductoras de Aspergillus sp y evaluación de la producción de actividad pectinolítica.....	42
4.4.0	Obtención de mutantes de Aspergillus sp insensibles a represión catabólica	47
4.5.0	Producción de pectinasas por la mutante IR663 en fermentador de 14 l	52
4.6.0	Caracterización de la actividad pectinolítica extracelular de la mutante IR663	54
5.0	CONCLUSIONES	58
6.0	BIBLIOGRAFIA	62

INTRODUCCION

Las enzimas son elementos clave en todos los sistemas biológicos y muchas de ellas tienen importancia práctica en la industria alimentaria, farmacéutica y en análisis de diagnóstico. Tradicionalmente las enzimas de uso práctico se han extraído a partir de vegetales y animales, pero actualmente se prefiere el uso de microorganismos, ya que es posible manejar la producción de enzimas mediante las condiciones de cultivo, además de que la economía en la producción de enzimas puede ser incrementada mediante la obtención de cepas mutantes que presenten alteraciones de los mecanismos que regulan la síntesis de sus enzimas, como las insensibles a represión catabólica, las hiperproductoras o aquellas que sintetizan mayor cantidad de enzimas sin la necesidad de un inductor.

En la actualidad existe gran interés en el aprovechamiento biotecnológico de subproductos agroindustriales, ya que se producen grandes volúmenes que están siendo subutilizados y que normalmente se manejan como desperdicios. Dentro de las alternativas existentes está la bioconversión de los mismos a partir de procesos

microbianos para la producción de enzimas. Así encontramos desechos con un alto contenido de pectina, como la pulpa de remolacha, la cáscara de manzana y cáscara de cítricos que pueden ser utilizados como sustratos de fermentación para la producción de pectinasas, que son enzimas degradadoras de las sustancias pécticas que tienen una gran aplicación industrial. En la industria de procesamiento de jugos, como el de la manzana y el de la uva, y en la elaboración de vinos, las pectinasas son utilizadas para clarificar los jugos, con lo cual se eliminan los problemas de filtración y se tienen mayores rendimientos. Cuando se adicionan estas enzimas durante el prensado de la fruta, se observa también una disminución en la viscosidad y un incremento en la velocidad de filtración, lo que por resultado una mayor extracción del jugo.

La acción de estas enzimas se basa principalmente en la desesterificación de la pectina a través de la pectina esterasa y las poligalacturonasas que hidrolizan los enlaces α 1,4, que unen las moléculas de ácido galacturónico que conforman la pectina; asimismo, esta acción puede ser de tipo exo cuando ocurre en el extremo o de tipo endo cuando se efectúa aleatoriamente sobre la molécula de pectina.

Las pectinasas son producidas por bacterias, levaduras y

hongos y, dependiendo del microorganismo y del tipo de enzima su localización es intracelular, extracelular o periplásmica. Desde el punto de vista comercial las pectinasas fúngicas y en especial las de *Aspergillus niger* son las preferidas debido a que producen extracelularmente una mezcla de actividades pectinolíticas muy eficaces en la disminución de la viscosidad de jugos de frutas y asimismo, como son extracelulares, se facilita su recuperación del caldo de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, la producción de las enzimas por los microorganismos esta controlada por diversos mecanismos; sin embargo, existe poca información acerca de los fenómenos regulatorios asociados a la producción de pectinasas por hongos. La mayoría de las pectinasas son inducibles, por lo que se hace necesario el uso de pectina en el medio o de un sustrato crudo con un alto contenido de pectina para estimular su producción. Por otro lado pueden ser sensibles a represión catabólica por la fuente de carbono.

En México el mercado de pectinasas en la industria alimentaria va en aumento; sin embargo, no se producen en el país, a pesar de que se dispone de subproductos abundantes que contienen pectina, que se podrían utilizar como materia prima para la producción de estas enzimas.

Por esta razón en nuestro laboratorio fue seleccionado el hongo *Aspergillus* sp., que es capaz de producir pectinasas extracelulares cuando es crecido a 37° C utilizando un subproducto de la industria textil, que es la pulpa de henequén, como fuente de carbono. Los filtrados libres de células obtenidos, poseen una actividad clarificante del jugo de manzana, que es similar a la que presentan algunas preparaciones comerciales. El hongo aislado es una cepa silvestre, por lo tanto, es susceptible a manipulación genética para incrementar los rendimientos en su producción.

En base a lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo se enfoca a la obtención de mutantes de *Aspergillus* sp., insensibles a represión catabólica y/o hiperproductoras de pectinasas extracelulares, y sobre la aplicación de las mutantes en la producción de las enzimas a partir de desechos agroindustriales.

2.1.0 Pectinasas .

Uno de los grupos importantes de enzimas empleadas en la industria, específicamente en el procesamiento de frutas y vegetales, lo constituyen las enzimas pectinolíticas. Estas enzimas tienen la capacidad de degradar las sustancias pécticas que están compuestas por unidades de ácido galacturónico, ligadas por enlaces C-1,4.

2.2.0 Sustancias Pécticas .

Las sustancias pécticas son un grupo complejo de polisacáridos que se presentan en cantidades variables en todos los tejidos de plantas, actuando como cementantes intercelulares_{1,2,3}. Los grupos carboxilo del ácido poligalacturónico pueden ser parcialmente esterificados por grupos metilo o parcial o totalmente neutralizados por una o más bases. La pectina se presenta primariamente como protopectina, que es insoluble en agua.

Se refiere a ácidos pectínicos cuando la molécula contiene una pequeña porción de grupos metil éster, son

capaces de formar geles con azúcares y ácidos. Si el contenido de metoxilo es bajo, la formación del gel requiere la presencia de ciertos iones.

El término pectina, es utilizado para designar a los ácidos pectínicos con un grado variable de grupos metil éster y de neutralización, son capaces de formar geles con azúcares y ácidos bajo condiciones apropiadas. El ácido péctico es el nombre aplicado a las sustancias pécticas que están esencialmente libres de grupos metil éster.

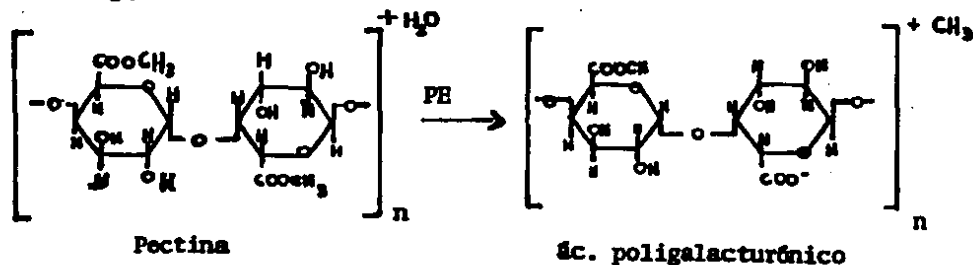
Los grupos carboxílicos del ácido galacturónico son esterificados con metanol y su contenido depende de la fuente de carbono de la que proviene y del método de extracción empleado. Dentro de estos polisacáridos, también han sido aislados y caracterizados azúcares como L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y L-fucosa a.s.

Las sustancias pécticas son solubles en agua e insolubles en compuestos orgánicos; la facilidad de disolución disminuye conforme aumenta el tamaño de la cadena, formando soluciones altamente viscosas. Esta es una propiedad limitante en el procesamiento de los jugos de frutas y vegetales, debido a que la presencia de pectina favorece en los jugos a la formación de suspensiones coloidales de viscosidad alta, dificultando la filtración de los mismos.

2.3.0 Clasificación de las pectinasas .

Básicamente existen dos tipos de enzimas pectinolíticas : , Las pectina esterases y las despolimerasas. Dentro de estos tipos se encuentran clasificadas las doce actividades que se han detectado en plantas, bacterias, levaduras y hongos, aunque no todas son producidas por un mismo organismo. TABLE 1 .

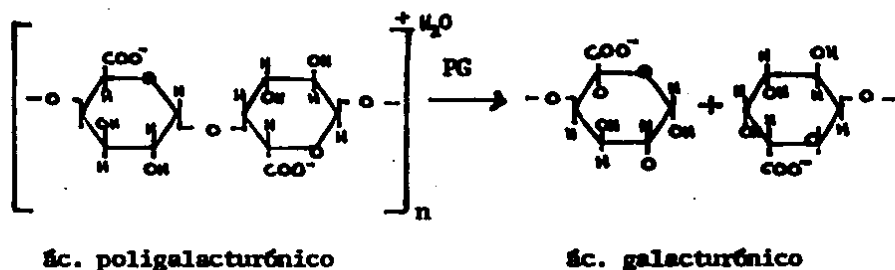
Las pectina esterases (PE) hidrolizan los enlaces metil éster de la pectina, disminuyendo su grado de metoxilación y finalmente es transformada en ácido pectico.



De acuerdo al sitio de ruptura, se clasifican en tipo exo cuando la acción ocurre en el extremo de la pectina liberando principalmente grupos reductores y se denomina tipo endo cuando la acción se realiza aleatoriamente sobre la molécula de pectina, causando principalmente la disminución de la viscosidad en una solución de pectina, y afectan poco la liberación de grupos reductores, es por esto que estas enzimas son la que ofrecen mayor interés

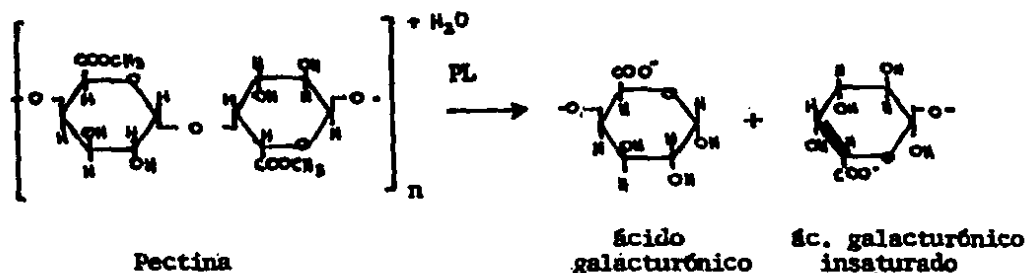
industrial.

Las poligalacturonasas (PG) catalizan la hidrólisis del ácido poligalacturónico de una forma endo o exo.



Las endopoligalacturonasas actúan hidrolizando aleatoriamente la pectina o el ácido poligalacturónico, obteniéndose oligourónidos de menor tamaño, lo cual se refleja en una disminución de la viscosidad de una solución de pectina. Las exopoligalacturonasas rompen los enlaces glicosídicos terminales α -1,4, liberando ácido galacturónico como producto. Las poligalacturonasas son producidas principalmente por hongos y actúan a pH de 4.0 a 6.5_±.

Las pectinoliasas (PL) catalizan el rompimiento de los enlaces glicosídicos α -1,4 de las sustancias pécticas y oligogalacturónidos por el proceso de transeliminación, son producidas por bacterias y algunas requieren de iones divalentes para su actividad_±.



2.4.0. Importancia comercial de las pectinasas

Las enzimas pectinolíticas son empleadas para una gran variedad de propósitos. Entre los principales usos se encuentra el procesamiento de frutas para incrementar los rendimientos en la extracción de jugos, facilitándose la extracción de las sustancias solubles de las células por la acción de las enzimas, ya que éstas actúan desintegrando el tejido de las frutas, permitiendo así una mayor liberación del jugo.

Las pectinasas favorecen la clarificación de los jugos, ya que degradan la pectina presente, formando partículas suspendidas que se aglomeran formando flóculos que son removidos por centrifugación y filtración.

Otras aplicaciones de las pectinasas se encuentran en la clarificación de los vinos^{1,14}; en la preparación de bases de néctares y alimentos de bebés, en el tratamiento de la pulpa de coco y las aceitunas para

incrementar los rendimientos en la recuperación del aceite, en la limpieza de la cáscara de frutas para su uso en confitería; también se utilizan para el tratamiento de maderas blandas, fibras textiles, lino, cáñamo y yute.

2.5.0 Microorganismos productores de pectinasas.

Las pectinasas son producidas por una gran variedad de microorganismos Tabla I, siendo los hongos los microorganismos empleados a gran escala debido a que sus enzimas son extracelulares y a que producen principalmente endopoligalacturonasas, que son las que presentan mayor aplicación en la industria. La producción comercial de pectinasas se lleva a cabo empleando especies del género Aspergillus; entre los microorganismos más utilizados se encuentran las cepas A. niger, A. wentii, A. flavus y A. oryzae, siendo A. niger el de mayor importancia comercial actual. Tanto en Japón como en Estados Unidos y en algunos países de Europa, la producción de pectinasas se lleva a cabo mediante el

cultivo sumergido y semisólido 12. Como fuente de carbono e inductor se utiliza la pectina y materiales que la contienen, como son los subproductos de la industrialización de, la remolacha, del limón y de la manzanas, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19.

TABLE I DISTRIBUCION DE LAS ENZIMAS PECTINOLITICAS EN ALGUNOS MICROORGANISMOS.

MICROORGANISMO	PE	PG	PGL	PMG	PMGL	OG	OGL
<i>Bacillus</i> sp.			•			•	
<i>Erwinia aceroides</i>		•	•		•		•
<i>E. carotovora</i>		•	•				
<i>Pseudomonas marginalis</i>	•	•	•				
<i>Xanthomonas campestris</i>	•		•				
<i>Clostridium multifementans</i>	•		•				
<i>Streptomyces nitrosporus</i>			•				
<i>Trichoderma koningsii</i>		•					
<i>Aspergillus niger</i>	•	•		•	•		
<i>Aspergillus niger</i>			•		•		
<i>Penicillium digitatum</i>	•				•		
<i>Rizopus solani</i>	•		•	•			

2.6.0 Regulación de la síntesis de pectinasas

Las pectinasas son generalmente enzimas inducibles, lo que hace necesaria la adición de pectina o sustrato que la contenga para estimular su biosíntesis. Estas enzimas pueden ser producidas constitutivamente y también pueden ser sensibles a represión catabólica.

A continuación se dan algunos ejemplos de los aspectos regulatorios de la producción de pectinasas por bacterias y hongos. En bacterias se ha reportado la producción constitutiva de endopoligalacturonato liasa en *Erwinia carotovora*; además estas enzimas están sujetas a inducción y represión catabólica, como fué demostrado en fermentación batch, en donde se observó que existe velocidad diferencial de formación de enzimas, la cual fué baja en presencia de glucosa, alta con glicerol y más alta aún con pectato como única fuente de carbono. Asimismo, se observó que el efecto de represión en la síntesis de endo PGL está asociado con la disminución de AMP cíclico intracelular. En *Bacillus subtilis* la producción máxima de poligalacturonato liasa (PGL) se lleva a cabo en presencia de glucosa. *Bifidobacterium* también produce PGL constitutivamente, pero además, cuando utiliza pectina como fuente de carbono, se induce la pectina esterasa.

En hongos aún cuando son menos conocidos los aspectos regulatorios de la síntesis de pectinasas, se sabe que

algunas pueden ser producidas constitutivamente, como las endopoligalacturonasas de Aspergillus saitoi, que se forman en ausencia de las sustancias pécticas₂₁.

Cuando Aspergillus niger crece en un medio con 2% de sacarosa y 2% de pectina, las pectina esterasas, las poligalacturonasas y las polimetilgalacturonasas son producidas cuando la concentración de sacarosa disminuye rápidamente del medio de cultivos. También se ha visto en una mutante de A. niger que requiere adenina para la producción de poligalacturonasas es sensible a represión catabólica por intermediarios de la glucólisis y que la represión parece estar a nivel de traducción pues la medición de los RNA mensajeros fue estable₂₂.

2.7.0 Manipulación genética para la hiperproducción de enzimas

A través de la manipulación genética se han obtenido mutantes que presentan alteraciones en sus características morfológicas, estructurales o funcionales en comparación con las células padres. El desarrollo de un microorganismo industrial, partiendo de una bacteria u hongo silvestre, exige cambios que eliminen propiedades no deseables, incrementen las adecuadas, o introduzcan otras nuevas. La mutagénesis seguida por una subsecuente selección y purificación representa la actividad más importante para lograr incrementar los rendimientos en los productos de

fermentación, ya que en la industria las altas productividades son esenciales para reducir o mantener los costos de producción.

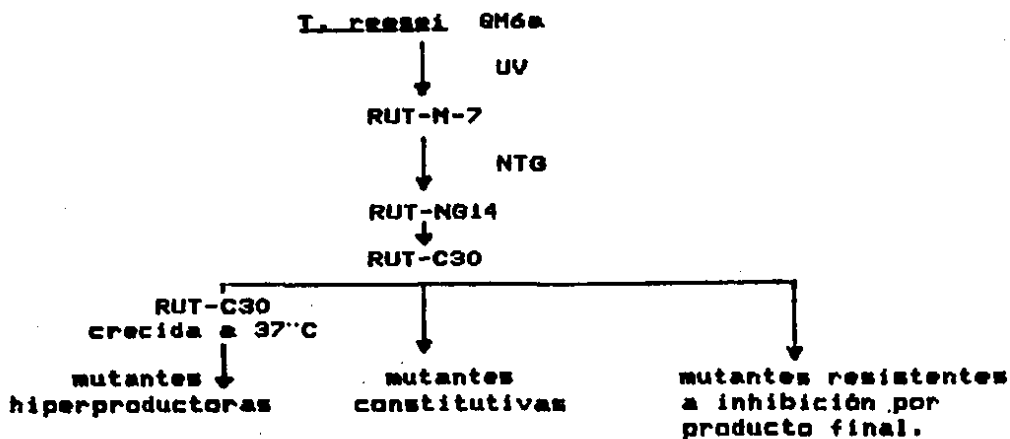
Aún cuando las mutaciones pueden ocurrir espontáneamente, el orden en el que ocurren es de 1×10^{-6} exp. 6; esta frecuencia puede ser incrementada considerablemente mediante el empleo de agente mutagénicos físicos y químicos, como lo son entre otros, el ácido nitroso, metil etano sulfonato, N -metil- N₂- nitro- N-nitrosoguanidina, acridinas, luz ultravioleta, y las radiaciones ionizantes.

Existen en la literatura, ejemplos de enzimas que se ha logrado incrementar los rendimientos en su producción por medio de la mutagénesis, como es el caso de la aspartato transcarbamilasa, que ha sido incrementada 500 veces₂₀, la hidrofólico reductasa 200 veces₂₀ y la glucoamilasa 1.6 veces₂₀.

Las cepas hiperproductoras que actualmente se utilizan en la industria, se han obtenido a partir de sucesivas etapas de mutación y selección, entre éstas se encuentran las amilasas, que actúan hidrolizando el almidón a glucosa. Estas enzimas se producen principalmente por *Bacillus* y se producen conjuntamente con las proteasas. La producción de amilasas de *B. subtilis* Marbourg 6160, se logró

incrementar de 11 U/ml a 2530 U/ml con la mutante PP13 y de proteasas de 5 a 382 U/ml con la mutante YY154_{aa}.

Otro sistema multienzimático que ha sido muy estudiado, es el celulolítico, del cual se han obtenido por mutaciones sucesivas de *L. reeszi* cepas hiperproductoras y/o insensibles a represión catabólica. Entre las mutantes hiperproductoras encontradas está la RUT-NG14, que presentó una actividad para degradar el papel filtro de 15 U/ml con respecto a 1 U/ml producida por la GM6a (cepa silvestre) y la RUT-C30, que además de producir la misma actividad que RUT-NG14, es insensible a represión catabólica por glucosa y glicerol₂₇.



Genealogía de mutantes con altos rendimientos de celulasas en *L. reeszi*.

Existen otros sistemas complejos, como el pectinolítico, en donde hay poca información de trabajos sobre manipulación genética. Por ello resulta importante la búsqueda de cepas mutantes que puedan contribuir a un mayor conocimiento de los mecanismos que controlan la producción de pectinasas. Asimismo, también es importante tratar de incrementar los rendimientos en la producción de estas enzimas a través de la mutagénesis, con fines de aplicación industrial.

Como se mencionó anteriormente, la cepa de *Aspergillus* sp. que estamos utilizando, fue aislada de una desfibradora de henequén y produce inductivamente pectinasas extracelulares a partir de pectina y de subproductos agroindustriales que la contienen. Cuando crece en un medio que contiene pulpa de henequén como fuente de carbono, produce pectinasas, que son mejores que algunas muestras comerciales para clarificar el jugo de manzana, siendo ésta una de las aplicaciones con mayor demanda en la industria. Nuestra cepa de *Aspergillus* produce mayor actividad pectinolítica extracelular a partir de desechos agroindustriales que cuando crece en pectina; no obstante, desde el punto de vista práctico, resulta importante contar con cepas hiperproductoras.

En trabajos realizados previamente con *Aspergillus* sp. crecido en pulpa de henequén, se incrementó 5 veces la actividad medida por viscosimetría cuando este sustrato fué dializado en

relación al control sin dializar, probablemente debido a la eliminación de moléculas dializables presentes en la pulpa. Por otro lado, al emplear pectina como sustrato, se observó que cuando se acumulaban los grupos reductores en el medio durante el curso de la fermentación, la producción de la actividad pectinolítica fue muy baja, pero logró incrementarse al disminuir los grupos reductores en el medio durante el curso de la fermentación. Posteriormente se demostró que esta acumulación no ocurría cuando se limita el suministro de pectina en un sistema de cultivo alimentado de *Aspergillus* sp. so, en donde se observó que al no haber acumulación, la actividad producida se incrementaba alrededor de 10 veces en relación al control no limitado de pectina.

Por lo anteriormente expuesto, se consideró relevante la mutagénesis de *Aspergillus* sp., con el fin de obtener mutantes hiperproductoras y/o insensibles a represión catabólica con mayor capacidad de producción de pectinasas extracelulares.

MATERIALES Y METODOS

3.1.0 Microorganismos

El microorganismo que se utiliza en este estudio, es un hongo perteneciente al género Aspergillus sp, que fué aislado y seleccionado a partir de muestras de suelo de una planta desfibadora de henequén en el Estado de Yucatán, por la capacidad que tiene de producir pectinasas extracelulares a 37°C a partir de pectina y desechos agroindustriales sp, sp, sp.

3.2.0 Medios de cultivo

3.2.1 Medios para la propagación y conservación de cepas

Medio A: Las cepas se conservaron en placas con medio de papa-dextrosa-agar (PDA) despues de crecer por 72 h a 37°C.

Para el aislamiento y preselección de mutantes hiperproductoras, placas de los siguientes medios:

Medio B: Medio de propagación (medio completo): extracto

de levadura 1%, peptona 1%, glucosa 2% y agar 2%. El pH fue ajustado a 4.5 con sol. de H_2SO_4

Medio C: Medio de crecimiento : Se prepararon placas con 25 ml de una, solución salina compuesta de KH_2PO_4 , 0.2%; K_2HPO_4 , 0.2%; $(NH_4)_2SO_4$, 0.2%; al cual se adicionó pectina al 1% y agar al 2%, el pH fue ajustado a 4.5 con sol. de H_2SO_4 .

Medio D: Medio de formación de halo : Se prepararon placas con 25 ml de medio igual a "C", pero con pectina al 0.25%, más 250 μg de cicloheximida por ml de medio.

Medio E: Medio para el aislamiento de mutantes insensibles a represión catabólica, es igual al medio "C", pero suplementado con glicerol al 1%.

3.2.2 Medios de producción de pectinasas .

Medio F: El medio de laboratorio para la producción de actividad pectinolítica en matríz, contenía: KH_2SO_4 0.2%; K_2HPO_4 , 0.2% ; $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% y pectina al 1% o desechos agroindustriales al 1%. La concentración de la fuente de carbono varió dependiendo del experimento. El pH fue ajustado a 4.5 con sol. de H_2SO_4 y fueron esterilizados a 121°C y 15 psi durante 15 min.

Medio G: El medio industrial para para la producción de actividad pectinolítica en fermentador de 14 l. contenía las siguientes sales grado industrial:

KH_2PO_4 , 0.2%;

K_2HPO_4 , 0.2%;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2%; cáscara de limón (*) al

1% y 10 L de agua de la llave. El pH inicial fué ajustado a 3.5 con sol. de H_2SO_4 y fueron esterilizados a 121°C y 20 psi durante 30 minutos.

(*) La cáscara de limón es un subproducto de la industrialización del limón, y fué obtenido en Tecomán, Colima y fué secado a la intemperie.

3.3.0 Método de mutagénesis

Aspergillus sp fué crecido en placas con medio "A". A las 72 h se recolectaron las esporas en 13 ml de buffer de fosfatos 0.1M a pH7 hasta tener una densidad óptica de 0.2. Se tomó un ml. de esta suspensión y se hicieron diluciones seriadas en agua destilada estéril para sembrar en placas con medio "B" y se incubaron a 37°C durante 72 h. Se contó el número de colonias no mutagenizadas para obtener la cuenta inicial (100% de sobrevivencia). Se mezclaron 9.5 ml de la suspensión celular de 0.2 de D.O. con 0.5 ml de N-metil-N₁-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG)* a una concentración de 1mg/ml. Se dejó actuar por 120 min, tomando alícuotas de 2 ml cada 30 min. Se adicionaron 10 ml de sol. salina estéril con Tween al 2%, se centrifugaron las células durante 15 min, a 10,000 rpm, cambiando 3 veces la solución salina. Se resuspendieron en 2 ml de medio "B" líquido y que además contiene glicerol al 20%. Se tomaron 0.5 ml para hacer diluciones seriadas que

fueron sembradas en placas que contienen el mismo medio, se incubaron 96 h a 37°C y se contó el número de colonias sobrevivientes a la acción del agente mutagénico.

En base los datos obtenidos se trazó una curva para determinar el porcentaje de colonias sobrevivientes con respecto al número de colonias iniciales (100%). De esta manera se determinó la concentración y tiempo óptimo de acción del mutágeno.

(*) la solución de NTG se preparó pesando 10mg de la misma y se disolvieron en 10 ml de sol. reguladora de fosfatos 0.1M y pH 7. Se esterilizó por filtración y se tomaron 0.5 ml para cada 10 ml de medio "B".

3.4.0 Método para la preselección de mutantes hiperproductoras

Las esporas mutagenizadas fueron propagadas en placas con medio "A" e incubadas a 37°C durante 72 h, después se tomaron colonias al azar, las cuales fueron estriadas en el medio "C" y se incubaron las placas durante 72 h a 37°C. Una vez crecido el microorganismo, se tomó un cilindro de 3 mm de diámetro con un sacabocado, el cual fué transferido en condiciones estériles al medio "D". Se incubaron las placas a 37°C durante 48 h. Por último se adicionaron a las placas 2 ml de sol. alcohólica de yodo al 1% para revelar los halos. Con este método se preseleccionaron aquellas colonias mutagenizadas que formaron un halo de hidrólisis mayor que el de la cepa silvestre.

3.5.0 Método para la preselección de mutantes insensibles a represión por glicerol .

La metodología es la misma que se describe en el inciso 3.4.0; la diferencia es que al medio "C" se adicionó glicerol al 1%. En estas condiciones la cepa silvestre no fue capaz de formar halos de hidrólisis, debido a que el glicerol reprimió la síntesis de sus pectinasas. Sin embargo, si fue posible preseleccionar a las mutantes que por ser insensibles pudieron formar los halos de hidrólisis.

3.6.0 Producción de pectinasas .

3.6.1 Preparación del inóculo .

El microorganismo fue crecido en placas de medio "A", después de 72 h de incubación, se preparó una suspensión de esporas en agua destilada estéril hasta obtener una densidad óptica total de 5.0.

3.6.2 Producción de actividad pectinolítica en matraz .

Matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml. de medio "F", fueron inoculados con 2 ml. de la suspensión de esporas y fueron incubados 120 h a 37°C en un agitador rotatorio a 200 rpm. Durante la fermentación se tomaron alícuotas de 10 ml. a diferentes tiempos, las cuales fueron centrifugadas a 3,500 rpm. durante 15 min.. En el sobrenadante se determinó la actividad pectinolítica y

en el precipitado la proteína intracelular.

3.6.3 Producción de actividad pectinolítica en fermentador .

Se utilizó un fermentador de vidrio Labroferm, marca New Brunswick con jarra de 14 L y 10 L de medio G como volumen de trabajo, con tres impulsores tipo turbina , seis paletas planas y cuatro baffles. Dimensiones: diámetro del impulsor 7.2 cm, altura de paleta 1.5 cm, ancho de paleta 1.8 cm, diam. interno de la jarra 20.5 cm, altura del líquido 28.5 cm, altura de la jarra 45 cm y ancho de baffle 2 cm. La inoculación se llevó a cabo con 50 ml. de la suspensión de esporas. Las fermentaciones se mantuvieron a 37°C con agitación de 200 rpm. y suministro de aire de 10 l/min. a una presión de 1.05 Kg/cm exp. 2. Durante la fermentación se tomaron muestras de 100 ml. en forma aseptica, 60 ml. fueron centrifugados a 3,500 rpm. durante 15 min. En el sobrenadante se determinó la proteína extracelular y la actividad pectinolítica y en el precipitado se determinó la proteína intracelular.

3.7.0 Determinación de la actividad pectinolítica

3.7.1 Actividad pectinolítica por grupos reductores

La actividad fué medida en el sobrenadante por el método del ácido 2,3 dinitrosalisílico (DNS)es, determinando la concentración de grupos reductores solubles producidos por la acción de las pectinasas. La

mezcla de reacción contiene 1 ml. de solución de pectina al 0.9% y 0.7 ml de buffer acetatos 0.17 M a pH 5. Los tubos de ensayo con la solución fueron preincubados, en baño María, a 45°C por 5 min.. Después se adicionaron 0.3 ml del filtrado, exceptuando los blancos y se incubaron a 45°C durante una hora. La reacción fué detenida con 3 ml de la sol. DNS. Después de añadirle el DNS a los blancos, se adicionaron los 0.3 ml , del filtrado correspondiente. A continuación los tubos fueron hervidos durante 5 min., enfriados a temperatura ambiente y se adicionaron 15 ml de agua destilada. Se tomó una alícuota de 4 ml. y se centrifugó a 3,500 rpm. durante 15 min.. Se leyó la D.O. a 550 nm en un fotocolorímetro Bausch & Lomb. La concentración de grupos reductores se calculó a partir de una curva estándar de ácido galacturónico.

3.7.2 Actividad pectinolítica por viscosimetría

Este ensayo es utilizado para determinar la acción de las pectinasas por medio del cambio en la fluidez relativa de una solución de pectina. En este método se utilizó un viscosímetro Cannon-Fensk mantenido en un baño de agua a 30°C. Se adicionaron 10 ml de una solución de pectina al 1% en buffer de acetatos 0.2 N a pH 4.2, la cual fue preincubada durante 10 min a 30°C. A tiempo cero se adicionaron 0.5 ml. del sobrenadante enzimático a la solución de pectina, se mezcló vigorosamente la mezcla de reacción que de inmediato se adicionó por el tubo

ancho al viscosímetro y se aplicó succión por el tubo angosto hasta que la solución quedó por encima de la línea superior marcada en el viscosímetro. Se midió el tiempo de eflujo de la solución al bajar por las líneas superior e inferior. La mezcla de reacción se subió nuevamente hasta arriba de la línea superior y se midió nuevamente el tiempo que tarda la solución de pectina en bajar de ambas líneas. La operación se repitió 4 veces durante 10 min. de tiempo total de reacción.

El blanco del sustrato y del agua se prepararon adicionando a un tubo 10 ml de la solución de pectina más 0.5 ml. de agua y 10.5 ml. de agua respectivamente. Los tubos fueron preincubados a 30°C en el baño de agua durante 10 min. y se midió en cada uno el tiempo de eflujo promedios.

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$Fr = (Ts - Tw) / (Tt - Tw)$$

$$Tn = 1/2 (Tt / 60 \text{ seg/min}) + Tr = (Tr/120) = Tr$$

donde:

Fr = Fluidez relativa de cada tiempo de reacción.

Ts = Tiempo de eflujo promedio del blanco de sustrato en segundos.

Tw = Tiempo de eflujo promedio del agua en segundos.

Tt = Tiempo de eflujo de la mezcla de reacción en segundos.

T_r = Tiempo de reacción desde la adición de la enzima al sustrato hasta cada inicio de la medición del tiempo de eflujo en min.

T_n = Tiempo de reacción en minutos, más un medio del tiempo de eflujo en minutos.

Con los valores obtenidos, se calcula la fluidez relativa para cada uno de los tiempos de reacción. Se grafican los valores de la fluidez relativa en las ordenadas y de los tiempos de reacción en las abscisas, la pendiente de la línea recta obtenida corresponde al cambio de la fluidez relativa de la solución de pectina por minuto.

Una unidad de enzima pectinolítica producirá un cambio en la fluidez relativa de 0.1 por segundo en las condiciones de ensayos.

3.7.3 Actividad para clarificar el jugo de manzana .

Este método se basa en la acción clarificante de las pectinasas sobre el jugo de manzana y fue medido por el volumen de jugo filtrado durante 60 min. Es. El sistema de reacción contiene 100 ml de jugo de manzana (starking) obtenido en un extractor de jugos doméstico y un ml. de filtrado con una concentración de proteína de aproximadamente 35 μ g. Los matraces fueron incubados a 45°C durante 30 min. con agitación ligera y se detuvo la reacción pasando el matraz a un baño de hielo durante 5 min. a 5°C +/- 2°C. Se filtró en papel Wattman No. 2,

midiendo durante diferentes tiempos el volumen de jugo filtrado. Para cada ensayo fue necesario correr en paralelo un control sin enzima.

3.8.0 Determinación de la proteína extracelular .

Se hizo la determinación en el sobrenadante después de ser dializado en membranas de celulosa con un corte de 12,000 daltons contra agua a 4°C durante 48 h y con agitación. Se determinó la proteína por el método modificado de Lowry²⁴, tomando alícuotas de 0.2 ml. y llevando a un volumen de 1 ml. con agua destilada.

3.9.0 Determinación de la proteína intracelular .

El precipitado celular de 10 ml de medio de cultivo fue resuspendido en 2 ml. de ácido tricloroacético (TCA) al 10%; se dejó reposar 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron homogeneizadas durante 15 min. y centrifugadas a 3,500 rpm durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado celular centrifugándolo 3 veces con 10 ml de agua destilada. El precipitado obtenido se resuspendió en NaOH 1N y agua destilada en una proporción 0.8-1.2ml., respectivamente. Se tomaron volúmenes de 0.2 y 0.5 ml. para determinar la concentración de proteína por el método modificado de Lowry²⁴. Antes de leer la D.O., las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm. durante 15 min..

3.10.0 Determinación de la concentración directa de grupos reductores en el medio de cultivo libre de células .

Se determinó la concentración de grupos reductores por el método del DNS_{so}. El sistema de reacción contenía 0.5 ml del sobrenadante, 0.5 ml de agua y 3 ml de la sol. de DNS. El blanco se preparó con un ml de agua, siguiendo los mismos pasos descritos en 3.7.1.

3.11.0 Determinación del pH óptico de la actividad pectinolítica .

Se utilizaron buffers de acetatos a valores de pH de 3,4,5 y 6 a una concentración 0.17 M y 0.2 N para determinar la actividad pectinolítica por grupos reductores y por viscosimetría, respectivamente. Los valores de pH al inicio y al final de la reacción fueron los mismos.

3.12.0 Diálisis de los sobrenadantes en columna Sephadex G-15 .

Los sobrenadantes de cada uno de los tiempos de fermentación obtenidos en pectina fueron pasados a través de una columna de Sephadex G-15 de 1.5 cm x 25 cm. La proteína fue eluida con agua destilada y se colectaron fracciones de 2 ml. cada una. Las fracciones que tuvieron una densidad óptica de 260 nm fueron mezcladas para determinar la actividad pectinolítica y la proteína. La columna fue calibrada previamente con una solución de

dextrano azul y rojo de metilo al 0.5% en una proporción
volumétrica 1:1.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.0 METODO DE PRESELECCION DE MUTANTES HIPERPRODUCTORAS DE PECTINASAS EXTRACELULARES.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de este trabajo está centrado en la obtención de cepas mutantes que sean hiperproductoras de pectinasas extracelulares de importancia práctica. Para lograr este fin es importante contar en primer lugar con un método apropiado que permita preseleccionar a las cepas mutantes de una manera rápida y precisa.

En general se han empleado métodos cualitativos para la preselección de microorganismos que producen enzimas extracelulares del tipo amilasas, celulasas y proteasas, por la observación de halos de hidrólisis de los sustratos por difusión de las enzimas en un medio sólido de cultivo. Sin embargo es difícil detectar halos de hidrólisis en pectina, producidos por la acción de las pectinasas, probablemente debido a que los medios con pectina no presentan la turbidez del almidón y la celulosa. Este inconveniente hace necesario emplear algún tipo de sustancia que funcione como revelador,

permitiendo observar los halos de hidrólisis. Por este motivo el primer paso fue la selección, entre varios compuestos químicos, de alguno que pudiera teñir fácil y reproduciblemente el sustrato o los productos de hidrólisis.

Los compuestos probados incluyeron aquellos que pudieran reaccionar con los grupos reductores de los productos de hidrólisis (DNS, carbazol), o bien pudieran detectar cambios de pH producidos por la liberación de ácido galacturónico por la hidrólisis de la pectina (rojo de metilo y fenolftaleína) y también el yodo que pudiera teñir el polisacárido pectina al igual que el almidón.

Como puede verse en la TABLA II, el compuesto químico con el que se revelaron claramente los halos de hidrólisis fue el yodo. Este compuesto al incorporarse al polisacárido pectina, tiñe el medio de cultivo sin reaccionar con la pectina que fué hidrolizada por la acción de las pectinasas, lo cual permite detectar los halos.

TABLE II OBSERVACION DE HALOS DE HIDROLISIS DE PECTINA MEDIANTE EL EMPLEO DE DIFERENTES COMPUESTOS QUIMICOS.

COMPUESTO	CONCENTRACION EN SOL. ALCOHOLICA	APARICION DE HALO
Carbazol *	1.0 %	-
DNS *	0.75 %	-
Fenolftaleina	1.0 %	-
Rojo de metilo	1.0 %	-
Yodo	1.0 %	+

Aspergillus sp. fue crecido 72 h en placas con medio de crecimiento "C" y transferido al medio de detección de halos "D".

* Disueltos en agua.

Una vez seleccionado el yodo para la detección de halos, se determinó la concentración óptima de la pectina y el tiempo para observar mejor la hidrólisis. En la **TABLE III** se muestra el tamaño de los halos de hidrólisis en función del tiempo de incubación y la concentración de pectina. Una concentración de pectina de 0.25 % y un tiempo de incubación de 48 horas fueron condiciones seleccionadas para preseleccionar las mutantes.

TABLA III . TAMARO RELATIVO DE LOS HALOS DE HIDROLISIS (*) EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE PECTINA Y EL TIEMPO DE INCUBACION EN EL MEDIO DE DETECCION DE HALOS.

TIEMPO DE INCUBACION (hr)	CONCENTRACION DE PECTINA (g/100 ml)					
	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	3.0
24	1.8	1.5	0.5	0.9	0.7	0.5
48	2.3	1.8	1.6	1.3	1.0	0.8
72	3.0	2.2	2.0	1.6	1.2	1.0

(*) diámetro de los halos (cm)

Aspergillus sp fué inoculado en el medio de crecimiento "C" e incubado a 37°C por 72 h; posteriormente fué transferido al medio de detección de halos "D", al cual se adicionó yodo como revelador.

Cabe señalar que aún cuando el tamaño del halo de hidrólisis fué mayor con 0.1 % de pectina y apareció desde las primeras 24 horas, no fué seleccionado debido a que éstos eran muy difusos.

Por otro lado, inicialmente se observó la formación de halos irregulares en todas las concentraciones, debido al crecimiento del microorganismo en el medio de formación de halos "D". Para evitar que en este medio el hongo creciera y no únicamente difundieran las enzimas, se probaron dos inhibidores del crecimiento: rosa de bengala y cicloheximida, los cuales fueron adicionados al medio de formación de halo "D". Como se observa en la TABLE IV, el crecimiento de *Aspergillus* sp solamente fué inhibido totalmente al emplear 250 µg. de cicloheximida por ml. de medio de cultivo.

TABLA IV . CRECIMIENTO DE *Aspergillus* sp EN EL MEDIO DE FORMACION DE HALO EN PRESENCIA DE CICLOHEXIMIDA Y ROSA DE BENGALA.

CONCENTRACION ($\mu\text{g.}/\text{ml}$ de medio)	CRECIMIENTO EN 'ROSA DE BENGALA	CRECIMIENTO EN CICLOHEXIMIDA
50	+	+
100	+	+
150	+	+
200	+	+
250	+	-

Aspergillus sp fué inoculado en el medio de crecimiento "C" y transferido al medio de formación de halo "D". Se incubaron las placas a 37°C durante 48 horas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las condiciones seleccionadas para la detección del halo de hidrólisis fueron: 0.25% de pectina y 250 $\mu\text{g.} \times \text{ml}$ de cicloheximida, incubando 48 horas a 37 °C y utilizando yodo como revelador. Empleando estas condiciones se detectan claramente halos bien definidos y reproducibles como puede verse un duplicado en la FIGURA 1.

El esquema de la metodología para preseleccionar cepas mutantes que produzcan mayor halo de hidrólisis, se puede ver en la FIGURA 2.

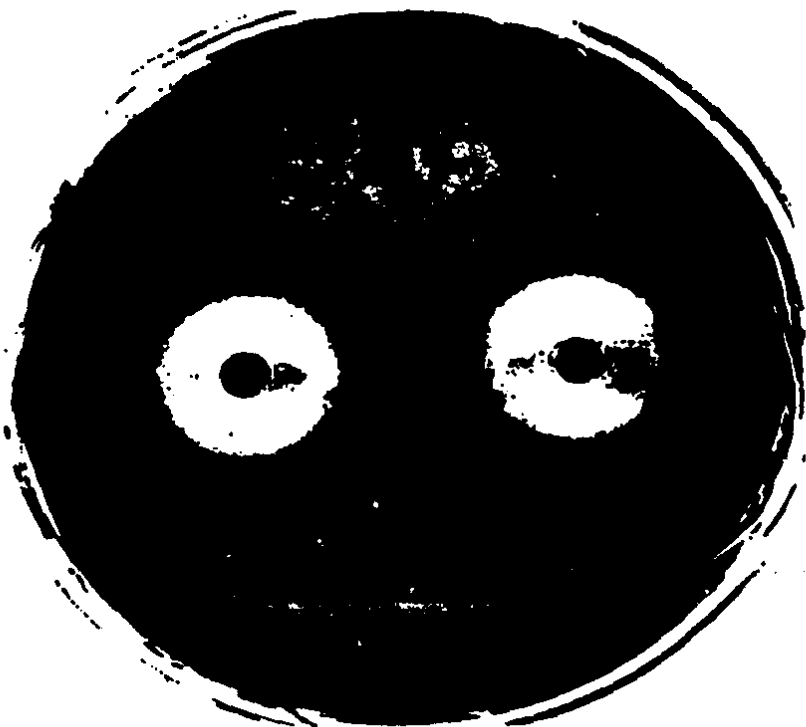


FIGURA 1. Halos de hidrólisis producidos por duplicado por *Aspergillus* sp, en un medio sólido con pectina al 0.25% y 250 mg/ml de medio de cicloheximida, incubando a 37°C durante 48 horas y usando sol. de yodo al 1% como revelador.

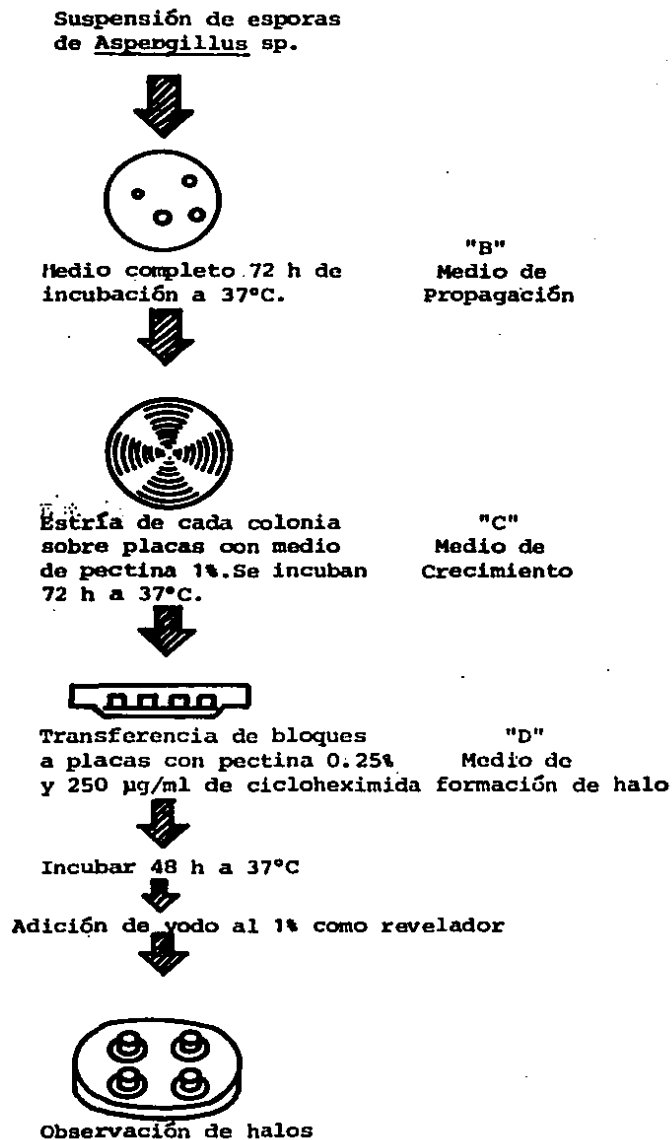


FIGURA 2.- Representación esquemática del método empleado para la observación de halos de hidrólisis producidos por Aspergillus sp. en pectina.

4.2.0 EVALUACION DE LA PRODUCCION DE LA ACTIVIDAD PECTI- MOLITICA EXTRACELULAR DE LA CEPA SILVESTRE.

Antes de proceder a mutagenizar la cepa de *Aspergillus* sp, fué necesario evaluar la producción de pectinasas de la cepa silvestre empleando varios desechos agroindustriales para seleccionar aquel en donde se produjera mayor actividad y que por otro lado sirviera como patrón de referencia con respecto a las cepas mutantes, debido a que se busca producir pectinasas usando desechos agroindustriales como fuente de carbono.

Se emplearon como sustratos de fermentación los siguiente desechos agroindustriales, que contienen diferentes cantidades de pectina: cáscara de limón, cáscara de piña y pulpa de henequén. Los resultados se presentan en la TABLE V, en donde se puede observar que en relación a la pectina y en cáscara de piña se incrementa al doble la actividad medida por viscosimetría. Sin embargo, la mayor producción de esta actividad se obtuvo en cáscara de limón, en donde se produjo 400% de incremento de la actividad.

Si bién la actividad medida por azúcares reductores no tuvo mayores diferencias en los tres desechos, se seleccionó la cáscara de limón debido al incremento

que se observa en la producción de la actividad medida por viscosimetría, porque es la de mayor importancia. Es interesante hacer notar el incremento en la producción de la actividad por *Aspergillus* sp a partir de los desechos probados en relación a la pectina, que es el sustrato purificado, ya que estos resultados difieren a los encontrados con *Penicillium* sp, en donde se observó una mayor producción de pectinasas cuando fué crecido en pectina en comparación con la pulpa de remolacha o la mezcla de ambas 17.

El hecho de que *Aspergillus* sp produzca más actividad sobre los desechos, probablemente se deba a que fué aislado a partir de muestras de henequén, por lo cual es una cepa adaptada a utilizar para crecer un desecho como fuente de carbono.

**TABLA V . PRODUCCION DE PECTINASAS POR *Aspergillus* sp. A
PARTIR DE DIFERENTES SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES**

DESECHO	CONC. PECTINA %	ACTIVIDAD % VISCOSIM.	INC.(*) %	ACTIVIDAD GRUP.RED.	INC.(*) %
Pulpa de henequén	3	0.21 ± 0.003(**)	230	5.56 ± 0.004(**)	224
Cáscara de piña	3	0.66 ± 0.001(**)	200	2.99 ± 0.001(**)	120
Cáscara de limón	3	0.87 ± 0.003(**)	400	4.2 ± 0.001(**)	210

* El incremento se calculó en base a la actividad producida por *Aspergillus* sp. en pectina al 1% (0.1 U de actividad por viscosimetría y 2.4 mg/ml de actividad por reductores).

** Diferencias entre los dos valores medidos por cada muestra.

Se utilizaron 200 ml de medio "F", agitados a 200 rpm y a 37°C. El contenido de pectina en los desechos fué de 7% en la pulpa de henequén, 22% en la cáscara de piña y 29% en la cáscara de limón. La actividad fué medida en los filtrados de las 120 horas de fermentación.

En *Aspergillus* sp. el mejor sustrato para la producción de pectinasas extracelulares es la cáscara de limón y aparentemente la actividad producida en los tres desechos no se correlaciona con la cantidad de pectina que contienen.

El incremento en la producción de actividad en cáscara de limón puede ser explicado considerando que la estructura de la pectina contenida en este desecho es diferente a la de pectina purificada, debido a que probablemente son diferentes cultivos y además los métodos químicos que se emplean para extraerla pueden modificar el grado de metoxilación y/o el tamaño de la cadena. Con el fin de obtener mayor información sobre el efecto de la estructura química de la pectina en la producción de pectinasas, se probaron varias pectinas con diferente grado de viscosidad y metoxilación, las cuales fueron obtenidas a partir de una misma fuente (cáscara de limón de Tecmán, Colima) y que fueron producidas por una misma compañía en México (Grinsted).

Las características de las pectinas se presentan en la TABLE VI La pectina tipo A fué la excepción, ya que además de ser producida por otra compañía (Sigma), desconocemos la fuente cítrica de la que proviene, además, es de grado analítico, mientras que las otras son grado industrial.

TABLA VI CARACTERISTICAS DE PECTINAS CITRICAS

PECTINA	GRADO DE ESTERIF.	GRADO DE METOXI.	TIEMPO DE EFLUJO EN EL VISCOSIM. (seg)
Tipo A	64	9.79	124.0
Tipo B	71-75	13.06	106.6
Tipo C	63-67	11.42	79.8
Tipo D	?	?	46.8
Tipo E	58-62	8.16	60.2

A: Grado analítico; B, C, D y E: Grado industrial

Los resultados obtenidos se muestran en la FIGURA 3; se observa que la actividad tipo endo, medida por viscosimetría (ver antecedentes), es diferente en las pectinas usadas como sustrato y también se observa un mayor incremento en la producción de esta actividad conforme se utilizan pectinas más metoxiladas. El patrón de producción de dicha actividad pudiera estar relacionado con las diferencias en la estructura química de las pectinas, causadas probablemente por los métodos de extracción empleados durante la extracción de las mismas en la cáscara de limón.

En el caso de la actividad tipo exo, medida por reductores (ver antecedentes), no se observaron diferencias mayores

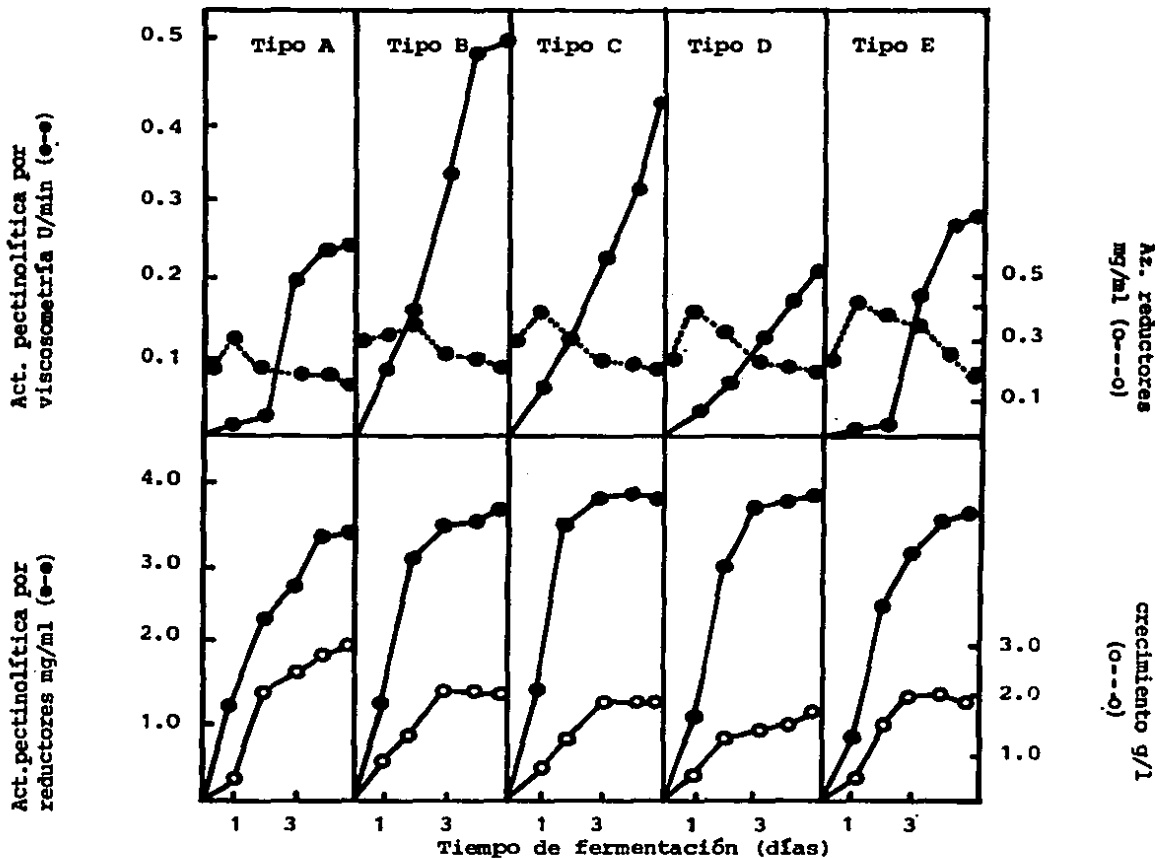


FIGURA 3. Producción de pectinasas por *Aspergillus* sp. usando como sustrato pectinas con diferente grado de viscosidad y metoxilación. La concentración de pectina fué 1% y la temperatura de incubación 37°C. Las pectinas fueron previamente dializadas durante 72h. La actividad fué medida en pectina sigma. (Ver TABLA VI para la clasificación de los sustratos).

en la producción al emplear las mismas pectinas, es decir respondió de manera diferente, lo cual pudiera deberse a que la actividad tipo exo contiene componentes enzimáticos con diferente control regulatorio.

Esta respuesta diferencial ha sido observada en Aspergillus sp. en un sistema más controlado, como es el cultivo alimentado, a través de la limitación de las fuentes de carbono, donde la actividad exo fué incrementada en 455% y la endo sólo un 32%_{oo}.

El incremento que observamos en la actividad endo probablemente se deba a que las pectinasas más metoxiladas formen mayores inductores de esta actividad que de la de tipo exo.

Por todo lo anteriormente expuesto, se puede concluir que la mayor actividad sobre la viscosidad que produce Aspergillus sp. en cáscara de limón se debió más a la naturaleza química de la pectina que a su mayor concentración en el desecho.

4.3.0 OBTENCION DE MUTANTES HIPERPRODUCTORAS DE *Aspergillus* sp. Y EVALUACION DE LA PRODUCCION DE ACTIVIDAD PECTINOLITICA.

La mutagénesis de *Aspergillus* sp. fué realizada empleando N-metil-N₁-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) como agente mutagénico, dado que este compuesto es uno de los más utilizados en la mutagénesis de hongos. La FIGURA 4 muestra la curva de sobrevivencia de *Aspergillus* sp. a la acción mutagénica de NTG y se observó que el tiempo óptimo de la mutagénesis es a los 60 min. al emplear una concentración de 50 µg/ml en buffer fosfatos.

En el medio de propagación fueron aisladas 500 colonias mutagenizadas y probadas utilizando el método de preselección descrito anteriormente. Se preseleccionaron 8 cepas que mostraron mayor halo de hidrólisis que la cepa silvestre, las cuales fueron denominadas MH81, MH28, MH66, MH33, MH29, MH109, MH56. Estas cepas fueron evaluadas posteriormente en su producción de pectinasas extracelulares en cultivo sumergido, empleando cáscara de limón y pectina como fuentes de carbono para seleccionar a las cepas que produjeran mayor actividad de tipo endo. Los resultados se muestran en las FIGURAS 5 y 6; se observa que las mutantes crecidas en pectina produjeron 300% más de la actividad medida por viscosimetría y hasta 200% más de la actividad determinada por grupos reductores;

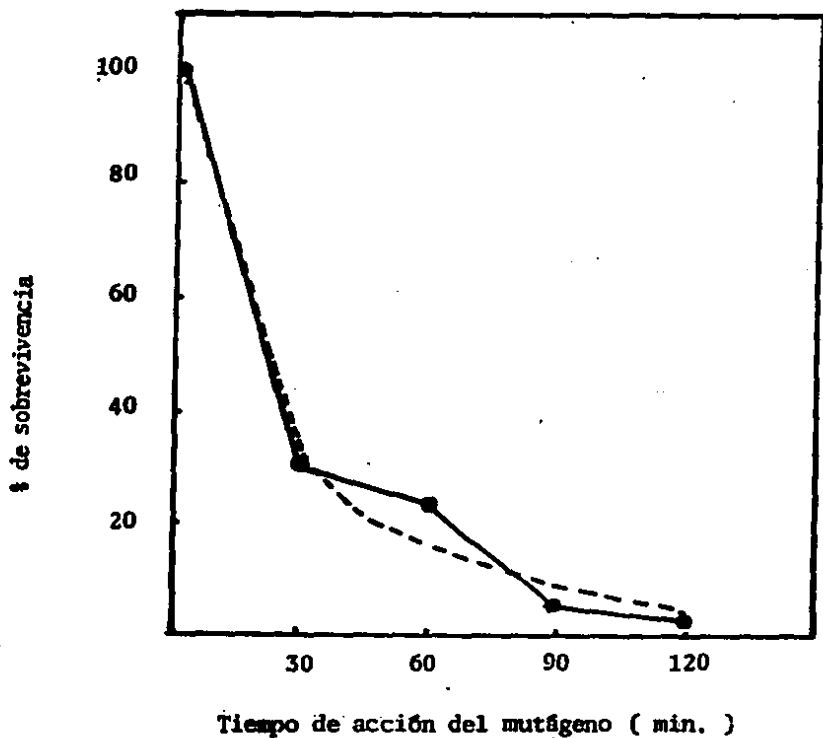


FIGURA 4.- Curva de sobrevivencia de Aspergillus sp(●—●). Se utilizó NTG como agente mutagénico a una concentración de 50 µg/ml en buffer de fosfatos a pH 7. La curva discontinua se obtuvo por ajuste polinomial de de los datos experimentales, utilizando una ecuación de de segundo orden. (coeficiente de correlación 0.9143).

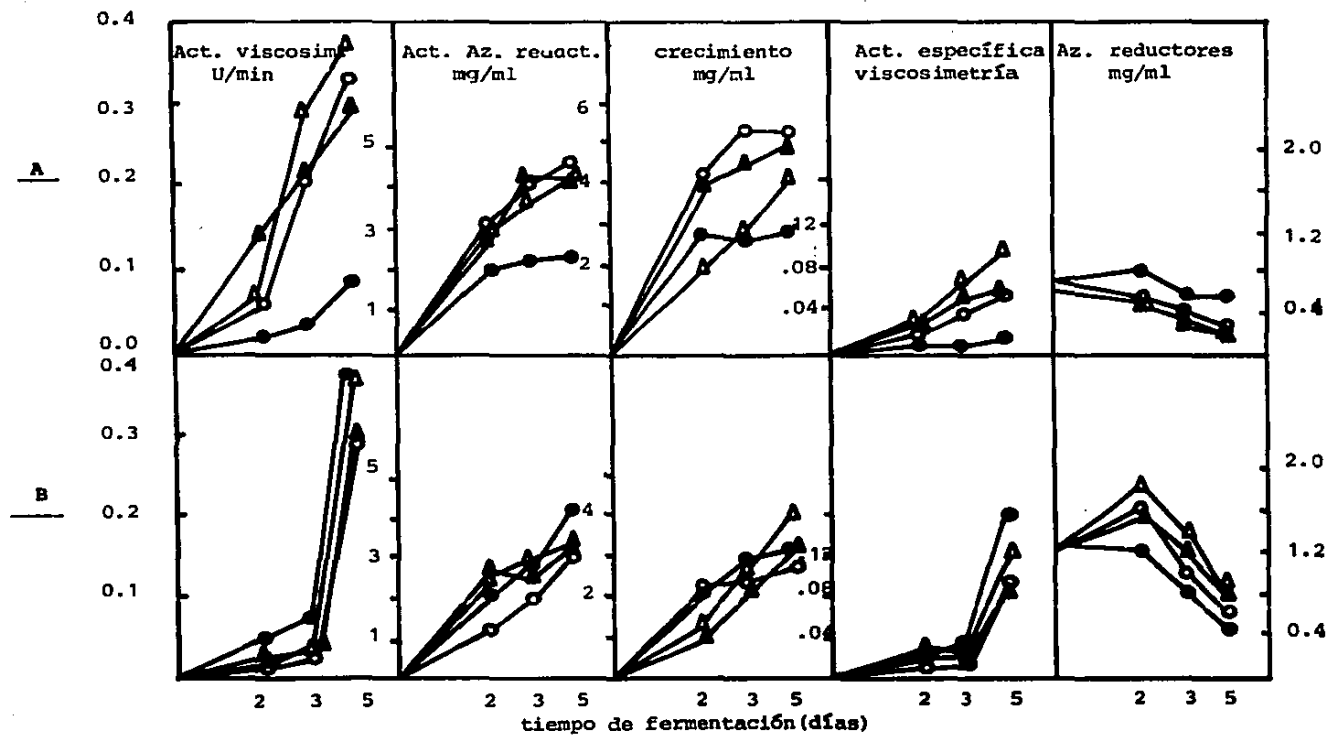


FIGURA 5.- Evaluación de la actividad pectinolítica de mutantes de *Aspergillus* sputilizando como sustrato pectina cítrica grado analítico al 1% (A) y cáscara de limón 3% (B), en matraz agitado a 200 rpm, 37°C y pH inicial de 4.5. Los puntos son promedio del experimento que fué realizado por duplicado. Cepa silvestre (e); mutantes MH109 (o); MH55 (▲) y MH56 (△).

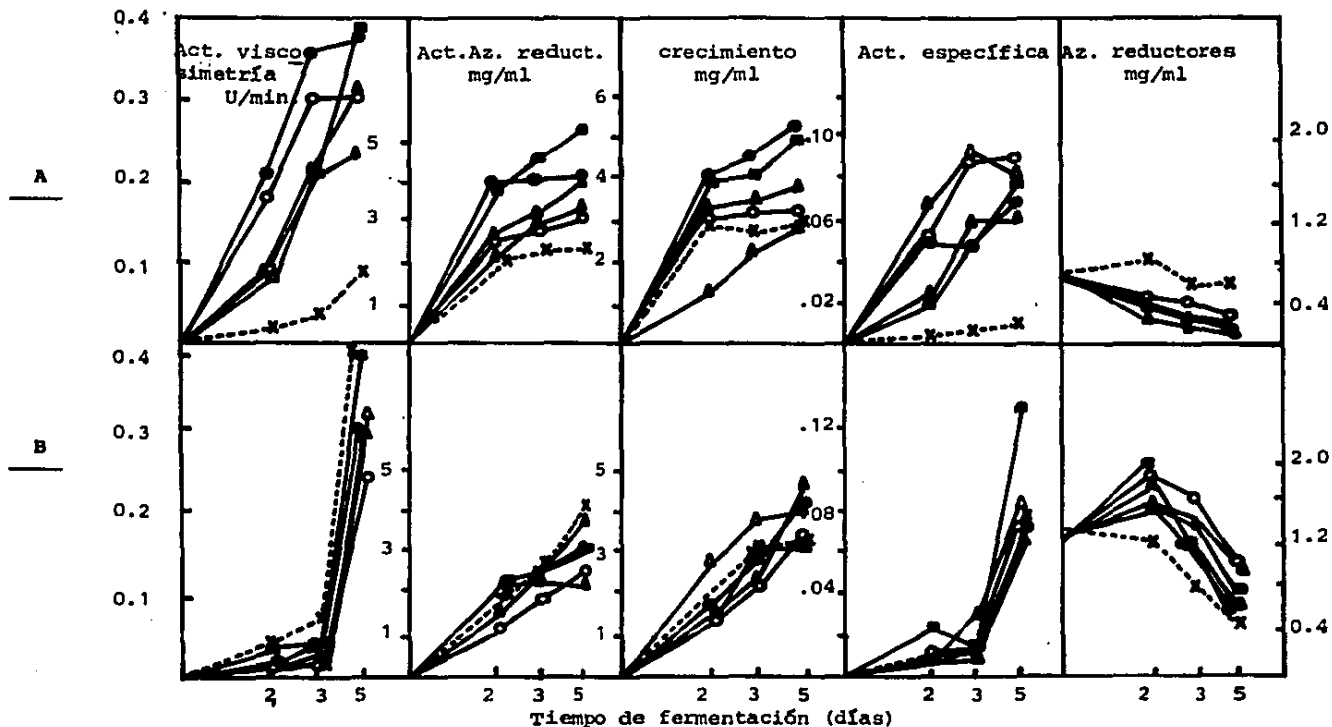


FIGURA 6.- Evaluación de mutantes de *Aspergillus* sp., utilizando como sustrato pectina cítrica grado analítico al 1% (A) y cáscara de limón 3% (B), en matraz agitado a 200 rpm 37°C y pH inicial de 4.5. Los puntos son el promedio del experimento realizado por duplicado. Cepa silvestre (*); mutantes MH81 (o); MH28 (Δ); MH16 (◐); MH33 (▲) y MH29 (◑).

esto no sucedió al usar la cáscara de limón como fuente de carbono, en donde únicamente la cepa MH29 alcanza los niveles de producción de la cepa silvestre en ambas actividades. El incremento en la producción de actividad por las mutantes crecidas en pectina no es debida a un mayor crecimiento, ya que al ser relacionado éste con la actividad, se observa una actividad específica hasta 10 veces mayor que la de la cepa silvestre. Por otro lado, se observa que cuando las mutantes crecen en pectina, hay una menor acumulación de grupos reductores en el medio de cultivo durante las primeras horas de fermentación en comparación con la cepa silvestre, y que al ser crecidos en cáscara de limón, no sólo se acumulan una mayor concentración de grupos reductores que la silvestre, sino que la concentración alcanza valores entre 1.6 y 2.0 mg/ml en relación a 0.2-0.4 mg/ml que acumulan las mutantes en el medio con pectina. Este incremento pudiera ser atribuido a mayor actividad pectinolítica inicial que que no se detecta en el filtrado libre de células. De acuerdo a nuestros resultados, es posible suponer que el incremento en la acumulación de grupos reductores por degradación del sustrato está causando represión en la producción de las pectinasas en las mutantes, por lo cual no se expresan como hiperproductoras cuando son crecidas en cáscara de limón; aunque también cabe la posibilidad de que las mutantes hayan perdido alguna de las pectinasas que sean más inducibles con la cáscara de limón.

La capacidad de las cepas mutantes para hiperproducir actividad pectinolítica de tipo endo, se expresa cuando crecen en pectina como única fuente de carbono, pero no cuando se utiliza la cáscara de limón, aparentemente por una represión catabólica causada por una mayor acumulación de grupos reductores. El siguiente paso fue evaluar la producción de pectinasas por *Aspergillus* sp., utilizando varias concentraciones del sustrato pectina, con el fin de llegar a una concentración aumentada de reductores y observar si se repetía el efecto de represión que se presentó con la cáscara de limón. Las concentraciones de pectina utilizadas, fueron 0.87, 1, 2 y 3%. Los resultados en la FIGURA 2 muestran que conforme aumenta la concentración de pectina, es mayor la acumulación de grupos reductores en el medio de fermentación, lo cual se correlaciona con una menor actividad pectinolítica p tanto en el tiempo cero, como en la acumulación de los mismos en el tiempo, lo cual se correlaciona con una menor actividad pectinolítica medida por reductores y por viscosimetría, es decir, a mayor acumulación, menor actividad. Estos datos indican que la represión catabólica es producida por los grupos reductores producidos en la degradación de la pectina. Con el fin de reducir la concentración de los reductores presentes en el sustrato al tiempo cero se realizó una corrida de fermentación en donde se emplearon las mismas

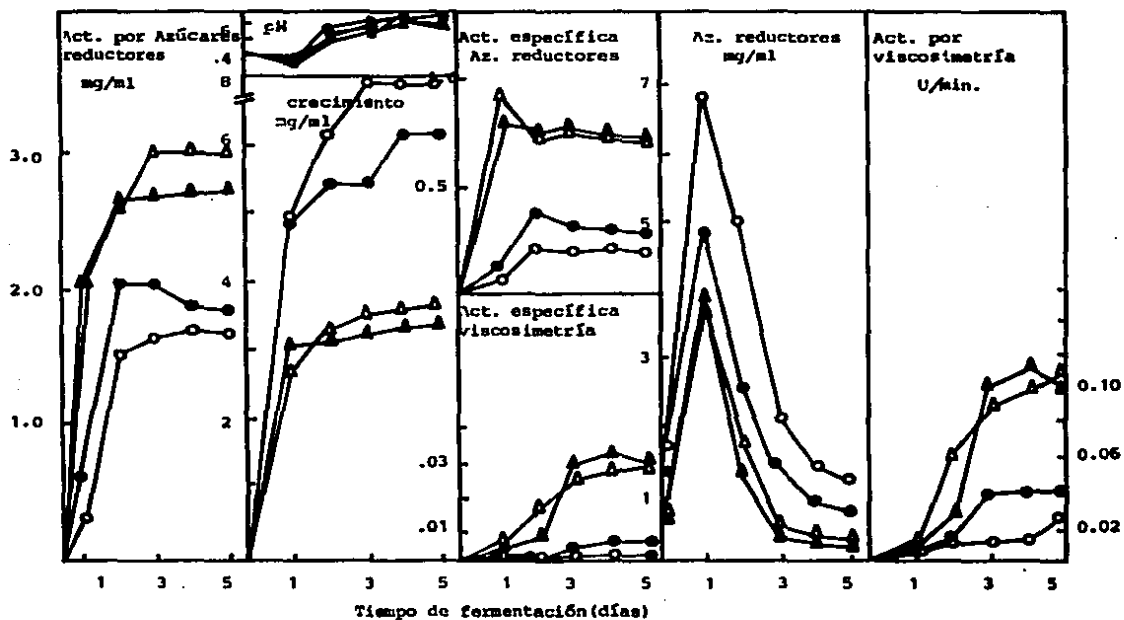


FIGURA 7.- Producción de actividad pectinolítica extracelular de *Aspergillus* sp, utilizando pectina cítrica como fuente de carbono: 0.87% (Δ); 1% (\square); 2% (\circ) y 3% (\diamond) en matraz agitado a 200 rpm, 37°C y pH inicial de 4.5. Estos resultados son el promedio del experimento que fué realizado por duplicado.

concentraciones de pectina que en el experimento anterior, pero que fueron dializadas en agua destilada. En la **FIGURA 8** se observó que al disminuir la concentración de grupos reductores al inicio de la fermentación, la acumulación de los mismos durante las primeras horas de fermentación se redujo más de un 50% y asimismo se incrementó al doble la actividad pectinolítica medida por viscosimetría con respecto a la producida con pectina no dializada, sin embargo sigue observándose la represión catabólica a mayor acumulación de grupos reductores.

Con respecto a la actividad medida por reductores, fue similar al final de la fermentación en las diferentes concentraciones empleadas, sin embargo se observó un retraso en la aparición de la actividad el cual se correlaciona con una mayor acumulación de grupos reductores.

Estos resultados apoyaron mas hacia la represión catabólica, sin embargo, cabía la posibilidad de que los grupos reductores estuvieran mas bien inhibiendo la actividad pectinolítica de Aspergillus sp. Con el fin de descartar o comprobar la inhibición de las pectinasas, se midió la actividad pectinolítica de los filtrados producidos al emplear concentraciones de 1 y 3 % de pectina antes y despues de ser dializados en una columna Sephadex G-15. Los resultados en la **FIGURA 9** muestran que aún cuando la concentración de grupos reductores disminuyó

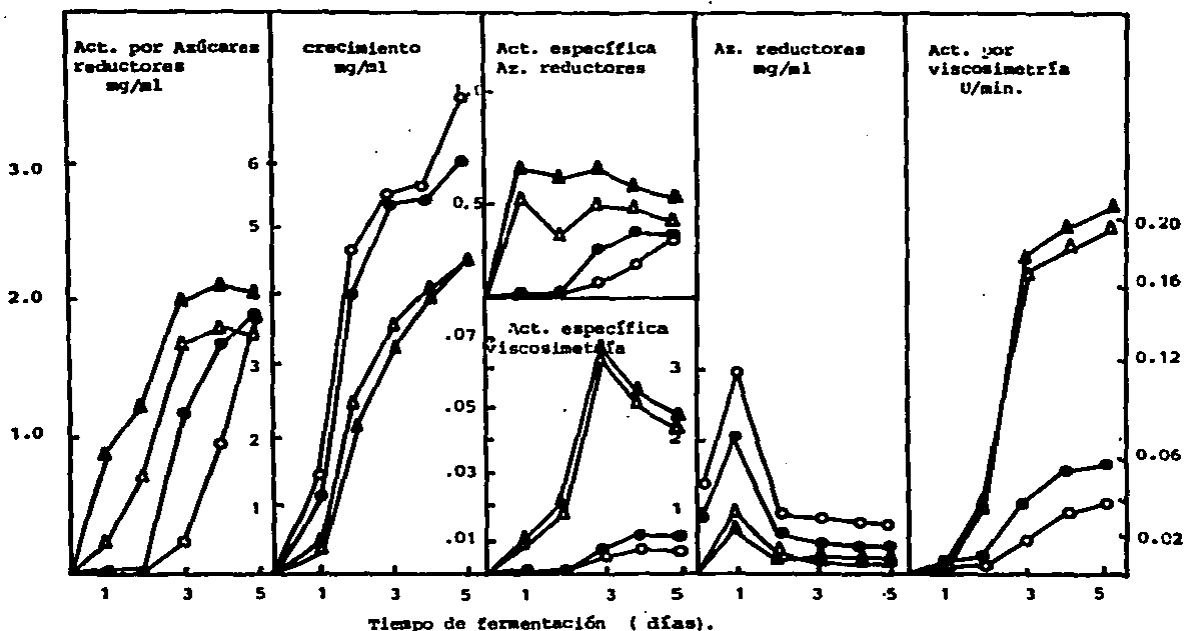


FIGURA 8.- Producción de actividad pectinolítica extracelular de *Aspergillus* sp, utilizando como fuente de carbono pectina cítrica dializada previamente en agua destilada durante 72 h; 0.87% (Δ); 1% (▲); 2% (●) y 3% (○) en matraz agitado a 200 rpm, 37°C y pH inicial de 4.5. Estos resultados son promedio del experimento realizado por duplicado.

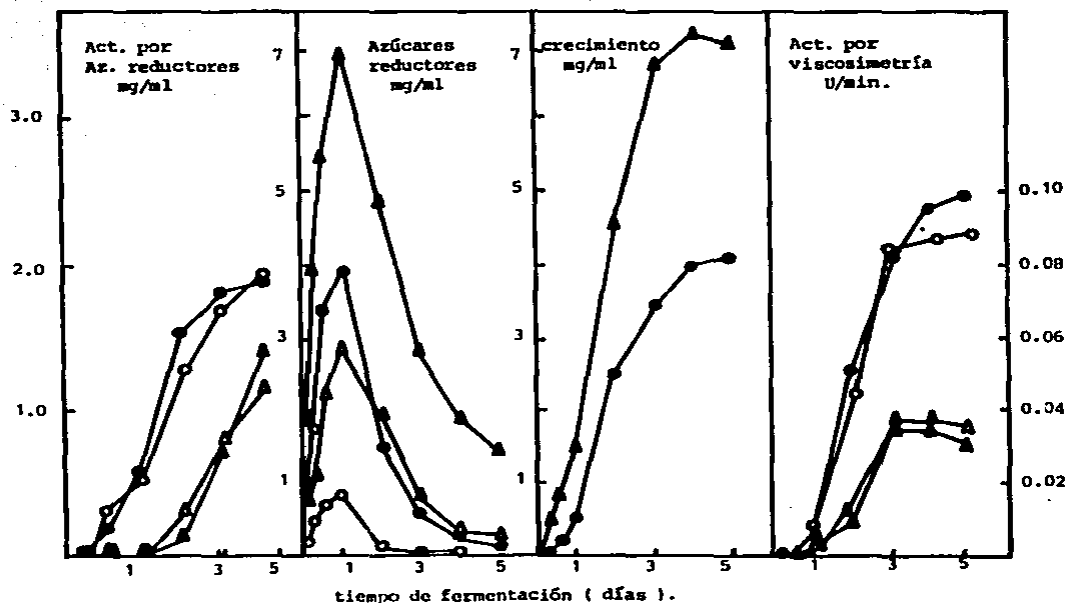


FIGURA 9.- Actividad pectinolítica de los filtrados de *Aspergillus* sp. dializados y no dializados, producidos en pectina cítrica al 1 y 3 % en matraz agitado a 200 rpm, 37°C y pH inicial de 4.5. La diálisis de los filtrados se realizó en una columna Sephadex G-15. Filtrado producido en pectina 1% no dializado (●) y filtrado dializado (○); filtrado producido en pectina 3% no dializado (▲) y filtrado dializado (△).

en un 65% después de la diálisis la actividad medida en ambos fue muy similar y observamos de nuevo una menor producción al emplear una concentración de 3% del sustrato. Con estos resultados podemos concluir que los grupos reductores, o productos dializables de la degradación de la pectina no causan inhibición de la actividad pectinolítica de Aspergillus sp.

Como la intención que tenemos es la utilización de la cáscara de limón como fuente de carbono para producir pectinasas, fué importante saber si en este sustrato también se presentaba la represión de la actividad pectinolítica por grupos reductores acumulados y, asimismo, establecer la concentración óptima de la cáscara de limón. En la FIGURA 10 se observa que en cáscara de limón al 1% la máxima actividad se produce desde las 72 horas; asimismo, se puede ver que conforme aumenta la concentración del sustrato (2% y 3%) hay un mayor retraso en la aparición de esta actividad, lo cual se correlaciona con la mayor acumulación de los grupos reductores, de tal manera que estos resultados son similares a los datos encontrados en pectina.

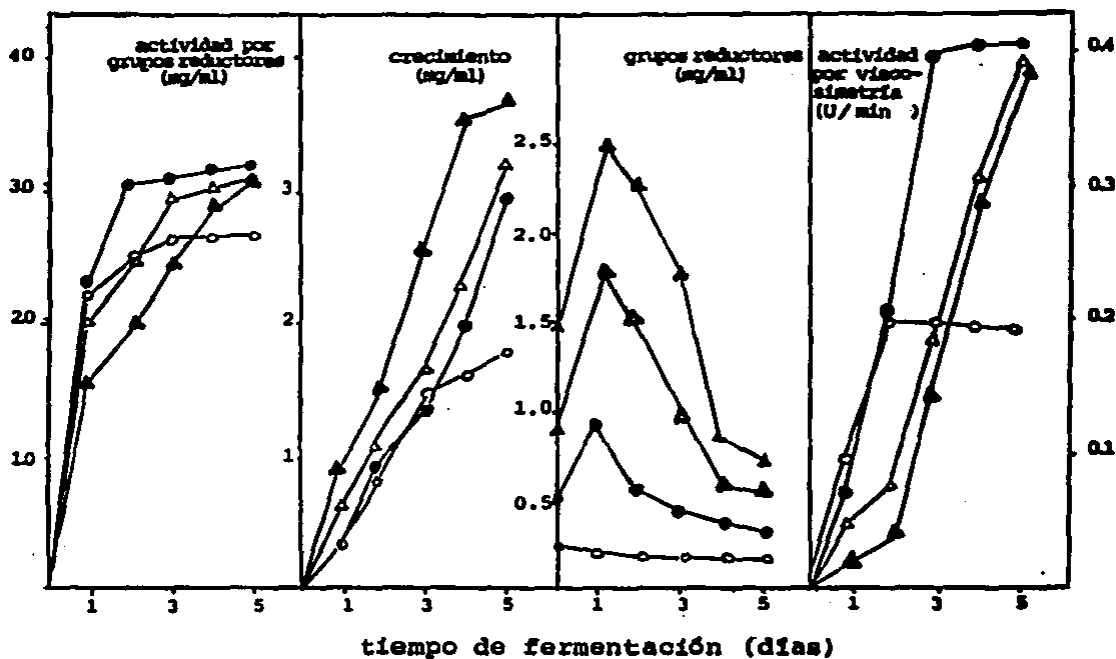


FIGURA 10.- Producción de pectinasas extracelulares de *Aspergillus* sp., utilizando cáscara de limón como fuente de carbono: 0.5% (O); 1% (e); 2% (Δ) y 3% (▲) en matraz agitado a 200 rpm, 37°C y pH inicial de 4.5. Estos resultados son promedio del experimento realizado por duplicado.

4.4.0 OBTENCION DE MUTANTES DE *Aspergillus* sp. INSENSIBLES A REPRESION CATABOLICA.

Para seleccionar mutantes insensibles a represión catabólica es común el uso de análogos para inhibir el crecimiento en presencia del inductor, como se ha visto en *E. coli*, *S. tiformurium* y *B. subtilis* 40, que son cepas sensibles a inhibición del crecimiento cuando se emplean bajas concentraciones de análogos. Hemos observado que *Aspergillus* sp. no es sensible a 2-deoxi-D-glucosa, 1,0-metil- β -D-glucósido y 1-0-metil- β -D-galactósido, y por lo tanto crece en los medio con pectina en placa, aún cuando se utilizaron concentraciones hasta 3 mg/ml de los tres análogos.

También se ha reportado que especies *Serratia*, *Streptomyces* y *Pseudomonas* no son sensibles a inhibición del crecimiento por la presencia de análogos 40. La cepa de *Aspergillus* sp. si es capaz de transportar el análogo y metabolizarlo para crecer, ya que en el medio líquido conteniendo los análogos como única fuente de carbono se observó que a medida que se incrementa la concentración del análogo hay un mayor crecimiento (resultados no mostrados).

Como no fue posible utilizar la técnica del análogo

para seleccionar a las mutantes, se procedió a probar la adición de otras fuentes de carbono que pudieran reprimir la síntesis de pectinasas de la cepa silvestre en presencia de pectina. Se probaron tres fuentes de carbono adicionales: ácido galacturónico, glucosa y glicerol a una concentración de 1%.

Como puede verse en la FIGURA 11, la única fuente de carbono capaz de reprimir la síntesis de actividad pectinolítica de Aspergillus sp. fue el glicerol, ya que a pesar de tener buen crecimiento en las placas que contenían pectina más glicerol, no hubo formación de halos en el método de detección de halos. El efecto represor del glicerol también ha sido observado en cepas como L. reesei, en donde reprimió la síntesis de celulasas α y en Aeromonas liquefaciens reprimió la síntesis de poligalacturonato liasas₁₁. Por otro lado, nosotros encontramos que con la adición de glucosa o ácido galacturónico, únicamente disminuyó el tamaño del halo. De acuerdo a estos resultados, las cepas mutantes preseleccionadas fueron aquellas que produjeron halo de hidrólisis en presencia de pectina y glicerol. Con este criterio se probaron 700 colonias aisladas de la suspensión de esporas mutagenizadas durante 60 min. con NTG, de las cuales cuatro cepas formaron halo de hidrólisis; estas cepas fueron denominadas: IR637, IR663, IR694, IR6187 (FIGURA 12).

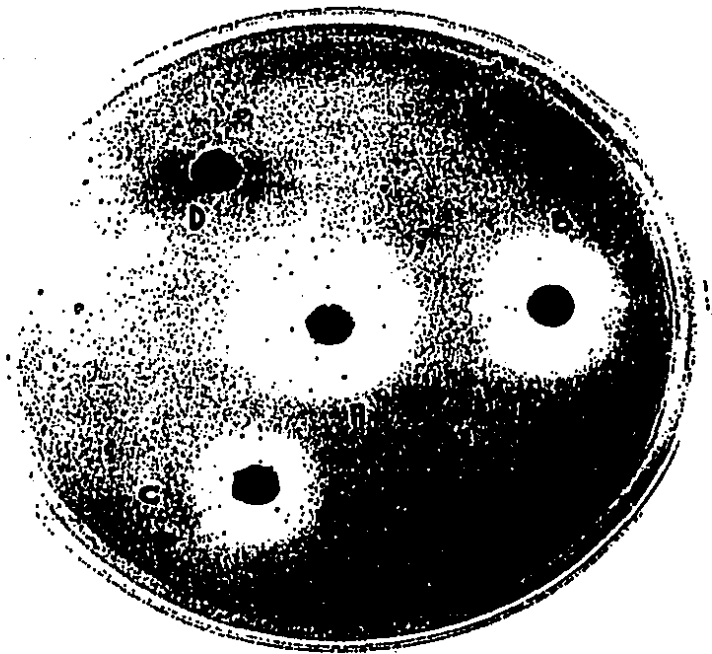


FIGURA 11.- Halos de hidrólisis producidos sobre placas con pectina, medio "D" por *Aspergillus* sp. después de 48 horas de incubación a 37°C. La cepa fue crecida previamente en placas con medio "C", en donde se observó un buen crecimiento antes de ser transferidas al medio de detección de halos: pectina 1% (A); pectina 1% + ac. galacturónico 1% (B); pectina 1% + glucosa 1% (C) y pectina 1% + glicerol 1% (D).

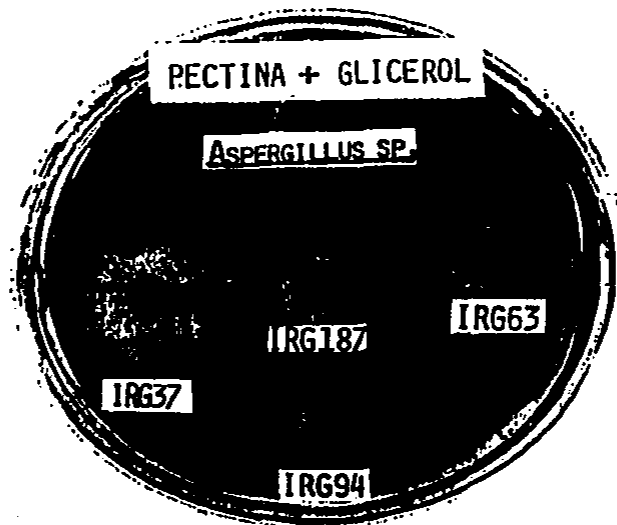


FIGURA 12.- Halos de hidrólisis producidos sobre placas de pectina, medio "D", por mutantes de *Aspergillus* sp. Las cepas fueron crecidas previamente en placas con pectina y glicerol, medio "F", en donde en todas se observó un buen crecimiento, antes de ser transferidas al medio de detección de halos.

El siguiente paso fué evaluar la producción de la actividad pectinolítica de las cepas mutantes preseleccionadas y de la cepa silvestre en medio líquido con pectina y glicerol. El experimento se llevó a cabo utilizando pectina y pectina + glicerol; las FIGURAS 13 y 14 muestran los resultados obtenidos, en donde se observa que cuando se adiciona glicerol la actividad producida por Aspergillus sp. en pectina disminuye en 80% y 70% por viscosimetría y reductores, respectivamente. Estos resultados demuestran que el glicerol es un fuerte represor de la actividad pectinolítica endo y exo de la cepa silvestre. Con respecto a las mutantes IRG37 ó IRG63, disminuyeron 20 y 25% la actividad por reductores, respectivamente, y por viscosimetría IRG63 disminuyó un 10% la actividad, y la IRG37 produjo la misma actividad que en pectina. De acuerdo a estos resultados, las mutantes IRG37 y la IRG63 fueron menos afectadas en la producción de pectinasas por el glicerol, probablemente por una resistencia a la represión catabólica.

Debido a que deseamos producir pectinasas a partir de desechos agroindustriales, el siguiente paso fué evaluar la producción de pectinasas por las mutantes, utilizando la cáscara de limón como única fuente de carbono. Los resultados se presentan en la FIGURA 15; se observó que la cepa IRG63 incrementó cuatro veces la actividad tipo endo medida por viscosimetría con respecto a la cepa

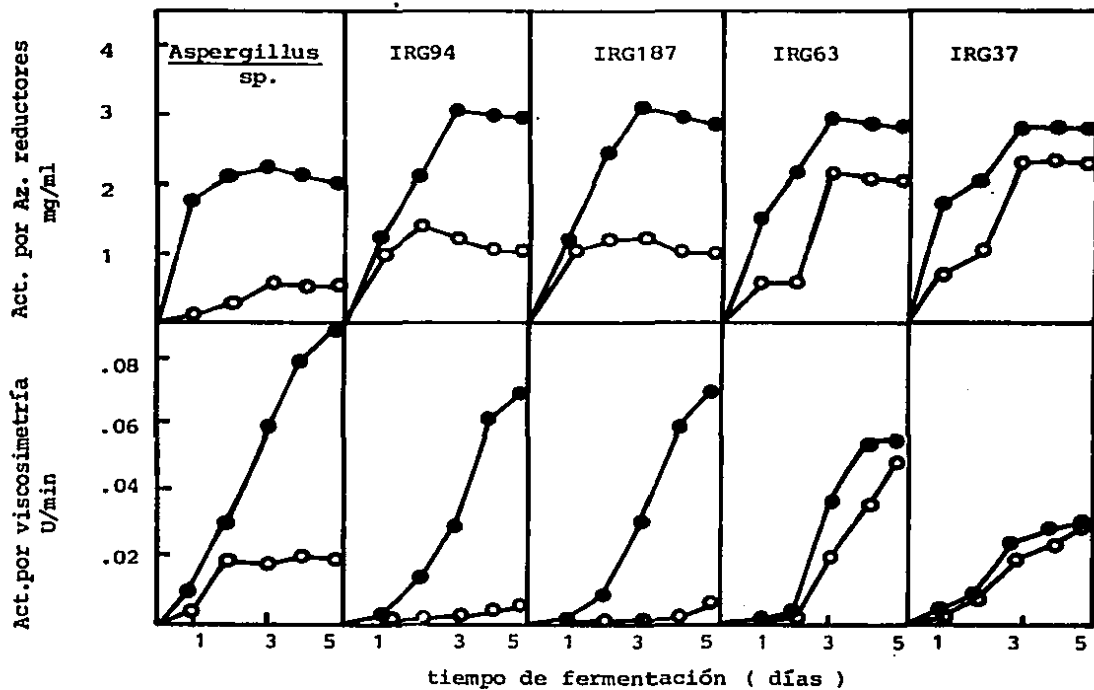


FIGURA 13.—Producción de pectinasas por mutantes de *Aspergillus* sp. a partir de pectina 1% (●) y pectina 1% + glicerol 1% (○); en matraces agitados a 200 rpm, 37°C y pH inicial de 4.5. Estos resultados son promedio del experimento realizado por duplicado.

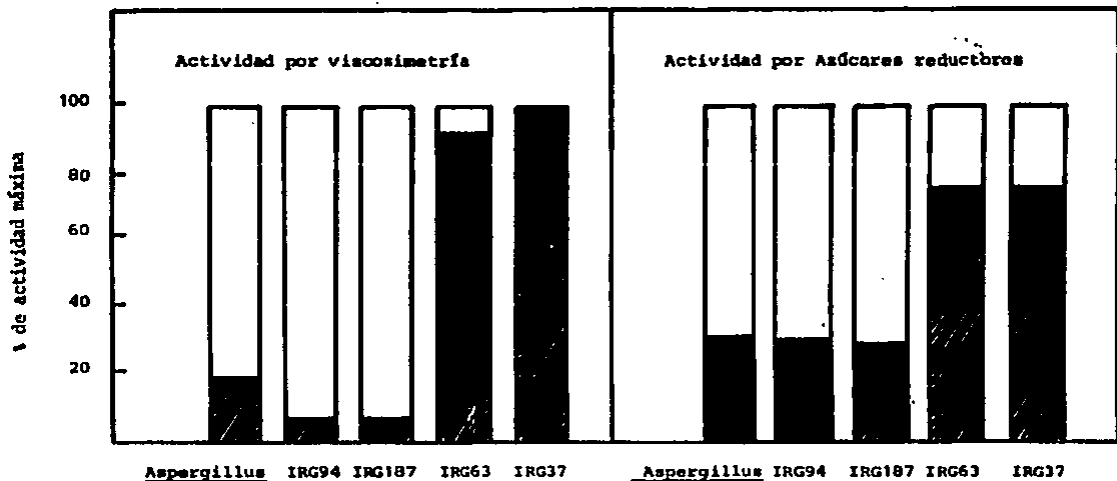


FIGURA 44 .- Actividad pectinolítica producida a las 120 h de fermentación por la cepa silvestre y sus cepas mutantes al utilizar como fuente de carbono pectina 1% \square y pectina 1% + glicerol 1% \blacksquare . El porcentaje de la actividad producida en pectina + glicerol fué determinado tomando como 100% la actividad producida en pectina.

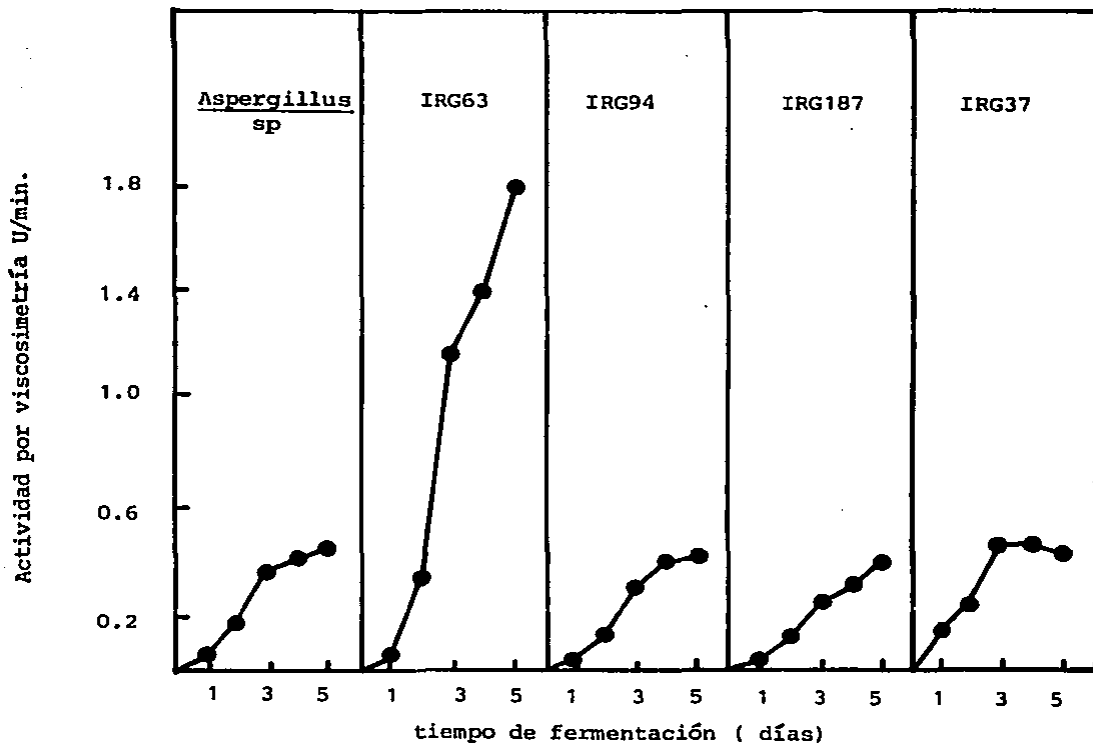


FIGURA 15 .- Producción de pectinasas por mutantes de Aspergillus sp. a partir de cáscara de limón al 1% como fuente de carbono en matraces agitados a 200 rpm, 37°C y pH inicial de 4.5. Estos resultados son promedio del experimento realizado por duplicado.

silvestre cuando se utiliza la cáscara de limón como fuente de carbono. Las mutante IRG94, IRGG197 y la IRG37 no produjeron más actividad que la cepa silvestre.

Se consideró importante probar en otros desechos que contienen pectina la producción de pectinasas por la mutante IRG63 con el fin de determinar si la mutante es hiperproductora en todos ellos. La FIGURA 14, muestra que con respecto a la actividad medida por viscosimetría, la mutante, al ser crecida en la cáscara de piña, produce la misma actividad que la cepa silvestre, y que aún cuando se incrementa la producción de pectinasas en la pulpa de remolacha, pulpa de henequén y cáscara de naranja hasta el doble, es en la cáscara de limón en donde se expresa más como hiperproductora con respecto a la cepa silvestre.

Por otro lado, la actividad medida por reductores fue muy similar en ambas cepas cuando fueron crecidas en la cáscara de naranja, pulpa de remolacha y pulpa de henequén; sólo se observa el aumento de una unidad por la mutante cuando se utiliza la cáscara de piña y la de limón. El hecho que la mutante se haya expresado como hiperproductora al ser crecida en cáscara de limón, pudiera ser debido a que adicionalmente a su resistencia en este desecho, se encuentran mejores inductores de la actividad endo.

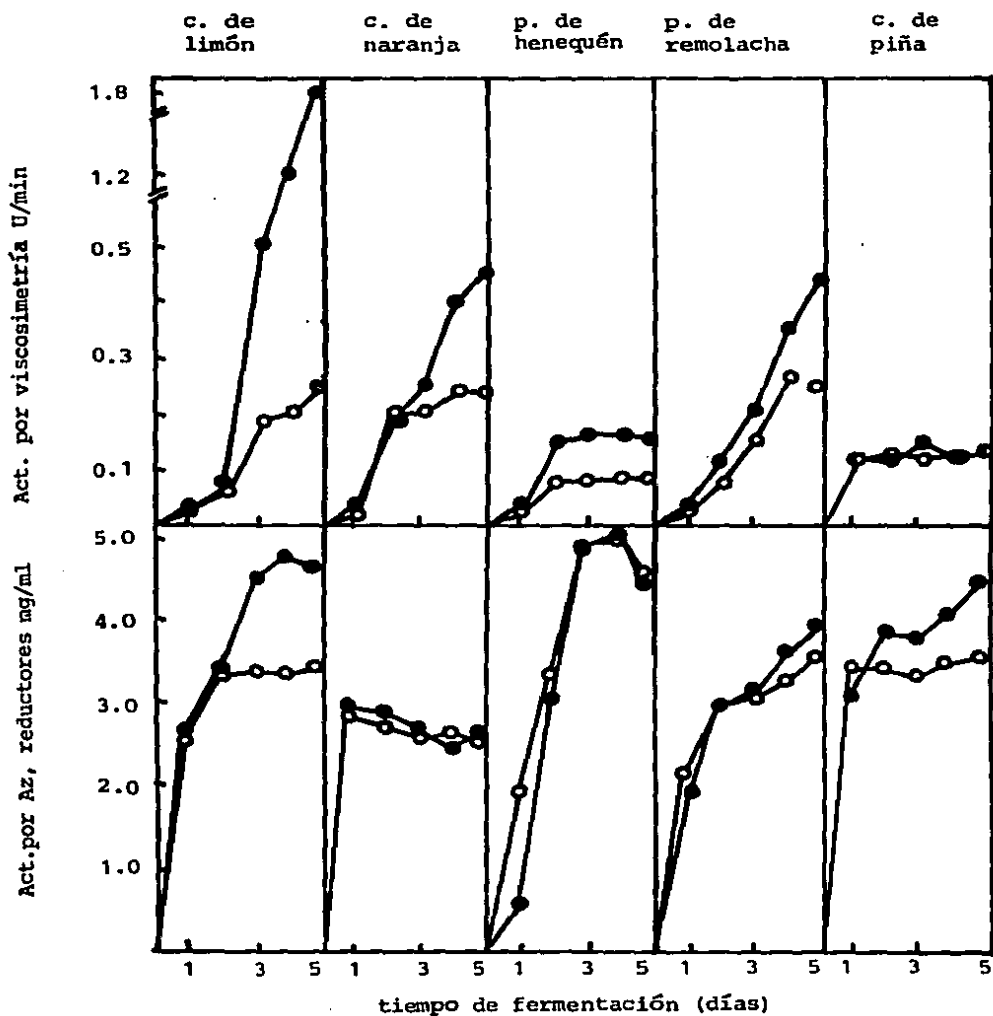


FIGURA 16.- Producción de pectinasas extracelulares por la mutante IRG63 (●) y *Aspergillus sp(O)*, utilizando como sustratos de fermentación desechos agroindustriales al 1% en matraces agitados a 200 rpm, 37°C y pH inicial 4.5. Estos resultados son promedio del experimento realizado por duplicado.

En la TABLA VII pueden compararse fácilmente las actividades máximas producidas en los desechos por la mutante y la cepa silvestre, medidas por reductores y viscosimetría. Por estos resultados se puede concluir que para la mutante IRG63 la cáscara de limón es el mejor sustrato para la producción de pectinasas tipo endo.

TABLA VII .- COMPARACION DE LA ACTIVIDAD PECTINOLITICA EXTRACELULAR PRODUCIDA POR *Aspergillus* sp. Y LA MUTANTE IRG63 AL UTILIZAR DESECHOS AGROINDUSTRIALES COMO FUENTE DE CARBONO.

SUSTRATO 1%	ACT. POR VISCOSIMETRIA (U/min/ml)			ACT. POR GRUPOS REDUCTORES (mg/ml)		
	SILVESTRE	MUTANTE	INCREM.%	SILVESTRE	MUTANTE	INCREM.%
Cáscara de limón	0.400 ± 0.00*	1.8 ± 0.025*	450	3.4 ± 0.012*	4.7 ± 0.03*	38.2
Pulpa de remolacha	0.265 ± 0.002*	0.44 ± 0.002*	66	3.6 ± 0.001*	3.97 ± 0.003*	10.27
Cáscara de naranja	0.230 ± 0.000*	0.45 ± 0.004*	95.6	2.52 ± 0.002*	2.56 ± 0.001*	1.59
Pulpa de henequen	0.087 ± 0.003*	0.16 ± 0.002*	83.9	5.0 ± 0.025*	5.0 ± 0.01*	0.00
Cáscara de piña	0.160 ± 0.003*	0.160 ± 0.0025*	0.0	3.5 ± 0.003*	4.5 ± 0.004*	28.57

* Diferencias entre los dos valores medidos por cada muestra.

Las cepas fueron crecidas 120 h a 37°C con agitación de 200 rpm y pH inicial de 4.5.

4.5.0 PRODUCCION DE PECTINASAS POR LA MUTANTE IRG63 EN FERMENTADOR DE 14 LITROS.

Resultaba de importancia conocer la producción de pectinasas por la cepa a nivel de fermentador en condiciones más controladas para poder llevar a cabo el escalamiento del proceso. Anteriormente se había desarrollado un medio industrial y se determinaron las condiciones de fermentación más favorables para la producción de pectinasas de *Aspergillus* sp. Utilizando el mismo medio de sales industriales se probó la producción en fermentador de 14 l. Como puede verse en la FIGURA 12, la mutante produjo 2.4 U x min. y la silvestre 0.6 U x min. de actividad por viscosimetría, es decir, hay una mayor producción de las dos copas en relación a la actividad producida en matraz, pero el incremento relativo de la mutante continúa siendo cuatro veces mayor que en la cepa silvestre. En trabajos previos con *Aspergillus* sp. Se encontró que al emplear la pulpa de henequén como fuente de carbono en fermentador₄₂, la producción máxima alcanzó un valor de 0.15 U x min.. En la misma FIGURA 12 no se observan mayores diferencias en la actividad medida por reductores en ambas cepas, lo cual sigue apoyando que la actividad endo y exo se regulan de manera diferente. También puede observarse que el incremento de la actividad no es debida a crecimiento, ya que la actividad específica es cuatro veces mayor en la mutante, ni tampoco a una mayor

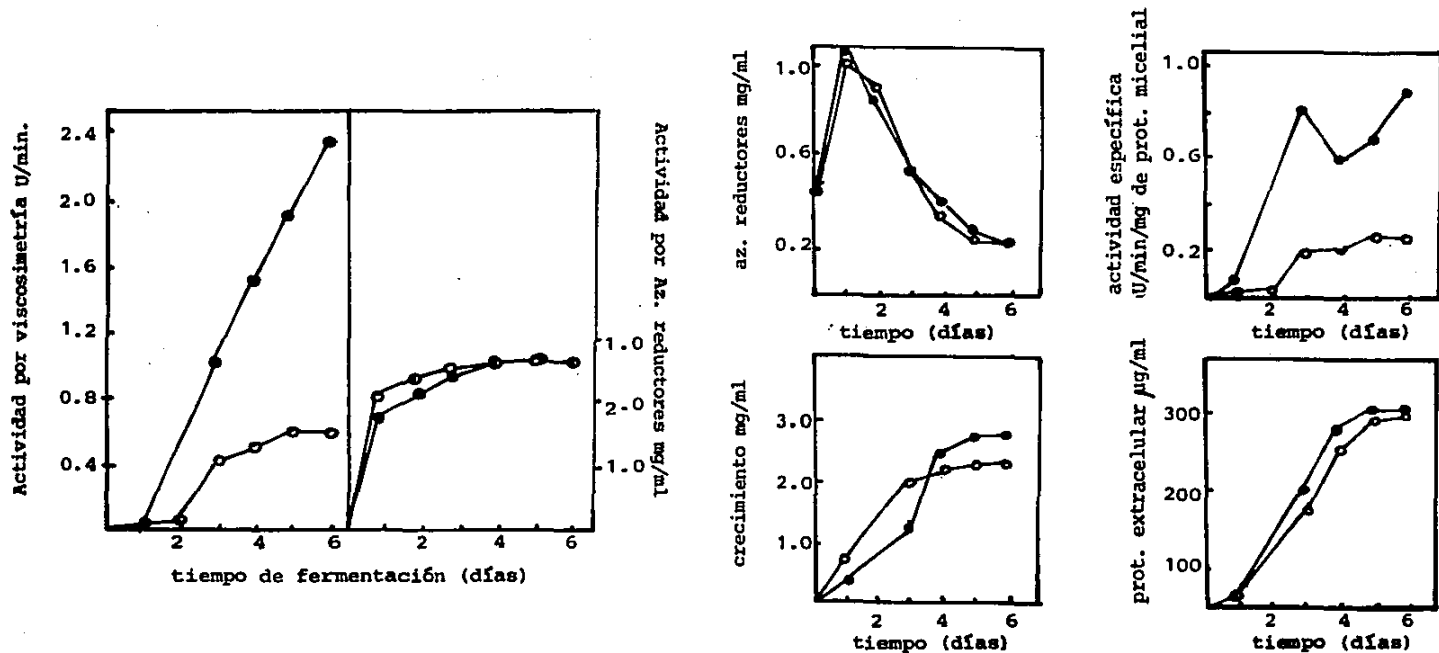


FIGURA 17.- Producción de pectinasas extracelulares por *Aspergillus* sp(0) y su cepa mutante IRG63 (●) en fermentador de 14 l. Se adicionó al medio de cultivo : fosfato de potasio monobásico 0.2%, fosfato de amonio 0.2%, cáscara de limón 1% y agua de la llave. El pH inicial de la fermentación fué ajustado a 3.5 con ácido sulfúrico. La temperatura de incubación fué de 37°C, 200 rpm y 10 l de aire/min. Estos resultados son promedio del experimento que fué realizado por duplicado.

excreción de enzimas al medio de cultivo, como se observa en la determinación de la proteína extracelular.

En caso de escabarse el proceso de producción de pectinasas, se utilizaría la mutante IR663, por lo que fué importante conocer que la producción de las enzimas no se ve afectada al cambiar el volumen del cultivo y al emplear un medio con sales industriales y agua de la llave

4.6.0 CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD PECTINOLITICA EXTRACELULAR DE LA MUTANTE IRG63.

Dado que existe el interés de escalar el proceso para la producción de pectinasas por la mutante IRG63, fué necesario determinar la actividad pectinolítica utilizando un método representativo de la aplicación práctica de las pectinasas, como lo es su capacidad clarificante del jugo de manzana. En trabajos previos se demostró que el sistema pectinolítico de *Aspergillus* sp. presenta una actividad clarificante del jugo de manzana, la cual es similar a la de las mejores preparaciones comerciales. Se midió la actividad pectinolítica clarificante utilizando los filtrados libres de células de la cepa mutante, ajustando la concentración de proteína a 35 µg. Los resultados obtenidos se muestran en la FIGURA 18, en donde se observa que al tratar el jugo de manzana con el filtrado de la mutante se obtuvo el doble del volumen de jugo clarificado que cuando se utilizó el filtrado de la silvestre. El volumen máximo de jugo clarificado por la actividad pectinolítica de la mutante fué de 98 ml a las dos horas de filtración, mientras que a ese mismo tiempo el volumen de jugo clarificado por la silvestre fué de 45 ml. Estos resultados demuestran que tiene ventajas prácticas sobre la silvestre la cepa IRG63, y que si bien la diferencia en la actividad pectinolítica de la mutante

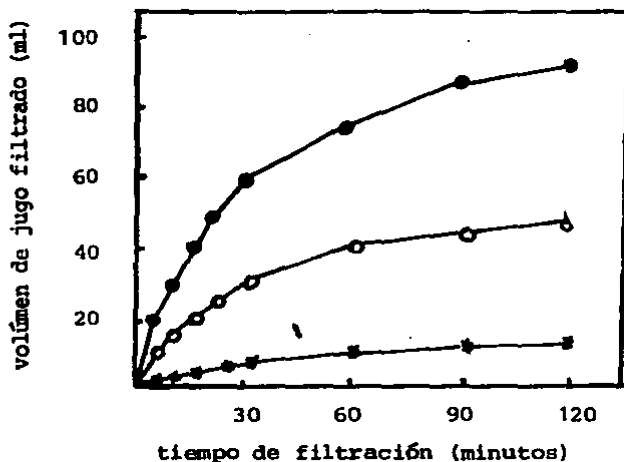


FIGURA 18.- Actividad pectinolítica medida por velocidad de filtración de jugo de manzana (100 ml). Para el ensayo se emplearon filtrados de Aspergillus sp (o) y de la mutante IRG63 (e) producidos en maiz utilizando cáscara de limón al 1% como fuente de carbono, 37°C y 200 rpm durante 120 h. Se adicionó un ml de filtrado que contenía 35 µg de proteína aproximadamente. Control sin enzima (*).

y la cepa silvestre no es de cuatro veces, es de cuando menos el doble, lo que significa un ahorro del 50% en la concentración de enzima para su utilización industrial.

El siguiente paso fué determinar la estabilidad en la producción de pectinasas de la cepa mutante, ya que se ha observado que en algunas mutantes pueden presentarse cambios desfavorables en la producción, lo cual pudiera ser debido a que con el tiempo ocurran rearrreglos en el genoma de la mutante por una inestabilidad de la mutación. El experimento se llevó a cabo examinando la producción de la actividad después de resiembras sucesivas en tres modalidades: a) una, fué inocular los medios sólidos con las cepas mutante y silvestre, las cuales fueron sembradas sucesivamente cada 72 horas durante 2 meses; b) otra manera fué almacenar placas a 4°C durante 3 meses; y c) se aislaron 5 colonias de una misma cepa, cada una de las cuales fué resembrada 20 veces. Después de las resiembras, se llevaron a cabo los cultivos de las cepas en matraz, utilizando la cáscara de limón como sustrato. Se observó en las tres modalidades (FIGURA 12) que la mutante IR663 muestra ser tan estable en la producción de la actividad medida por viscosimetría como la cepa silvestre.

Otro punto examinado fué el pH óptimo para la medición de la actividad de los filtrados de las cepas

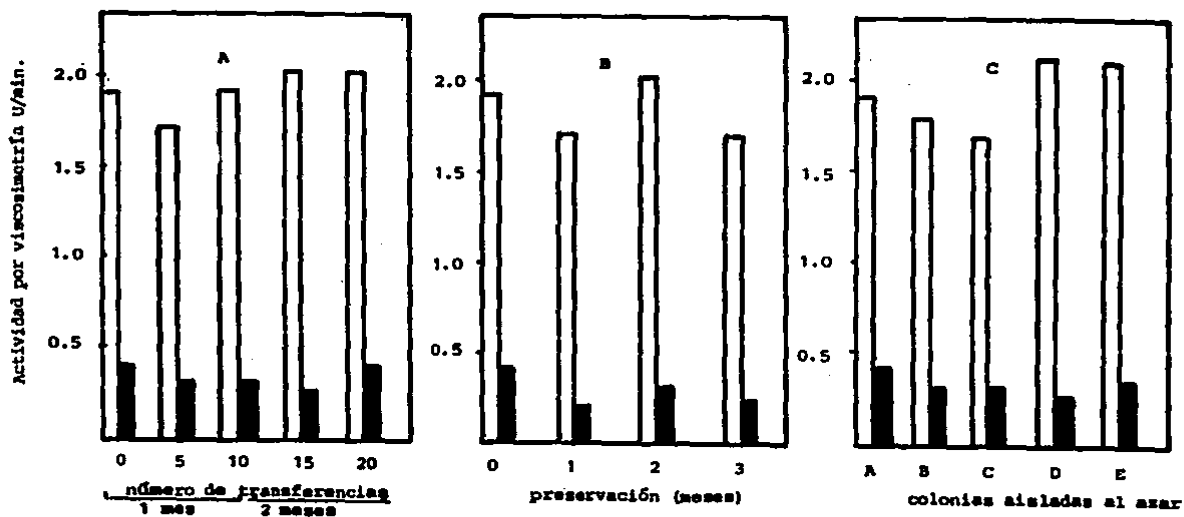


FIGURA 19. Estabilidad de la producción pectinolítica de *Aspergillus* sp. (■) y su cepa mutante IN663 (□). La estabilidad fue examinada de tres maneras: A, los microorganismos fueron crecidos en papa dextrosa agar (PDA) y fueron transferidos a una nueva placa, esta transferencia fue repetida 20 veces; B, la placa primaria fue preservada durante tres meses a 4°C y C, se preparó una suspensión de esporas y se seleccionaron al azar 5 de las colonias aisladas (A, B, C, D y E), cada una de estas colonias fue resembrada 20 veces.

mutante y silvestre provenientes de fermentaciones que se realizaron con la cáscara de limón, Para la medición de la actividad por viscosimetría se emplearon buffers de acetatos 0.16 N a valores de pH entre 3 y 6 y para la medición de la actividad por reductores buffers de acetatos 0.17 N a valores de pH entre 3 y 6. En la FIGURA 20 se observa que no hay diferencia entre la cepa silvestre y la mutante, ya que el rango de pH óptimo de la actividad pectinolítica medida por reductores y viscosimetría, está entre 4 y 5.5 para ambas cepas. El pH de cada una de las muestras fué el mismo después de la reacción.

Otro experimento a determinar, fué la temperatura óptima de la actividad pectinolítica medida por reductores. Se midió la actividad de los filtrados producidos en cáscara de limón por las cepas mutante y silvestre en un rango de temperatura entre 20 y 60 °C. Los resultados presentados en la FIGURA 21 muestran que la temperatura óptima de la actividad es entre 40 y 60°C para ambas cepas, aunque se observa un ligero aumento en la cepa silvestre, entre 50 y 60°C, en relación a la mutante.

Por último se midió la estabilidad de la actividad a la temperatura en los filtrados de ambas cepas. En la FIGURA 22 se observa que la actividad medida por viscosimetría es más sensible a altas temperaturas.

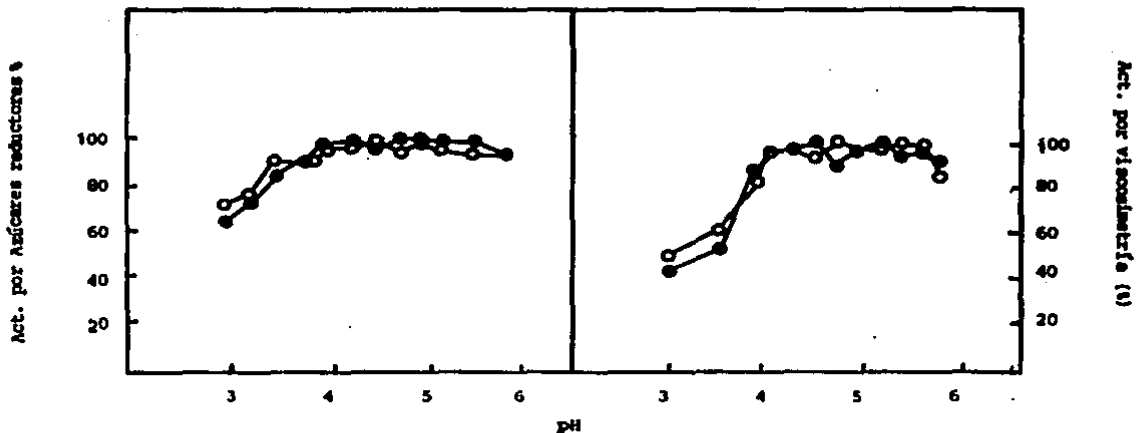


FIGURA 20 .- Efecto del pH sobre la actividad pectinolítica de *Aspergillus* sp(●) y de su cepa mutante IRG63 (○) medida por reductores y viscosimetría. Los filtrados provienen de fermentaciones realizadas con cáscara de limón en matraz agitado a 200 rpm y 37°C durante 120 horas. Estos resultados son promedio del experimento realizado por duplicado.

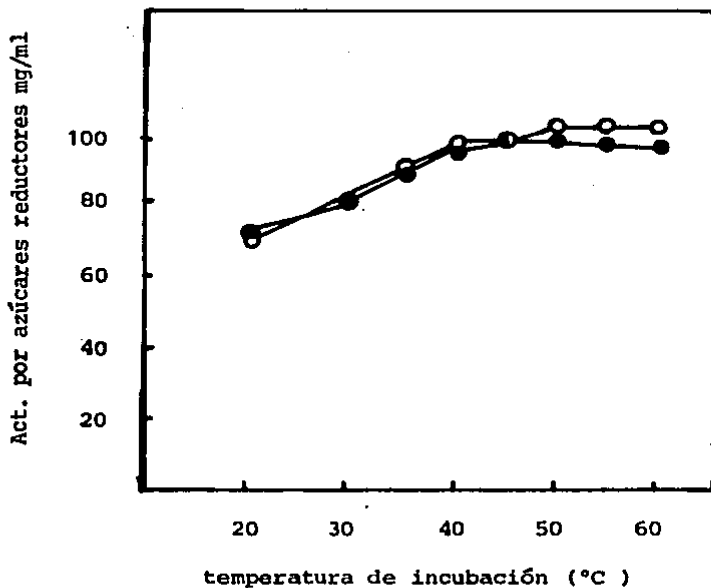


FIGURA 21.- Efecto de la temperatura sobre la medición de la actividad pectinolítica de los filtrados de Aspergillus sp (o) y su cepa mutante IRG63 (●) medida por azúcares reductores. Como sustrato se utilizó pectina en amortiguador de acetatos. Los filtrados provienen de fermentaciones con cáscara de limón 1%, 200 rpm. y 37°C. Estos resultados son promedio del experimento que fué realizado por duplicado.

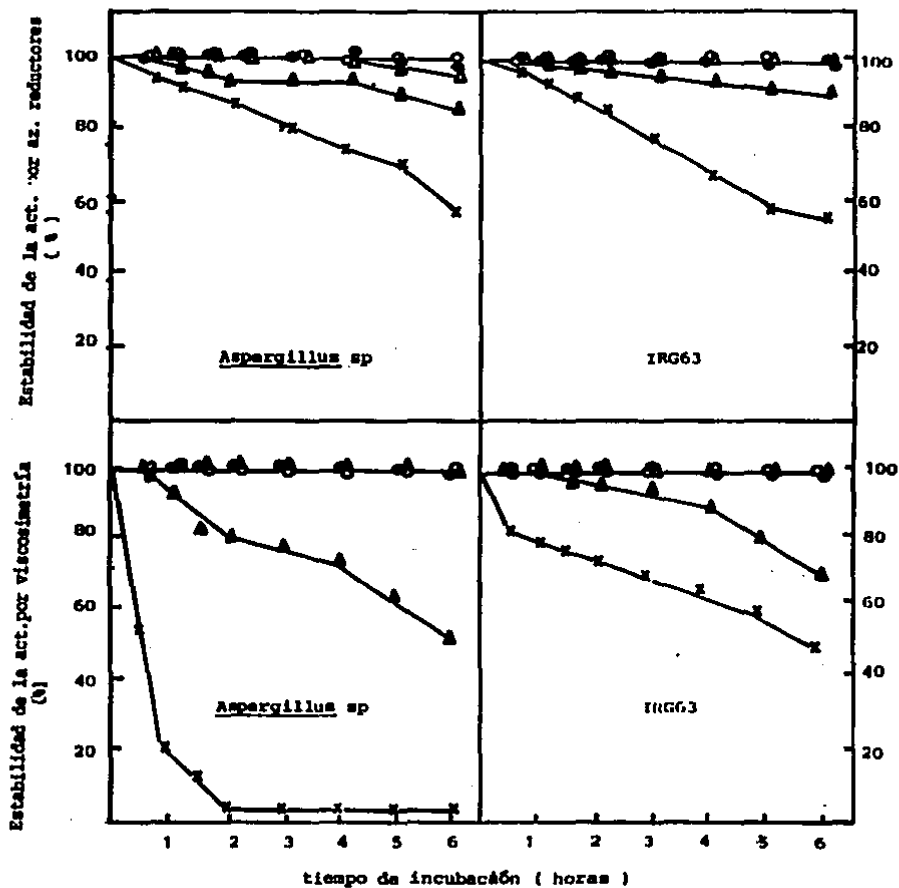


FIGURA 22.- Estabilidad a la temperatura de la actividad pectinolítica de los filtrados de *Aspergillus sp* y su mutante IRG63 medida por reductores y viscosimetría. Las temperaturas empleadas fueron: 20°C (o), 29°C (■), 37°C (▲) y 45°C (×). Los filtrados fueron producidos utilizando cáscara de limón 1% en matraz agitado a 200 rpm, 37°C y pH inicial de 4.5. Estos resultados son promedio del experimento que fué realizado por duplicado.

Cuando los filtrados de ambas cepas fueron incubados a 20, 29 y 37 °C , se mantuvo el 100% de la actividad a las seis horas. Al incubar los filtrados a 50 °C, *Aspergillus* sp. perdió el 95% de su actividad desde las dos horas de incubación, mientras que la actividad de los filtrados de IR663 pierde el 55% de la actividad a las seis horas de incubación. La constante de inactivación (k), para el filtrado enzimático de la silvestre fué de 1.51 U / min. y para el de la mutante 0.088 U / min., lo cual parece indicar que las endopectinasas de IR663 son más resistentes a altas temperaturas que las de *Aspergillus* sp.

Por otro lado, la estabilidad medida por reductores, FIGURA 22 , presentó un comportamiento similar en los filtrados de ambas cepas y se observó que a 50°C la actividad inicial es afectada aproximadamente un 65% a las seis horas de incubación.

De acuerdo a nuestros resultados, los filtrados de la cepa mutante mostraron ser más estables que los de la cepa silvestre. Buscando una explicación, se midió el pH de los filtrados de ambas cepas y se encontró un pH de 4.0 en la silvestre y pH 3.3 en la mutante, lo cual podría afectar en mayor grado la actividad enzimática de la silvestre.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este trabajo se demostró que la cepa silvestre de *Aspergillus* sp. produce pectinasas extracelulares a partir de varios desechos agroindustriales que contienen diferentes concentraciones de pectina, pero la cáscara de limón fué el mejor sustrato para producir pectinasas de tipo endo, que son las de mayor importancia comercial. La mayor producción en este desecho parece estar más relacionada con la naturaleza química de la pectina, más que a la concentración en el desecho. La cáscara de limón, además de ser un buen inductor de las pectinasas, es un desecho que está disponible gran parte del año en grandes cantidades.

Se desarrolló un método para la preselección de mutantes hiperproductoras, en donde las mejores condiciones para la detección del halo de hidrólisis en placa fueron: 0.25% de pectina y 250 µg x ml de cicloheximida, incubando 48 horas a 37 °C y utilizando yodo como revelador. Este método fué bueno para preseleccionar ocho cepas mutante que formaron un halo de hidrólisis mayor que el de la cepa silvestre y que incrementaron cuatro veces la actividad endo cuando fueron crecidas en pectina

citrica grado analítico, pero no cuando se utilizó la cáscara de limón, en donde se observó que las mutantes acumulan más grupos reductores que la silvestre en el medio de cultivo durante las primeras horas de fermentación.

Por otro lado, se demostró que las pectinasas de *Aspergillus* sp. son sensibles a la represión catabólica causada por los grupos reductores no dializables que se acumulan en el medio de cultivo durante las primeras horas de fermentación, ya que se observa que a mayor acumulación de grupos reductores hay menor producción de la actividad endo. Con respecto a la actividad exo, se observó un retraso en la aparición de la actividad; estos resultados apoyan a otros encontrados anteriormente, a que la actividad endo y exo responden de manera diferente a estímulos regulatorios.

En base a los resultados obtenidos se decidió seleccionar mutantes insensibles a represión catabólica; una fuente de carbono adicional a la pectina que reprimió la síntesis de pectinasas de *Aspergillus* sp. fue el glicerol, ya que no se observó el halo de hidrólisis que aparece al crecer al microorganismo en pectina; entre estas cepas, la IR63 y la IR67 fueron menos afectadas en su actividad pectinolítica medida por reductores y viscosimetría por la presencia del glicerol cuando fueron

crecidas en medio líquido. La cepa silvestre se comportó como una cepa hiperproductora, pues incrementó cuatro veces la actividad endo al utilizar la cáscara de limón como sustrato; este incremento se observó también cuando se realizó el cultivo en fermentador de 14 l empleando sales industriales y agua de la llave. La actividad medida por reductores fué prácticamente la misma en las cepas silvestre y mutante.

Se demostró que las pectinasas de IRG63 probadas en una aplicación representativa de su uso en la industria, presenta el doble de la actividad clarificante del jugo de manzana que la cepa silvestre, lo cual apoya la importancia de hacer el escalamiento del proceso para llevar la producción a un nivel industrial.

También se observó que IRG63, al igual que *Aspergillus* sp. es estable durante tres meses de resiembra en su producción de tipo endo.

El pH y temperatura óptimos de la actividad pectinolítica de las cepas silvestre y mutante fueron muy similares, siendo el rango de pH óptimo de actividad por reductores y viscosimetría entre 4.0 y 5.5 y la temperatura óptima de la actividad por reductores está entre 40°C y 60°C.

Por último, la estabilidad a la temperatura de las pectinasas de tipo endo parece ser mayor en la mutante cuando se incuban a altas temperaturas, ya que IRG63 mantiene un 45% de su actividad cuando son incubadas a seis horas a 50 °C, mientras que *Aspergillus* sp. sólo conserva el 5% en las mismas condiciones. Aún cuando la mayor estabilidad de las endopectinasas de IRG63 pudiera ser debida a la mutación, será necesario hacer otros experimentos al respecto que nos aporten datos más precisos.

La cepa mutante IRG63, que fué seleccionada como insensible a represión por glicerol, es además hiperproductora de endopectinasas cuando se utiliza la cáscara de limón como fuente de carbono. En base a nuestros resultados consideramos que las pectinasas de IRG63, tienen un potencial de aplicación práctica y que asimismo sigue siendo susceptible a incrementar su producción por manipulación genética, ya sea por mutagénesis empleando otros agentes mutagénicos; utilizando sistemas de recombinación como la fusión de protoplastos o bien mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética.

1. Fogarty, W.M. and Ward, O.P. Progress Microbiol. 13, 61 (1974).
2. Mac Millan, J.D. and Sheiman, N.I. Food Related Enzymes. American Chemical Society. Washington, D.D. (1974).
3. Pilknik, K.W. and Rombouts, F.M. Enzymes and Food Processing. Applied Science Publishers, L.T.D. 5, 227 (1981).
4. Fogarty, W.M. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology (1979).
5. Tutobello, R. and Mill, P.J. Biochem. J. 79, 51 (1961).
6. Frank, M., Rombouts and Walter Pilknik. Pectic Enzymes. Economy Microbiology. Microbial Enzymes and Bioconversions (1980).
7. Rexová-Benková, L. and Markovic, O. Adv. Carb. Chem. Biochem. 33, 323 (1976).
8. Rombouts, F.M. and Pilknik, W. Proc. Biochem., August, 9 (1978).
9. Platt, W.C. and Postos, A.L. U.S. Patent. 3058, 887 (1962).
10. Phaff, H.J. Arch. Biochem., 13, 67 (1974).
11. Ward, O.P. and Fogarty, W.M.J. Gen. Microbiol. XVI, 68 (1971).
12. Nyiri, L. Proc. Biochem., August, 27 (1968).
13. Mayrath, J. & Volavsek, G. Enzyme in Food Processing (1975).
14. Saitto, H.J. Gen. Appl. Microbiol., 1:38 (1955).
15. Yamasaki, M., Yasui and Arima, K. Agr. Biol. Chem., 30, 142 (1966).
16. Zetelaki-Horváth, K. and Békassy-Molnár, E. Biotech. and Bioeng. 15, 163 (1973).
17. Szajer, I. Acta Microbiol. Polon, 25:51 (1976).
18. Szajer, I. Biotech. Letters, 4, 549 (1982).

19. Devdrianni, T.G.; Aizenberg, V.L., Bilai, T.I., Zakar-donets, L.A. and Kvesitadze, G.I. Appl. Biochem.Micro-biol. 18, 178 (1982).
20. Moran, Nazuno, S. and Starr, M.P. Archives of Biochem-estry and Biophys. 12:322, (1968).
21. Nagel, C.W. and Anderson, M.N. Arch. Biochem. Biophys. 112:322 (1965).
22. Shinmyo, A. Davis; I.K. Nomote, F.; Tahara, T. and Enat-su, T. European Journal of Applied Microbiology. 5, 59 (1978).
24. Wang D.C.I., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Hum-prhey, A.E. y Lilly M. Den: Fermentation and Enzyme Technology. Jhon Willey and Sons, (1979).
25. Michael J. Bailey and Pertti H. Markanen. J. Appl. Chem. Biotechnol 25, 73, (1975).
26. Cuskey, E.M.; B.S. Montenecourt and eveleigh. Overproduc-tion of Microbial Product. 32, 405 (1981).
27. Montenecourt and Eveleigh. Hidrolisis of cellulose Adv. Chem.Ser 181 (1979).
28. Saval, S, and Huitrón C. Dev. Ind. Microbiol. 24, 547 (1983).
29. M. Ruz. Tesis de Licenciatura. Univ. de Yucatán. (1981).
30. G. Aguilar and C. Huitrón. Enzyme Microb. Technol. 9, 541, (1986).
31. Saval, S., Soldórzano, R., Alpizar, L., Cea, A. & Hui-trón, C. Biotecnología de Enzimas. C. Huitrón, Ed. UNAM-OEA-CONACyT. México. 203 (1985).
32. Saval, S. Tesis de Maestria en Investigación Biomé-dica Básica. UACPyP del C.C.H., UNAM. (1985).
33. Miller, L. Annal, Chem. 31, 426 (1956).
34. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, and Randall, R.J. J. B Biol. Chem. 193, 265 (1956).
35. M.A. Innis, M.J. Holland, P.C. McCabe, G.E. Cole, V.P. Wittman, R.Tal, K.W.K!, D.H. Gelfand, J.P. Holland, J.H. Meade. Science. 228, 21 (1985).
36. Saroj Mishra and K.S. Gopalkrishnan. J.Ferment. Technol. 62, 495 (1984).
37. Shelly M. Deane, Frank T. Robb and David R. Wood. Journal

of General Microb. 132, 893 (1986).

38. Spalding D.H. and Abdil-Baki, A.A. Phytopatology. 63, 840 (1973).
39. Guillermo Aguilar and Carlos Huitrón. Enzyme Microb. Technol, 9, 690 (1987).
40. Davis, H. Calhoun and Roy A. Jensen. Journal of Bacteriology, 109, 365 (1972).
41. Hsu, E.J. and Vaughn R.H. Journal of Bacteriol. 98, 172 (1969).
42. Huitrón, C., Saval, S., and Acuña M.E. Annals of the New York. Academy of Sciences. 434, 110 (1986).