

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"BIOSINTESIS DE PECTINASAS POR EL HONGO
LEVADURIFORME CELULOLITICO
Aureobasidium SP .CH-M-1018."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ROSALBA PEREZ VILLALVA



1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

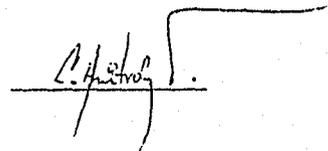
Presidente	Prof. Alfredo Echegaray Aleman
Vocal	Prof. Carlos Huitrón Vargas
Secretario	Prof. Rosa María Ramírez Gama
1er. Suplente	Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chavez
2o. Suplente	Prof. Marco Antonio Ortíz Jimenez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Asesor

Dr. Carlos Huitrón Vargas



Sustentante

Rosalba Pérez Villalva



DEDICATORIAS

A mis hijos, Cristian Rodrigo por ser tan comprensivo durante la realización de mi tesis y al pequeño Percibald.

A mis padres, Ignacio Pérez S.(q.e.d.) y Gloria A. Villalva H. quienes siempre me han apoyado y dado palabras de aliento y cariño.

A mi hermana Bárbara I. Pérez V.

A mi compañero de carrera con el que sigo compartiendo momentos gratos y a veces difíciles, Oscar García Kirchner.

A mis compañeras y amigas durante la realización de nuestras tesis, Claudia M. y Olivia S.

A mis compañeros del laboratorio de la antigua y nueva generación con los cuales hemos compartido momentos de alegría, enojo, discusiones científicas y cultura en general: Sarita, Eleazar, Julius, Edgar, Gaby, Victor, Francisco, Gabriel y Luis.

A la colega Miss Guille L. por ser uno de los elementos importantes del laboratorio,

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Huitrón V. por brindarme la oportunidad, el apoyo y asesoría, para la realización de este trabajo.

A la Dra, Ma. Elena Flores por su invaluable tiempo dedicado para la conclusión de este trabajo.

La realización de este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Carlos Huitrón del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr.C. Huitrón V.

INDICE

Introducción. - - - - -	1
Objetivo. - - - - -	2
Antecedentes. - - - - -	5
Clasificación de las sustancias pecticas. - - - - -	8
Clasificación de las pectinasas. - - - - -	11
Aplicaciones prácticas de las pectinasas. - - - - -	15
Microorganismos productores de pectinasas- - - - -	17
Material y métodos - - - - -	20
Microorganismo utilizado.	
Medios de cultivo.	
Preparación de inóculo.	
Producción de enzimas.	
Determinación de la actividad exo-PG.	
Determinación de la actividad endo-PG.	
Resultados y discusión - - - - -	22
Biosíntesis de la actividad pectinolítica en diferentes sustratos.	
Efecto de la concentración de los sustratos en la producción de la actividad pectinolítica.	
Efecto de la adición de glucosa en la producción de actividad exo-PG y endo-PG en las fermentaciones con: bagacillo de caña de azúcar, cáscara de limón y pectina.	
Efecto de la adición de glicerol en la producción de actividad exo-PG y endo-PG en las fermentaciones con : bagacillo de caña de azúcar, cáscara de limón, pectina.	
Efecto de la adición de ácido galacturónico en la producción de actividad exo-PG y endo-PG en las fermentaciones con : bagacillo de caña de azúcar, cáscara de limón, pectina.	
Conclusiones. - - - - -	47
Bibliografía. - - - - -	48

INTRODUCCION

Los productos de la agricultura han sido usados generalmente para aprovechar a la celulosa y a la hemicelulosa presentes en estos materiales, sin embargo existen otros subproductos agroindustriales, como la pulpa de henequén, la remolacha, la cáscara de limón o de naranja y el bagacillo de caña de azúcar, que contienen celulosa, hemicelulosa y pectina, que además de ser subutilizados, representan un problema de contaminación ambiental. Estos subproductos pueden ser convertidos a azúcares solubles por medio de una sacarificación enzimática o pueden ser utilizados para la producción de enzimas, tales como las celulasas, pectinasas y hemicelulasas, que son importantes en la industria alimentaria. En particular, la cáscara de limón tiene un alto contenido de pectina y es un sustrato potencial en México, para la producción de pectinasas, enzimas de amplia utilización en la industria de la extracción y clarificación de jugos vegetales.

Las pectinasas son enzimas ampliamente distribuidas en plantas y en microorganismos, aunque también se han encontrado en algunos protozoarios, nemátodos e insectos. Se sintetizan como un complejo multienzimático que incluye a las esterasas (pectinmetilesterasas), a las poligalacturonasas y a las liasas, que son las encargadas de hidrolizar a la pectina generando principalmente ácido galacturónico como producto.

En el Laboratorio del Dr. Carlos Huitrón se ha aislado un hongo levaduriforme, *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, que se caracteriza por ser un microorganismo celulolítico verdadero, ya que sintetiza celulasas extracelulares cuando es crecido en celulosa microcristalina o en bagacillo de caña como únicas fuentes de carbono. Este microorganismo crece también en cáscara de limón, que contiene pectina entre otros

compuestos, en una concentración de 35% en base seca, por lo que resultaba interesante evaluar la producción de pectinasas extracelulares por *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, en condiciones de producción de celulasas y caracterizar los factores que afectaban la síntesis de estas enzimas, siendo este el objetivo de este trabajo.

Con el fin de comparar la producción de pectinasas en diferentes sustratos, se creció al *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 en diferentes fuentes de carbono y los resultados mostraron que este microorganismo sintetiza pectinasas (determinadas como endo-poligalacturonasas y exopoligalacturonasas) en presencia de pectina cítrica, de bagacillo de caña y de cáscara de limón obteniéndose la mayor producción en bagacillo, después en cáscara de limón y por último en pectina. Sin embargo en celulosa microcristalina, la actividad producida es muy baja. Esto nos indicaba que la síntesis de las pectinasas en este microorganismo es inducible. Hay que hacer notar que los rendimientos de pectinasas obtenidos a concentraciones de 1 y 2 % en las fuentes de carbono mencionadas, prácticamente no difieren a excepción de cáscara de limón donde existió una diferencia de 40% mayor en la concentración de sustrato de 2%.

Con objeto de conocer algunos factores que pudieran afectar la síntesis de las pectinasas por *Aureobasidium* sp. se adicionó al medio de cultivo dos diferentes concentraciones de tres compuestos reportados como efectores positivos y negativos de la síntesis de enzimas. Estos compuestos fueron el glicerol, la glucosa y el ácido galacturónico.

Los resultados obtenidos al adicionar glicerol o glucosa (1% y 2%) al medio que contenía previamente bagacillo de caña, pectina ó cáscara de limón al 1%, mostraron que estas dos fuentes de carbono actuaron como fuertes represores de la síntesis de las

pectinasas (endo y exo-poligalacturonasas). La adición, tanto de glucosa como de glicerol, a las 24 horas de fermentación en bagacillo de caña, cáscara de limón o pectina al 1% como fuente de carbono provocó también una caída en el perfil de producción de ambas actividades. Ni en glicerol, ni en glucosa como únicas fuentes de carbono se presentó síntesis de pectinasas.

Por otro lado, la adición de ácido galacturónico al 1% al tiempo cero de la fermentación en las fuentes de carbono antes señaladas tuvo un efecto negativo sobre la síntesis de endo y exo-poligalacturonasas pero mucho menor que el mostrado por glucosa o glicerol. Cuando se adicionó a las 24 horas, por el contrario, el ac. galacturónico tuvo un efecto estimulador de la producción tanto de la endo- como de la exo-poligalacturonasa, a diferentes niveles dependiendo de la fuente de carbono inicial. Cabe destacar que el ácido poligalacturónico como única fuente de carbono indujo la síntesis de un 20% de la exopoligalacturonasa pero no permitió la síntesis de la endopoligalacturonasa.

De los resultados obtenidos podemos concluir que *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 presenta actividades de endo- y exo-poligalacturonasas, que son inducibles ya que se presentan solo cuando se utilizan sustratos que contienen pectina, que son sensibles a represión tanto por glucosa como por glicerol y que el ácido galacturónico tiene un doble efecto dependiendo del tiempo de adición. Es un represor cuando se adiciona al tiempo cero, es decir cuando se inicia la fermentación, y estimula la síntesis de ambas actividades cuando se adiciona a las 24 horas de fermentación. Esto pudiera deberse a la concentración de azúcares reductores que se ha observado que es mayor durante las

primeras horas de la fermentación para disminuir después. De ser cierto esto, el efecto inductor o represor del ac. galacturónico dependería de su concentración.

ANTECEDENTES

Uno de los usos de algunos productos de la agricultura ha sido aprovechar la celulosa y la hemicelulosa presentes en estos materiales. Sin embargo existen subproductos agroindustriales que son subutilizados como las pulpas de henequén, de remolacha, la cáscara de limón o de naranja, el bagacillo de caña de azúcar, que contienen celulosa, hemicelulosa y pectina que pueden ser utilizados para la producción de enzimas extracelulares. Actualmente esto se hace con la pulpa de remolacha y de manzana para la producción de pectinas y pectinasas en algunos países industrializados.

Existe una marcada variación, en cuanto a la concentración de pectina, celulosa y hemicelulosa en los diferentes sustratos agroindustriales que se manejan como desechos, por lo que son de interés práctico para la producción biotecnológica de enzimas, ya que de esta manera no es necesario utilizar sustratos purificados que son de mayor costo.

En México debido a que es el segundo país productor de limón y el sexto productor mundial de caña de azúcar (Ensminger et al., 1994), se generan elevados volúmenes de materiales agroindustriales que son ricos en pectina y celulosa. Estos materiales son considerados como desechos y en algunos casos producen problemas de contaminación.

Por estas razones es nuestro interés aplicar procesos biotecnológicos para la obtención de estas enzimas extracelulares a partir de desechos agroindustriales, utilizando cepas microbianas aisladas en México. En algunos ejemplos de la composición de algunos desechos tenemos que el limón contiene del 2.5 al 4.0% de pectina en base húmeda (Whitaker, 1984) y el bagazo de caña de azúcar completamente lavado, por medio de una

extracción con solución de ácido oxálico o de oxalato de amonio, contiene de 0.55 a 1.22% de pectina (Farnell, 1924; Martín, 1969).

Las enzimas pectinolíticas están ampliamente distribuidas en el medio ambiente y son sintetizadas por plantas y diversos microorganismos. Las pectinasas degradan las sustancias pécticas que se localizan en la lámina media de los tejidos vegetales, facilitando la penetración de microorganismos patógenos y mutualistas. Además, las pectinasas actúan en los sistemas de germinación y en el desarrollo de los tejidos. También intervienen en la maduración de frutos, cambiando la textura rígida a un fruto blando, así como en la caída de las hojas y descomposición de las mismas, reciclando así el material de las plantas.

Por su forma de actuar se agrupan en dos categorías: las esterases que desesterifican los metoxilos y las despolimerasas que actúan sobre las uniones glicosídicas α -(1-4) de las unidades de ácido galacturónico (Dean & Timberlake, 1989; Fogarty & Kelly, 1983; Kertz, 1951).

Por otro lado, las enzimas celulolíticas son producidas por microorganismos que se encuentran en varios grupos taxonómicos, desde eubacterias hasta protozoarios, que han sido identificados como protozoarios anaerobios de rúmen, así como en microorganismos encontrados en desperdicios celulósicos acumulados (Beguin & Aubert, 1994). Las celulasas son un sistema de enzimas que degradan la celulosa hasta glucosa. Este sistema está constituido por tres tipos de actividades : endoglucanasa (β -1,4-glucano hidrolasa) que ataca lugares internos de las fibras de celulosa; exo-glucanasas (β -1,4-glucano celobiohidrolasa) que libera celobiosa de extremos no reductores de las cadenas de glucosa y

β -glucosidasa que hidroliza celobiosa a glucosa. La actividad celulolítica es de gran importancia biológica, siendo la mayor reacción hidrolítica natural.

En nuestro laboratorio se han aislado microorganismos de muestras de suelo y mediante técnicas de evaluación se han determinado las de mayor producción de enzimas extracelulares, tanto pectinolíticas como celulolíticas. Entre ellos, los hongos han sido mayormente caracterizados por ser de fácil manejo y debido a que las enzimas que se producen se pueden recuperar en forma sencilla del caldo de cultivo, ya que son extracelulares y no requieren de procesos complejos para su separación. Las enzimas tanto pécicas como celulolíticas tienen aplicación en la extracción de jugos de frutas y en el procesamiento de alimentos y bebidas de origen vegetal (Fogarty & Kelly, 1983; Pilnik, 1982; Manachini et al., 1988).

Actualmente el mercado de las enzimas en la industria alimenticia va incrementándose, por lo que en México existe el interés de producirlas, ya que no se producen en el país a pesar de que se dispone de recursos agroindustriales que contienen cantidades variables de celulosa y pectina como el bagacillo de caña, la cáscara de limón, la pulpa de henequén y la remolacha azucarera.

Las sustancias pécicas son polímeros estructurales que se encuentran en combinación con celulosa en las paredes celulares de vegetales y frutas. Químicamente las pectinas son polímeros lineales de ácido galacturónico unido por los enlaces glicosídicos α -(1,4) en el cuál los grupos carboxilo del ácido están parcialmente esterificados con metanol. Algunos de los grupos hidroxilo en los carbonos 2 ó 3 pueden estar acetilados (McComb & McCready, 1957; Schultz, 1965). Muchas pectinas tienen regiones que están constituidas por α -D-1,4-galacturonanos que tienen inserciones de residuos de α -L-ramnopiranosil unidos

covalentemente como cadenas laterales. Otros azúcares que están presentes en las cadenas complejas y en menos cantidad son glucosa, xilosa y ramnosa (Pilnik & Rombouts, 1981). El peso molecular de las sustancias pécticas es variable, así tenemos por ejemplo que el de la pectina de cítricos es de 23000 a 71000 daltones (Luh & Phaff, 1951; Porwal & Chakravarti, 1970), el de la ciruela y pera es de 25000 a 35000 (Luh & Phaff, 1951) y de 250 000 a 360 000 el de las manzanas (Newbold & Joslyn, 1952).

CLASIFICACION DE LAS SUSTANCIAS PECTICAS

Las sustancias pécticas por su composición se clasifican en:

- **Protopectina.** Una sustancia insoluble que se encuentra en los tejidos inmaduros de vegetales, localizada principalmente en la lámina media. Su insolubilidad puede ser debida al tamaño del polímero o a su unión con cationes divalentes especialmente Ca^{2+} , así como con otros polisacáridos (Whitaker, 1990).

- **Pectina (Polimetilgalacturonato).** Es el material polimérico soluble, en el cual al menos el 75% de los grupos carboxilo de las unidades de galacturonato están esterificados con metanol.

- **Acido Péctico (Ac. Poligalacturónico).** Es el material soluble, en el cual todos los grupos metoxilo son removidos de las unidades de galacturonato.

- **Acidos Pectínicos.** Contienen hasta el 75% de las unidades de galacturonato metiladas.

- **Oligogalacturonatos.** Son polímeros más pequeños con dos o más unidades de galacturonato.

- **Oligometilgalacturonatos.** Son polímeros similares a los anteriores con dos o más unidades de galacturonatos, los cuales están parcial o completamente metilados en el C-6 (Whitaker, 1990).

Un factor importante que caracteriza a la pectina es el grado de esterificación (DE) de los grupos carboxilo del urónido con alcohol metílico. El grado de esterificación se ha definido como la proporción de esterificación en las unidades del ácido D-galacturónico en relación al total de ác. galacturónico. Esto influye fuertemente en la solubilidad y en la formación de los geles obtenidos bajo ciertas condiciones. Así encontramos, que las pectinas son subdivididas de acuerdo a su grado de esterificación y las pectinas con un DE mayor de 50% son pectinas de alta metoxilación y con DE menor de 50% son de baja metoxilación (BeMiller, 1986).

El grado de esterificación depende de la especie, tejido y madurez de los vegetales de donde se extrae. En general, los tejidos pectínicos contienen de 60 a 90% de esterificación. El DE afecta la firmeza y la cohesión de los tejidos de las plantas, así al reducir el DE existe mayor cohesión en los tejidos.

La alta viscosidad es una característica de las soluciones de pectina y existen varios factores que influyen en la viscosidad, como el peso molecular, el grado de esterificación, la concentración y el pH. La adición de sales de calcio y aluminio incrementan la viscosidad.

Además de la pectina, otro de los constituyentes de la estructura de la pared celular de las células de las plantas es la celulosa, el cual es el mayor carbohidrato sintetizado por las plantas y su degradación representa una importante parte del ciclo del carbono dentro de la biósfera.

La celulosa es un polímero lineal constituido por subunidades de glucosa unidos por enlaces (β -1,4). Las cadenas varían de 100 a 14000 residuos. Estas cadenas forman numerosos puentes de hidrógeno intramoleculares, lo cual cuenta para la formación de microfibrillas rígidas e insolubles. Las cadenas están orientadas paralelamente y de forma sumamente ordenada en las regiones cristalinas, y existen las zonas amorfas en donde se encuentran en forma desordenada (Beguin & Aubert, 1994).

Las células de las plantas, presentan en su pared secundaria largas cadenas de fibras de celulosa que están adheridas unas a otras por medio de hemicelulosas, lignina y pectina. La hemicelulosa es un complejo compuesto de polímeros de carbohidratos con xilanos y glucomanos como principales componentes. La lignina es un polímero altamente ramificado generado por la condensación de alcoholes aromáticos (Beguin & Aubert, 1994).

Por la composición química de estos subproductos es necesario para su bioconversión, la combinación de enzimas como las celulasas, pectinasas y hemicelulasas entre otras, para que los degraden a azúcares fermentables. De igual manera estos subproductos pueden ser utilizados para la producción de las mismas enzimas.

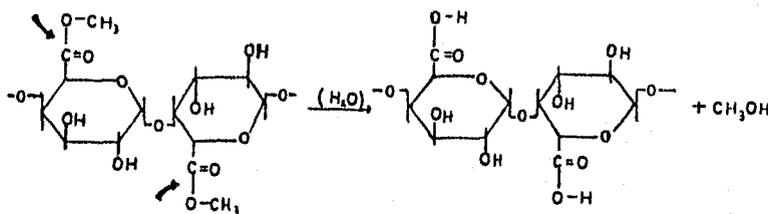
Debido al enfoque de este trabajo se ampliará la información acerca de las pectinasas.

CLASIFICACION DE LAS PECTINASAS

Las pectinasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son producidas por bacterias, hongos levaduriformes y filamentosos que tienen la capacidad de degradar a las sustancias pécticas compuestas de polímeros de unidades de ácido galacturónico. También se han encontrado en plantas, en algunos protozoarios, nemátodos e insectos (Whitaker, 1990).

Las enzimas pécticas se clasifican por su forma de atacar al sustrato. Hasta ahora se han descrito 12 y no son necesariamente producidas todas por un solo microorganismo. Las pectinasas están constituidas por un sistema enzimático que incluye a las esterasas (pectinmetilsterasas), las poligalacturonasas y las liasas (Whitaker, 1990).

a) **PECTINMETILESTERASAS** (pectina hidrolasas, EC 3.1.1.11). Son las enzimas que remueven los grupos metoxilo del grupo 6 carboxil del galacturonato, dando finalmente ácido péctico, metanol e H^+ de la ionización, del grupo carboxilo formado.



Estas enzimas se encuentran en muchas plantas y microorganismos, existiendo una diferencia entre ellas. Las metilpectinesterasas provenientes de hongos son generalmente más resistentes a agentes químicos y su pH óptimo se encuentra entre 4.5-7.5, en contraste del rango alcalino óptimo para las esterasas de las plantas. El peso molecular de estas enzimas de ambas fuentes se encuentra entre 26000 y 45000.

del rango alcalino óptimo para las esterasas de las plantas. El peso molecular de estas enzimas de ambas fuentes se encuentra entre 26000 y 45000.

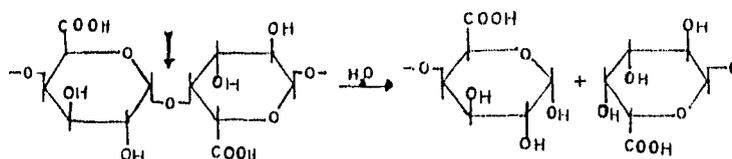
Las pectinmetilesterasas tienen una alta especificidad hacia los grupos metil éster del ácido péctico parcialmente metoxilado, pero no hacia la pectina completamente metoxilada. Aunque la desesterificación ocurre al azar, se cree que la enzima requiere de un grupo carboxilo libre adyacente al grupo metoxilado para actuar (Whitaker, 1990).

b) POLIGALACTURONASAS. Estas enzimas hidrolizan las uniones α -(1,4)glucosídicas próximas a los grupos carboxilos libres. Se subdividen en exopoligalacturonasas (EC 3.2.1.67) y endopoligalacturonasas (EC 3.2.1.15), de acuerdo al sitio donde inician el ataque de la cadena de ácido poligalacturónico. Estas enzimas son producidas por las plantas superiores e inferiores, así como por bacterias y hongos. Se cree que dichas enzimas intervienen en la patogénesis microbiana, maduración, crecimiento así como en la caída de las hojas y frutos de las plantas.

Las endopoligalacturonasas (endopectatohidrolasas) hidrolizan las uniones glucosídicas internas de los poligalacturonatos generando oligogalacturonatos y pocos mono o digalacturonatos. Prefieren los sustratos de bajo grado de esterificación. No tienen actividad sobre las pectinas altamente metoxiladas en ausencia de pectinmetilesterasas, aunque se ha observado que actúan con mayor actividad cuando el sustrato es un polímero de alto peso molecular. Su pH óptimo se encuentra entre 2.5 y 6.5 y no requieren de cationes ni de metales para su actividad (Whitaker, 1990).

Las enzimas de tipo endo atacan al sustrato de un forma aleatoria sobre las pectinas y ácidos poligalacturónicos provocando hidrólisis de los sustratos mencionados y por consiguiente causando la disminución de la viscosidad en soluciones de sustancias pécticas.

Estas enzimas (endo) son las de mayor aplicación en la industria de bebidas (Fogarty & Kelly, 1983; Kilara, 1982; Pilnik, 1982; Whitaker, 1984).

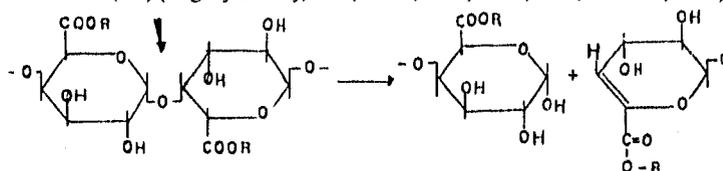


Voragen & Pilnik (1969) sugirieron que la velocidad de reducción de viscosidad, con la velocidad de incremento en grupos reductores (rompimiento de uniones glucosídicas) podría ser usado para distinguir entre las enzimas hidrolíticas endo y exo. Se hizo notar que un 50% de reducción en viscosidad, acompañada por solamente un incremento de reductores entre el 2% y 3% por hidrólisis de uniones glucosídicas indica una enzima endo, en tanto que un resultado de 10% o más de reductores por hidrólisis indica una enzima tipo exo. Para la confirmación de lo anterior se recomienda determinar los productos liberados mediante, la cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) (Carunchio et al., 1988), tomando muestras a diferentes tiempos de reacción.

Las exopoligalacturonasas (exopectatohidrolasas) actúan sobre poligalacturonatos (pectatos) de alto peso molecular, más que en polimetilgalacturonatos. En general, atacan el polímero a partir del extremo no reductor del sustrato (Hatanaka & Ozawa, 1969), a excepción de las enzimas de insectos que atacan por el extremo reductor de la cadena (Courtois et al., 1968; Foglietti et al., 1971). Estas enzimas se distinguen de las oligogalacturonato hidrolasas por su preferencia hacia los poligalacturonatos de alto peso molecular.

Las oligogalacturonato hidrolasas tienen alta especificidad por oligogalacturonatos de bajo peso molecular. La velocidad de hidrólisis disminuye rápidamente cuando se incrementa el grado de polimerización y atacan por el extremo no reductor (Whitaker, 1990).

c) **LIASAS**. Estas enzimas son producidas por hongos y bacterias y no son encontradas en plantas superiores (Pilnik & Rombouts, 1981). Degradan a la pectina y a los polímeros y oligómeros de *D*-galacturonano rompiendo la unión glucosídica C-C de los α -D-(1,4)galacturonanos, por medio del mecanismo de transeliminación, generando residuos galacturosilos 4,5 insaturados en el extremo no reductor. Los monómeros liberados son rápidamente rearrreglados para formar ácido 4-deoxi-5-cetourónico. El ataque de estas enzimas ocurre en forma aleatoria al interior de la cadena (endo) o por el extremo no reductor (exo) (Fogarty & Kelly, 1983; Kilara, 1982; Pilnik, 1982; Whitaker, 1984).



Las endopoligalacturonato liasas (EC 4.2.2.2; endopectato liasas) son producidas en primer lugar por bacterias y algunos hongos. También existe el reporte de un protozoario *Ophryos colex purkyni* que produce una poligalacturonato liasa (Mah & Hungate, 1965). Estas enzimas difieren de las endopoligalacturonasas en cuatro aspectos: 1) Las liasas sólo se encuentran en microorganismos; 2) Su pH óptimo se encuentra entre 8-10, mucho más alto que para las endopoligalacturonasas; 3) Necesariamente requieren de calcio para su actividad y 4) la ruptura de la unión glucosídica se lleva a cabo por transeliminación y no por hidrólisis. Generalmente los pectatos son buenos sustratos para las endopoligalacturonato

liasas (Pilnik, et al., 1973) y la actividad de estas disminuye conforme disminuye el largo de la cadena del sustrato (Atallah & Nagel, 1977).

Las exopoligalacturonato liasas (EC 4.2.2.9; exopectato liasa) se han encontrado solamente en pocas bacterias, actúan sobre los poligalacturonatos produciendo digalacturonatos 4:5 insaturados, a partir del extremo reductor del sustrato. Su pH óptimo se encuentra entre 8 y 9.5. También tienen un requerimiento absoluto de iones calcio excepto la enzima de *Erwinia* sp. (Whitaker, 1990).

Las oligogalacturonato liasas (EC 4.2.2.10; endopectinaliasa) son producidas por bacterias y hongos, tienen una máxima actividad sobre oligogalacturonatos. Degradan al sustrato, preferencialmente de cadena corta y en el extremo no reductor, de una manera aleatoria dando como producto final monómeros insaturados. Su pH óptimo se encuentra dentro del rango ácido y tienen un peso molecular aproximado de 30000 daltones.

APLICACIONES PRACTICAS DE LAS PECTINASAS

Las pectinasas pueden ser usadas en la fabricación de jugos de frutas (Genhartz, 1990). En la industria de alimentos se aplican para incrementar la eficiencia de procesos extractivos en vegetales y en la estabilización de productos y en perfeccionamiento de sabores. También las enzimas pécticas juegan un papel importante en la destrucción y pudrición de frutas y vegetales, por lo que tienen considerable aplicación en el almacenamiento e industrialización de frutas y legumbres (Fogarty & Kelly, 1983; Whitaker, 1984).

FRUTAS PROCESADAS. Las enzimas pectinolíticas son adicionadas después de prensar las frutas para hidrolizar la pectina de frutas o tejidos vegetales aplicadas a la producción de purés y néctares. Para lograr una total licuefacción deben ser adicionadas tanto enzimas pectinolíticas como celulolíticas (Beldman et al., 1984).

CLARIFICACIÓN DE JUGOS. Generalmente en la extracción de jugos de frutas, las sustancias pécticas ocasionan propiedades coloidales, alta viscosidad, turbiedad, dificultad de filtración por la presencia de micelas voluminosas. Al adicionar enzimas pécticas se solucionan los problemas mencionados, por lo tanto se incrementa la extracción de jugos, así como el sabor y la brillantez (Fogarty & Kelly, 1983).

MACERACIÓN Y LICUEFACCION. Anteriormente se producían jugos turbios por procesos mecánicos, los cuales incluían tratamientos térmicos. Actualmente la adición de enzimas macerantes tales como las poligalacturonasas, sirven para disolver el tejido de las plantas. Si la suspensión viscosa es subsecuentemente tratada con celulasas, la lisis de la pared origina productos de baja viscosidad, los cuales se pueden concentrar fácilmente. La utilización de estas dos enzimas que actúan simultáneamente reduce los costos de los procesos (Fogarty & Kelly, 1983).

CLARIFICACION DE VINOS. Para una mejor extracción de color y de otros componentes vegetales, es conveniente el empleo de una combinación de enzimas pectinolíticas, celulolíticas y proteolíticas, en vez de clarificación natural que se lleva más tiempo y requiere de dióxido de azufre.

CONSERVACION DE MADERAS. Las maderas de abeto son resistentes al tratamiento con cobre-cromo-boro, pero al ser sometidas a la acción de las pectinasas aumenta la permeabilidad a las sustancias conservadoras que son utilizadas (Fogarty & Kelly, 1983).

OTRAS APLICACIONES. Las enzimas pectinolíticas también son empleadas en la despectinización de algunas fibras textiles importantes en la industria como son: el lino (*Linum usitatissimum*), cáñamo (*Cannabis sativa*), yute (*Corchorus sp.*). El tratamiento con pectinasas hacen más flexibles las fibras, debido a que se reduce la pectina que contienen.

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PECTINASAS

Existen microorganismos pectinolíticos que producen simultáneamente más de un tipo de enzimas pectinolíticas, sin embargo no se ha encontrado un microorganismo que produzca un sistema pectinolítico formado por todos los componentes enzimáticos que se han descrito (Fogarty & Kelly, 1983).

Las pectinasas son producidas por varias bacterias dentro de las cuales se encuentran los géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Erwinia sp.* Las bacterias generalmente producen poligalacturonato liasas (Kelly & Fogarty, 1978; Fogarty & Kelly, 1983). Los hongos producen una mayor variedad de actividades pectinolíticas, así tenemos algunos géneros de estos como son: *Aspergillus*, *Cercospora*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus* y *Trichoderma* (Devdariani et al., 1982; Fogarty & Kelly, 1983) (Tabla no. 1). Las pectinasas producidas por hongos tienen la característica de

producirse extracelularmente, lo cual es una ventaja para su aplicación industrial además de tener mayor eficiencia en la degradación de la pectina.

La producción de las pectinasas en relación a cantidad y tipo de componentes, depende de las características biológicas del microorganismo, de la composición química del medio de cultivo y de las condiciones fisicoquímicas de la propagación.

Se ha reportado en la literatura científica el efecto de las fuentes de carbono y su concentración. Encontrándose que la pectina es inductor de la síntesis de enzimas pectinolíticas extracelulares, pero dado su alto costo, su uso es limitado en la formulación del medio de producción a nivel industrial (Fogarty & Kelly, 1983). Por lo que algunos materiales pécticos considerados desechos agroindustriales como la pulpa de remolacha azucarera y pulpa de manzana (Ilezuk, 1976; Leuchtenberg et al., 1989; Maldonado et al., 1986) se han empleado como sustratos para la producción a nivel comercial en algunos países industrializados (Fogarty & Kelly, 1983; Kilara, 1982).

También se ha demostrado en estudios a nivel de laboratorio que altos niveles de enzimas pécticas pueden ser obtenidos en medios que contienen mezclas de fuentes de carbono, tales como: glucosa-pectina, sacarosa o lactosa con pectina (Tuttobello & Mill, 1961; Nyeste & Holló, 1963; Vasu, 1967; Feniksova & Moldabaeva, 1967).

Las preparaciones comerciales de enzimas pécticas usadas en la elaboración de alimentos son obtenidas de hongos, principalmente de *Aspergillus niger*. Aunque existen procesos que solamente requieren de un solo tipo de enzima pectinolítica, los procesos industriales de extracción tradicionalmente usan preparaciones crudas que contienen una variedad de enzimas pécticas asociadas con hemicelulasas o celulasas (Manachini et al., 1988).

También se ha reportado que hongos levaduriformes del género *Aureobasidium pullulans* son productores de pectinasas, observándose que este al utilizar como fuente de carbono a la pectina produce una endopoligalacturonasa extracelular (Finkelman & Zajic, 1978). *Aureobasidium pullulans* LV10 al crecer en pectina de manzana como única fuente de carbono produce pectinohidrolasa y pectinaliasa (Manachini et al., 1988).

El hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 fue aislado en nuestro laboratorio a partir de suelo de un campo cañaveral del Estado de Morelos (Gilbón et al., 1981), esta cepa crece bien a 29° y 37°C y produce actividad celulolítica y xilanolítica extracelular cuando es cultivado en celulosa microcristalina o bagacillo de caña de azúcar no tratado como única fuente de carbono (Huitrón et al., 1984).

Demostrándose que la actividad celulolítica se obtuvo en tiempos más cortos que el requerido para otros hongos celulolíticos de colección. El microorganismo fue identificado como *Aureobasidium* debido a que forma colonias cremosas de color naranja como levadura y micelio inmerso en el agar, así como las características observadas con microscopio electrónico y de luz lo cual mostró la presencia de micelio verdadero y blastosporas. Morfológicamente es similar a *Aureobasidium pullulans* (Bridge, 1959), pero difiere en el color y en la actividad celulolítica verdadera sobre papel filtro (Gilbón & Huitrón, 1986).

Considerando las características de este microorganismo y la composición de los desechos agroindustriales como cáscara de limón y bagacillo de caña de azúcar, el objetivo de este trabajo es evaluar la producción de la actividad pectinolítica extracelular del hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, cultivado en bagacillo de caña y cáscara de limón, así como el efecto positivo o negativo de la adición de diversas fuentes de carbono como pectina, glucosa, glicerol y ácido galacturónico en la biosíntesis de dichas enzimas.

MATERIAL Y METODOS

MICROORGANISMO UTILIZADO. La cepa utilizada en este trabajo fue un hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, aislado y seleccionado del suelo de un cañaveral del Estado de Morelos. Tiene las características de ser un microorganismo celulolítico verdadero y de crecer bien en celulosa microcristalina y bagacillo de caña como únicas fuentes de carbono (Gilbón et al., 1981).

MEDIOS DE CULTIVO:

MEDIO A PARA LA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA CEPA. La cepa se propagó y conservó en tubos (16X 150) de agar inclinado de Papa Dextrosa agar (PDA) suplementado con 0.25% más de agar bacteriológico. El medio fue esterilizado a 121°C durante 20 min.

MEDIO B PARA LA PRODUCCION DE ENZIMAS. El medio utilizado para la producción de enzimas se preparó en agua destilada conteniendo 0.2% de KH_2PO_4 , 0.14% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03% CaCl_2 , 1.0 ml de una solución de elementos traza (0.002% de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0005% FeSO_4 , 0.00017% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% ZnCl_2) (Garcla, 1983). Se utilizaron como fuentes de carbono insolubles: la cáscara de limón y el bagacillo de caña, y como fuentes de carbono solubles: el ácido galacturónico, glucosa, glicerol y pectina. Las concentraciones utilizadas se señalan en las figuras. El pH del medio se ajustó a pH 4.5 y se esterilizó a 121°C durante 20 min.

PREPARACION DEL INOCULO. La cepa se sembró por estria en PDA y se incubó a 29°C durante 72 horas. Después de este tiempo se mantuvieron los tubos a temperatura ambiente por 48 horas. Posteriormente fueron transferidas las esporas en agua destilada estéril hasta obtener una densidad óptica de 5.0 a 540 nm (Espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 21). El inóculo empleado fue de 0.75 ml por cada 100 ml de medio B.

PRODUCCION DE ENZIMAS. La producción de las pectinasas se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml del medio B con la fuente de carbono deseada. Los matraces se incubaron a 29°C con una agitación a 200 rpm en una agitadora rotatoria New Brunswick Scientific. Se tomaron muestras de 12.0 ml cada 24 horas durante 5 días. Las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a temperatura ambiente a 3500 rpm en una centrifuga clínica Solbat. A los filtrados libres de células se les determinó el pH y actividad de diferentes enzimas.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PECTINOLITICA.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE EXOPOLIGALACTURONASA. Esta actividad se determinó cuantificando los grupos reductores liberados de la pectina por medio del método del ác. 3,5-dinitro salicílico (DNS) (Miller, 1959). El ensayo se llevó a cabo en tubos de 20 X 180 mm, a los cuales se les agregó 1.0 ml de solución de

pectina cítrica al 0.9% en solución amortiguadora de acetatos 0.17M, pH 5.0 y 0.70 ml de la misma solución amortiguadora.

El sistema de ensayo fue preincubado a 45°C durante 5 minutos y después se agregaron 0.3 ml del filtrado libre de células, se agitaron y se mantuvieron incubados durante una hora. Posteriormente la reacción fue detenida adicionando 3 ml del reactivo de DNS y fueron incubados en baño María a ebullición durante 5 minutos. Después de enfriarse a temperatura ambiente se adicionaron 15 ml de agua agitando nuevamente. Los blancos de cada muestra se preparan de la misma manera excepto que el filtrado enzimático se adiciona después del reactivo de DNS. Se tomaron 5.0 ml de las muestras y blancos se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos y se leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 21. La concentración de grupos reductores se calculó interpolando la absorbancia del problema en una curva estándar de ácido galacturónico.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ENDOPOLIGALACTURONASA.

Esta actividad fue determinada por medio del cambio en la fluidéz relativa de una solución de pectina. Se utilizó un viscosímetro de Oswald, el cual fue incubado en un baño de agua a 30°C. Se adicionaron a un tubo 10 ml de una solución de pectina al 1% en buffer acetatos 0.2N a pH 4.2, el cual fue preincubado durante 10 minutos a 30°C. Al tiempo cero se adicionaron 0.5 ml del filtrado libre de células a la solución de pectina, se agitó vigorosamente la mezcla de reacción y de inmediato se adicionó al tubo ancho del 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 flujo de la solución al bajar por las líneas superior e inferior. La mezcla de reacción fue llevada nuevamente hasta la línea superior para determinar el segundo tiempo de flujo de la solución entre ambas líneas. Esta operación fue repetida 4 veces durante 10 minutos de tiempo de reacción. El blanco del sustrato y del agua se prepararon adicionando a un tubo 10 ml de la solución de pectina y a otro 10.0 ml de agua fueron preincubados a 30 °C en un baño de agua durante 10 minutos , agregándoles posteriormente 0.5 ml de agua a cada uno y se les midió el tiempo de flujo, obteniéndose un promedio de cuatro determinaciones en cada uno. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

Fr = Fluidéz relativa de cada tiempo de reacción.

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

Tw = Tiempo de flujo promedio del agua en segundos.

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

Tr = Tiempo de reacción desde la adición de la enzima al sustrato hasta cada inicio de la medición del tiempo de flujo en minutos.

Tn = Tiempo de reacción en minutos mas un medio del tiempo de flujo en minutos.

Con los valores obtenidos se calcula la fluidéz relativa para cada uno de los tiempos de reacción. Se grafican los valores de la fluidéz 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 fluidéz relativa de 0.1 por segundo en las condiciones de ensayo (Saval, 1985).

Una unidad de enzima endopoligalacturonasa se define como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.1 por segundo en la fluidéz relativa a 30°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aureobasidium sp. CH-M-1018 es un hongo levaduriforme que produce celulasas y xilanasas cuando se crece en bagacillo de caña como única fuente de carbono (Gilbón et al., 1986; Larios et al., 1982; Huitrón et al., 1984). Para evaluar si este microorganismo es capaz de producir pectinasas extracelulares en las condiciones de producción de celulasas y xilanasas, se cultivó al microorganismo en bagacillo de caña, en cáscara de limón (desecho que tiene un alto contenido de pectina), en celulosa microcristalina y en pectina cítrica, todos a una concentración de 1%. Las pectinasas fueron medidas como actividad endo-pectinolítica y actividad exo-pectinolítica. Los resultados se muestran en la Figura No. 1, se puede observar que *Aureobasidium* sp. produce ambas actividades pectinolíticas. En bagacillo de caña, se aprecia un perfil en donde la actividad fue aumentando hasta los 5 días de incubación, en cambio el perfil de producción de la exo-pectinasa aumenta hasta los 3 días y después se mantiene sin cambio. Cuando se utilizó cáscara de limón como fuente de carbono, el perfil de producción de endo-pectinasa aumenta hasta los 2 días de incubación y después se mantiene casi estable. De igual modo en pectina cítrica aumenta la misma actividad enzimática hasta los dos días de fermentación permaneciendo después constante, aunque el nivel de producción es menor que en bagacillo de caña y cáscara de limón. En celulosa microcristalina no hubo producción de endo-pectinasa.

Por lo que respecta a la producción de exo-pectinasa, el perfil de producción se incrementa hasta los 3-4 días de fermentación, tanto en bagacillo de caña como en pectina

cítrica. Cuando la fuente de carbono es la cáscara de limón, se incrementa la actividad durante las primeras 48 horas, permaneciendo constante hasta al final de los 5 días de incubación. A diferencia de los resultados obtenidos para la producción de endo-pectinasa, en celulosa microcristalina (CM), sí se detectó una baja actividad de exo-pectinasa, aumentando hasta el segundo día de incubación para disminuir prácticamente a cero en las siguientes horas. La mayor producción de esta actividad se obtuvo en bagacillo de caña, después en pectina, en cáscara de limón y por último en celulosa microcristalina.

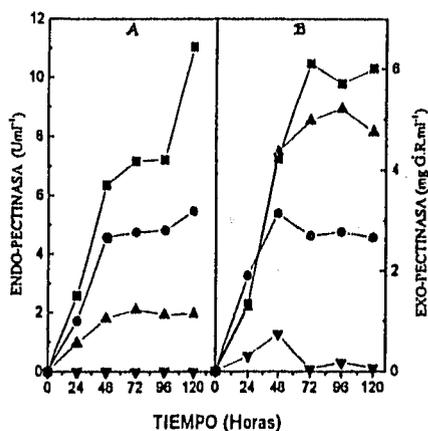


FIG. No. 1. Perfiles de producción de endo-pectinasa (A) y de exo-pectinasa (B) extracelulares de *Aureobasidium sp.* CH-M-1018 cultivado en el medio B conteniendo 1% de bagacillo de caña (■), 1% de cáscara de limón (●), 1% de pectina (▲) y 1% de celulosa microcristalina (▼).

En la Tabla No.2 se comparan las producciones máximas de endopectinasas y exopectinasas a dos concentraciones de sustrato. Como se puede observar los mayores rendimientos se encuentran con el bagacillo de caña de azúcar, pero no se detectan diferencias entre 1% y 2%. En cáscara de limón al 1% se obtiene aproximadamente un valor 50% menor que en bagacillo de caña, en pectina solamente se produce alrededor de un 20% y en CM no se produce endopectinasa y sólo se produce el 10% de exo-pectinasa. En relación a la producción de exo-PG, la mayor se encuentra nuevamente en bagacillo de caña, después en pectina , cáscara de limón y por último en celulosa microcristalina (CM).

TABLA NO. 2. Producciones máximas de endo-PG y exo-PG en los diferentes sustratos utilizados.

SUSTRATO	ENDO-PG (U/ml)	EXO-PG (mg G.R./ml)
Bagacillo de caña 1%	11.3	6.0
Bagacillo de caña 2%	11.3	8.2
Cáscara de limón 1%	5.3	3.5
Cáscara de limón 2%	8.3	4.7
Pectina 1%	2.0	5.2
Pectina 2%	2.8	5.8
Celulosa Microcristalina 1%	0.0	0.9

Estos resultados demuestran que *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 produce tanto endopectinasas como exopectinasas extracelulares en las diferentes fuentes de carbono probadas, cuando se cultivó en las mismas condiciones físicas y químicas optimizadas para la producción de celulasas y xilanasas (Larios y Huitrón, 1981). Llama la atención el hecho de

que el mayor rendimiento de endo-pectinasas no se haya obtenido en pectina, sino en bagacillo de caña de azúcar, pues la pectina es un sustrato comunmente utilizado para la obtención de pectinasas. Sin embargo, se ha observado que algunos microorganismos cuando se cultivan en desechos agroindustriales producen una mayor actividad endopectinolítica que cuando se cultivan en pectina (Larios y Huitrón, 1989).

Tomando en cuenta que las condiciones de cultivo al emplearse el bagacillo de caña de azúcar, son las mejores para la obtención de xilanasas y celulasas extracelulares y son iguales a las utilizadas en este trabajo, en donde se obtuvo la mayor producción de pectinasas, se concluye que hay una biosíntesis simultánea en *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 de tres sistemas multienzimáticos complejos. En algunas aplicaciones enzimáticas, como sería la bioconversión de biomasa a otros compuestos químicos solubles de interés práctico, es potencialmente ventajoso contar con extractos crudos con tres actividades importantes para una mayor degradación de los materiales celulósicos de desecho.

La característica de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 de producir los tres complejos multienzimáticos (celulolítico, xilanolítico y pectinolítico) cuando se cultiva en bagacillo de caña de azúcar, se debe muy probablemente a que el microorganismo fue aislado por nuestro laboratorio de una zona cañera donde se ha acumulado bagazo de caña por muchos años (Gilbón et al., 1981), lo que se puede interpretar como una selección natural de este microorganismo que ha ocurrido a través de décadas.

Existe una gran cantidad de microorganismos que producen pectinasas cuando se cultivan en pectina, entre los que encontramos a bacterias, levaduras y hongos (Fogarty & Kelly, 1983).

En general se ha observado que las pectinasas son inducibles en los microorganismos. Ward & Fogarty (1974) estudiaron los factores que afectan la producción de poligalacturonatoliasa de *Flavobacterium pectinovorum* y encontraron que ésta era inducible por la presencia de pectina o pectato de sodio. En contraste, la enzima proveniente de *Bacillus subtilis* fué constitutiva. *Athelia(Sclerotium) rolfi* produjo elevada actividad de poligalacturonasa cuando fue cultivada en un medio líquido conteniendo pectina como fuente de carbono (Scala & Zoina, 1983). Por otro lado, el pectato fué la mejor fuente de carbono para la producción de poligalacturonasa y polimetilpoligalacturonasa por *Aspergillus niger*, mientras que pectina como fuente de carbono inhibió completamente la producción de estas enzimas (Chopra & Metha, 1985).

Debido a estos resultados obtenidos con nuestra cepa *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 sobre la producción de pectinasas a partir de desechos celulósicos y con pectina, se decidió conocer más a fondo si realmente estas enzimas eran inducibles o si eran constitutivas y si eran sensibles a represión catabólica.

En la Fig. 2 se muestran los resultados obtenidos al cultivar a *Aureobasidium* sp. en medio B con dos concentraciones de bagacillo de caña (1 y 2%) y cuando se adicionó glucosa al 1% a este mismo sustrato. Se puede observar en esta figura que la producción de endo-pectinasa extracelular en ambas concentraciones del bagacillo de caña fue incrementándose durante la fermentación, alcanzando en el quinto día el mayor nivel de actividad que fue de 11 unidades/ml. Cuando se adicionó la glucosa desde el inicio de la fermentación, la síntesis de esta enzima se reprimió totalmente. De igual manera, cuando la glucosa se adicionó a las 24 horas, ya que la síntesis de la enzima se había iniciado, la

presencia del azúcar provocó una caída drástica de la producción (Fig. No. 2). La glucosa como única fuente de carbono no permitió la síntesis de esta enzima. Estos resultados indican que la síntesis de endo-pectinasa es sensible a represión catabólica por glucosa, un fenómeno muy conocido que se presenta en la mayoría de los microorganismos, cuando se cultivan en presencia de dos azúcares alternativos, uno de los cuales es más fácilmente asimilable. En este caso la glucosa reprime la síntesis de las pectinasas y de esta manera evita la degradación de la pectina, hasta que se consume este azúcar.

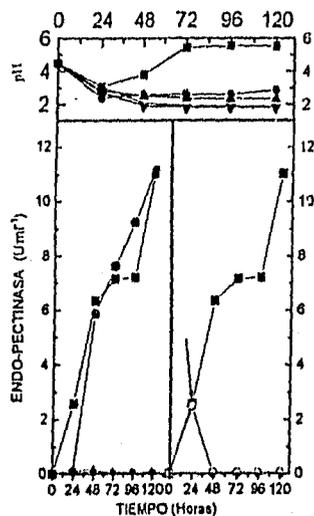


FIG No.2. Perfiles de producción de endo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 y de pH cuando el microorganismo se cultivó en medio B con bagacillo de caña 1% (●), al 2% (●), glucosa al 1% (▲), bagacillo de caña al 1% con glucosa al 1% adicionada al tiempo cero (▼), bagacillo de caña al 1% con glucosa al 1% adicionada a las 24 horas de fermentación (○).

Los resultados obtenidos para la producción de exo-pectinasa en las mismas condiciones anteriores se muestran en la Fig. No. 3, observándose que el rendimiento en bagacillo de caña al 2% fue mayor que el obtenido al 1%. Por lo que respecta a los resultados cuando se cultivó en glucosa, se ve que adicionada al tiempo cero permitió la síntesis de un 24% de enzima aproximadamente en relación al control de bagacillo de caña al 1%. De la misma forma cuando se adicionó el azúcar a las 24 horas, la síntesis de exo-pectinasa continúa por 24 horas más y posteriormente declinó la producción. Esto nos indicaría que la síntesis de la exo-pectinasa es menos sensible a la represión por glucosa o que existen varias enzimas, una o algunas de las cuales no son sensibles a represión catabólica.

La multiplicidad de enzimas es un fenómeno que se presenta con cierta frecuencia en estos sistemas multienzimáticos complejos. *Clostridium* sp. y *Pseudomonas* producen varias enzimas pectinolíticas algunas son constitutivas y otras inducibles, pero no existe información acerca de su regulación (Kelly & Fogarty, 1978; Hildebrand, 1972). Múltiples formas de diferentes enzimas pectinolíticas también han sido reportadas para *Aspergillus awamori* y *Aspergillus foetidus* (Zetalaki-Horváth & Békassy-Molnar, 1973; Zetalaki-Horváth, 1978).

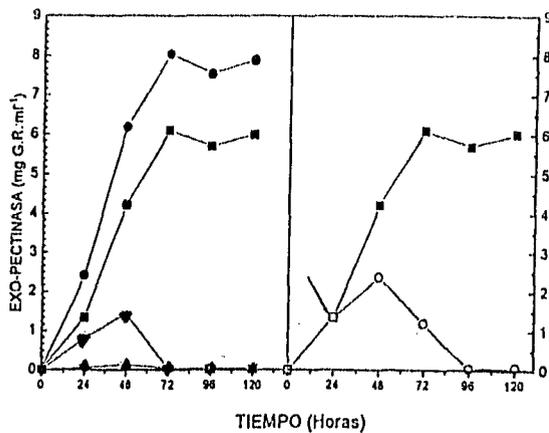


FIG. No.3. Perfiles de producción de exo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en el medio B con bagacillo de caña al 1% (■), al 2% (●), glucosa al 1% (▲), bagacillo de caña al 1% con glucosa al 1% adicionada al tiempo cero (▼), bagacillo de caña al 1% con glucosa al 1% adicionada a las 24 horas de fermentación (□)

Cuando la cáscara de limón fué la fuente de carbono utilizada para la producción de estas enzimas se observó también un incremento con respecto a la concentración de este desecho de un 35% mas de la endopectinasa en la concentración de 2%. La diferencia en la producción de la exo-pectinasa no fue tan marcada. Tal como sucedió en bagacillo de caña, la adición de glucosa al inicio de la fermentación no permitió la síntesis de la endo-pectinasa; cuando se adicionó a las 24 horas, la endo declinó rápidamente mientras que la producción de la exo- no se modificó y alcanzó el mismo rendimiento que el control. La glucosa adicionada al tiempo cero afecta en un 50% la síntesis de la exo (Figs. 4 y 5).

La producción de la endo-pectinasa por *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en pectina fue la más baja y la diferencia entre las dos concentraciones usadas no fué tan marcada. Sin embargo, la pectina fué mejor fuente de carbono para la inducción de la exo-pectinasa que la cáscara de limón y no se observaron grandes diferencias entre las dos concentraciones de pectina usadas. La glucosa, igual que en los dos casos anteriores, resultó ser un fuerte represor de la síntesis de ambas enzimas cuando se adicionó al tiempo cero.

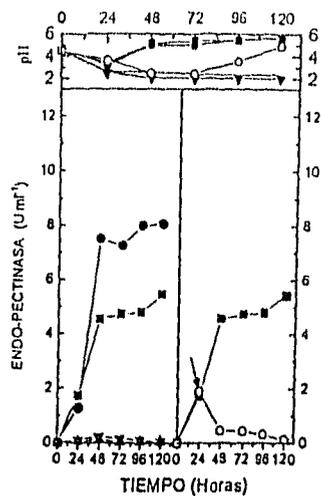


FIG. No. 4. Perfiles de producción de la endo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 y de pH del medio B con cáscara de limón al 1% (□), al 2% (●), glucosa al 1% (▲), cáscara de limón al 1% con glucosa al 1% adicionada al tiempo cero (▼) y con glucosa al 1% adicionada a las 24 horas de fermentación (○).

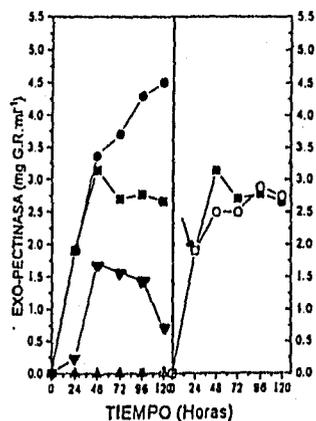


FIG. No. 5. Perfiles de producción de exo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B conteniendo cáscara de limón 1% (□), 2% (●), glucosa 1% (▲), cáscara de limón 1% con glucosa 1% adicionada al tiempo cero (▼) y con glucosa adicionada a las 24 horas (○).

Cuando la adición ocurrió a las 24 horas de iniciada la fermentación, la síntesis de la endopectinasa se detuvo y disminuyó lentamente, en cambio la síntesis de la exopectinasa se detuvo durante 24 horas y se restableció después aunque nunca alcanzó el nivel del control de pectina sola al 1% (Figs. No. 6 y 7).

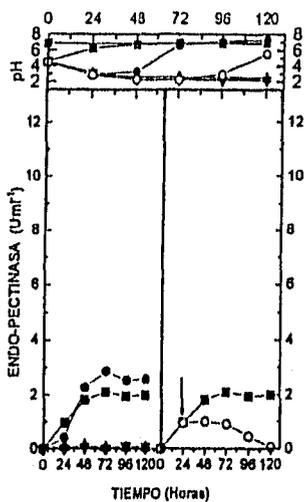


FIG. No. 6. Perfiles de producción de la endo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 y de pH del medio B con pectina 1% (●), 2% (◐), glucosa 1% (▲), pectina 1% con glucosa al 1% adicionada al tiempo cero (▼), con glucosa al 1% adicionada a las 24 h de fermentación (○).

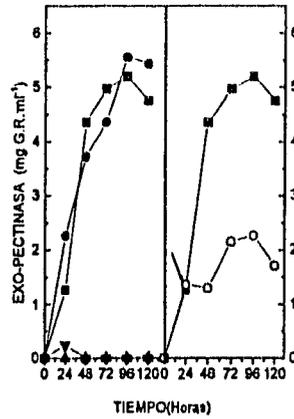


FIG. No. 7. Perfiles de producción de exopectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B con pectina 1% (■), al 2% (●), glucosa al 1% (▲), pectina al 1% con glucosa 1% adicionada al tiempo cero (◆), pectina al 1% con glucosa 1% adicionada a las 24 horas de fermentación (○).

En los tres casos se mostró que la glucosa al 1% no permite la síntesis ni de endo- ni de exo-pectinasa. También se cultivó al microorganismo en una concentración de glucosa al 2% pero tampoco hubo producción de enzimas (datos no mostrados).

Es ampliamente conocido que la glucosa reprime catabólicamente la síntesis de enzimas que hidrolizan fuentes de carbono alternas y aunque el mecanismo no es totalmente conocido en eucariotes, el efecto negativo de esta fuente de carbono sobre las enzimas hidrolíticas está bien fundamentado (Fogarty & Kelly, 1983). Shimmyo et al., (1978) reportaron que una mutante auxotrófica para adenina de *Aspergillus niger*, produce una poligalacturonasa inducible y sensible a represión catabólica y que la represión por glucosa fué total. Ya que el mensajero fue muy estable, se supone que el efecto tuvo lugar a nivel de traducción. Ha sido también reportado que la síntesis de endopoligalacturonasa en *Pyrenochaeta terrestris* es reprimida cuando un medio con pectina es suplementado con glucosa u otras hexosas en concentraciones de 0.05M pero es estimulada en concentraciones de 0.005M (Keen & Horton, 1966). *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium expansum* producen poligalacturonasa y endopolimetilgalacturonato liasa y la formación de estas enzimas es reprimida por diferentes azúcares (Spalding et al., 1973).

En la literatura y en nuestra propia experiencia hemos observado que el glicerol es una fuente de carbono que puede reprimir la síntesis de pectinasas y de otras enzimas hidrolíticas, tanto en *Streptomyces* como en *Aspergillus* sp. (Flores, et. al., 1993; Solís et al, 1993). Por lo tanto fué de nuestro interés determinar si esta fuente de carbono también reprimía la síntesis de la endo- y exo-pectinasas en *Aureobasidium* sp. CH-M-1018. Los resultados obtenidos al adicionar 1% de glicerol a diferentes tiempos de la

fermentación a un medio conteniendo bagacillo de caña al 1%, cáscara de limón al 1% y pectina al 1% se muestran en las siguientes figuras. Se puede observar que la adición de glicerol al tiempo cero afectó negativamente, tanto a la biosíntesis de la actividad endo- como de la actividad exo-pectinolítica, independientemente de la fuente de carbono utilizada (Figs. 8-13). Hay que resaltar que la regulación por el glicerol sobre la exopectinasa fue mucho más marcada que la ejercida por la glucosa. El glicerol utilizado como única fuente de carbono no permitió la síntesis de estas enzimas al igual que la glucosa.

El mecanismo por medio del cual actúa el glicerol es hasta la fecha desconocido y es independiente del efecto ejercido por glucosa, al menos en *Streptomyces kanamyceticus*, microorganismo productor de amilasa y kanamicina (Flores et al., 1993).

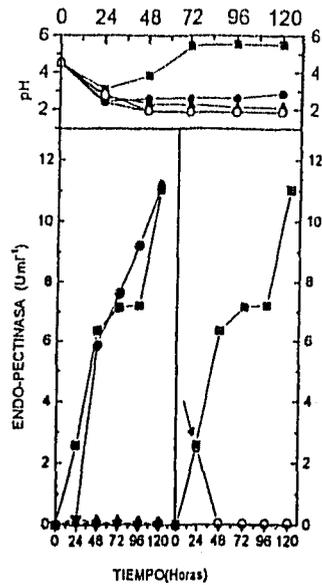


FIG. No. 8. Perfiles de producción de endopectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B conteniendo bagacillo de caña 1% (■), 2% (●), glicerol 1% (▲), bagacillo de caña 1% con glicerol 1% adicionado al tiempo cero (▼) y con glicerol 1% adicionado a las 24 h de fermentación (◐).

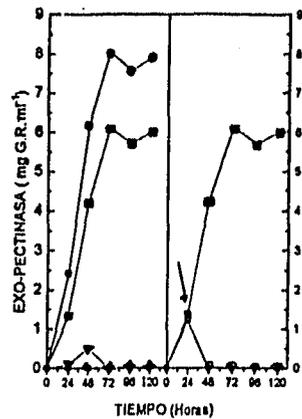


FIG. No. 9. Perfiles de producción de exo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en bagacillo de caña 1% (■), 2% (●), glicerol 1% (▲), bagacillo de caña 1% con glicerol al 1% adicionado al tiempo cero (▼) y con glicerol 1% adicionado a las 24 h de fermentación (◐).

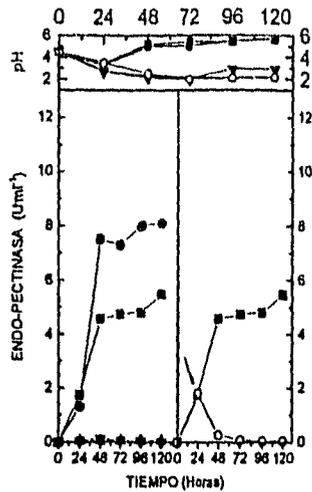


FIG: No. 10. Perfiles de producción de endo-pectinasa de *Aureobastidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B con cáscara de limón al 1% (■), 2% (●), glicerol al 1% (▲), cáscara de limón al 1% con glicerol al 1% adicionado al tiempo cero (▼) y con glicerol al 1% adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

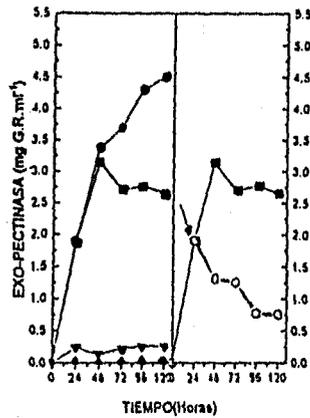


FIG. No. 11. Perfiles de producción de la exo-pectinasa de *Aureobastidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B con cáscara de limón al 1% (■), al 2% (●), glicerol al 1% (▲), cáscara de limón al 1% con glicerol al 1% adicionado a las cero horas (▼) y con glicerol 1% adicionado a las 24 horas (○).

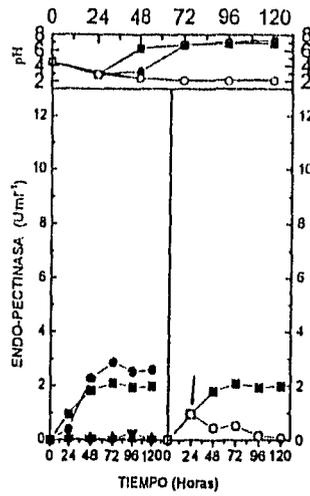


FIG. No. 12. Perfiles de producción de la endo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B con pectina al 1% (■), al 2% (●), glicerol al 1% (▲), con pectina al 1% con glicerol al 1% adicionado al tiempo cero (▼) y con glicerol adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

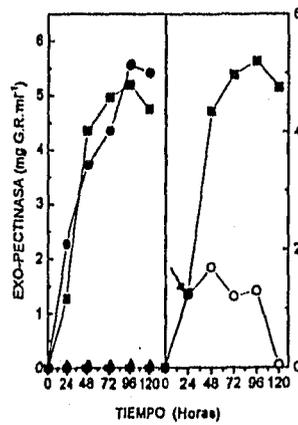


FIG. No. 13. Perfiles de producción de exo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B con pectina al 1% (■), al 2% (●), glicerol al 1% (▲), pectina al 1% con glicerol al 1% con glicerol al 1% adicionado al tiempo cero (▼) y con glicerol al 1% adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

El ácido galacturónico es uno de los productos finales de la hidrólisis de la pectina y se ha reportado que puede causar represión de las enzimas pectinolíticas en diversos microorganismos. Por otro lado, también se ha demostrado que el ácido galacturónico puede actuar como inductor de estas mismas enzimas, probablemente generando por reacciones de transglicosilación, los di o tri-oligómeros que son los inductores reales (Phaff, 1974). Con objeto de establecer si este compuesto tenía uno o varios efectos sobre la síntesis de las pectinasas de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, se adicionó al medio de cultivo a una concentración de 1% como en los casos mencionados anteriormente.

En primer lugar se adicionó el ácido galacturónico al 1% sobre el medio de cultivo con bagacillo de caña de azúcar. Los resultados obtenidos de la producción de la endo-pectinasa se muestran en la Figura No. 14 y se puede observar que este compuesto reprimió la síntesis de esta enzima en un 80% cuando se adicionó al tiempo cero. Por el contrario cuando se agregó a las 24 horas de fermentación afectó ligeramente la producción de endo-pectinasa retrasándola 24 horas para después sobreponerse y casi igualar al control de bagacillo al 1% solo. Por lo que respecta a la exo-pectinasa, la adición del galacturónico al tiempo cero permitió la síntesis de esta enzima en un 85% aproximadamente con respecto al control (Fig. no. 15). Sorprendentemente, la adición a las 24 horas tuvo un efecto estimulador de la producción de la exo-pectinasa, superando el rendimiento final al control en un 40%.

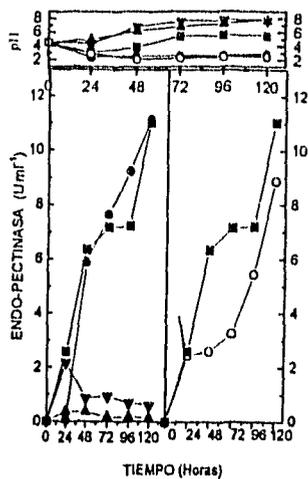


FIG. No. 14. Perfiles de producción de endo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 y de pH del medio B con bagacillo de caña al 1% (■), al 2% (●), ác. galacturónico al 1% (▲), bagacillo de caña al 1% con ác. galacturónico al 1% adicionado al tiempo cero (▼) y con ác. galacturónico al 1% adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

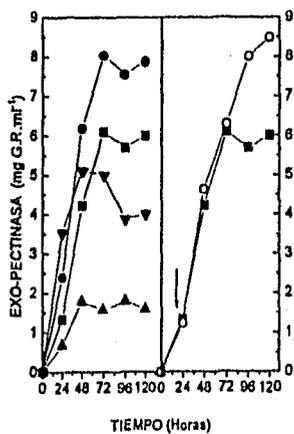


FIG. No. 15. Perfiles de producción de exo-pectinasas de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B con bagacillo de caña al 1% (■), al 2% (●), ác. galacturónico al 1% (▲), con bagacillo de caña al 1% con ác. galacturónico al 1% adicionado al tiempo cero (▼), con ác. galacturónico al 1% adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

Cuando se utilizó cáscara de limón como fuente de carbono inductora, la adición de este compuesto al inicio de la fermentación reprimió la síntesis de la endo-pectinasa en un 75% y la adición a las 24 horas tuvo un efecto positivo sobre la producción de esta enzima (Fig. No. 16). Los resultados obtenidos para la exo-pectinasa mostraron que no hay efecto represor cuando se adicionó al tiempo cero y cuando se adicionó a las 24 h nuevamente se encontró que la producción alcanzó casi el doble comparado contra el control de cáscara de limón sola al 1% (Fig. No. 17).

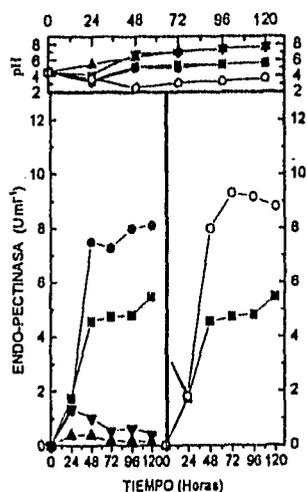


FIG. No. 16. Perfiles de producción de endo-pectinasa de *Aureobastidium* sp. CH-M-1018 y del pH del medio B con cáscara de limón al 1% (●), al 2% (◐), ácido galacturónico al 1% (▲), cáscara de limón al 1% con ácido galacturónico al 1% adicionado al tiempo cero (▼) y con ácido galacturónico al 1% adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

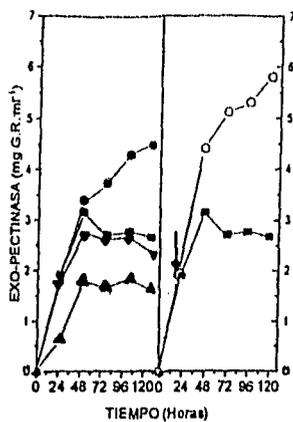


FIG. No. 17. Perfiles de producción de exo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B con cáscara de limón al 1% (■), al 2% (●), ácido galacturónico al 1% (▲), cáscara de limón al 1% con ácido galacturónico al 1% adicionado al tiempo cero (▼), con ácido galacturónico al 1% adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

En el caso en que se usó pectina 1% como fuente de carbono, la adición del ácido galacturónico al tiempo cero no afectó la producción de la endo-pectinasa, pero se incrementó 8 veces el rendimiento cuando se adicionó a las 24 horas (Fig. No. 18). Con respecto a la actividad de exopectinasa, la presencia de este compuesto en el medio de cultivo desde el inicio de la fermentación disminuyó la producción de la exopectinasa de 5.2 mg de grupos reductores por mililitro a 3.86 mientras que si se adicionaba a las 24 horas estimuló 19% la síntesis de esta enzima (Fig. No. 19).

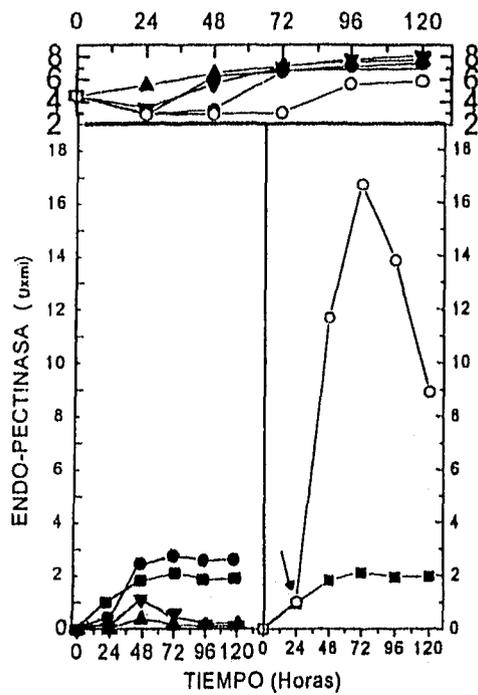


FIG. No. 18. Perfiles de producción de endo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 y de pH del medio B conteniendo pectina al 1% (■), al 2% (●), ác. galacturónico al 1% (▲), pectina al 1% con ác. galacturónico al 1% adicionado al tiempo cero (◆) y con ác. galacturónico al 1% adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

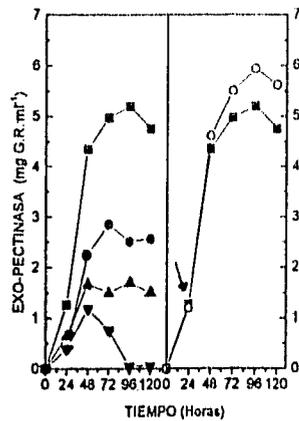


FIG. No. 19. Perfiles de producción de exo-pectinasa de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 cultivado en medio B con pectina al 1% (■), al 2% (●), ácido galacturónico al 1% (▲), pectina al 1% con ácido galacturónico al 1% adicionado al tiempo cero (▼) y con ácido galacturónico al 1% adicionado a las 24 horas de fermentación (○).

El ác. galactúronico como única fuente de carbono indujo la síntesis de endopectinasa en un nivel de 10-15%, mientras que en esta misma fuente de carbono la exopectinasa se indujo en un nivel mayor, de 25, 60 y 30% con respecto a los controles en bagacillo, cáscara de limón y pectina. al 1%.

Los resultados con bagacillo de caña nos indican que las enzimas endopectinolíticas que se sintetizan en esta fuente de carbono, se reprimen cuando el ác. galacturónico se adiciona al inicio de la fermentación y no se estimula su producción al agregarse a las 24 horas después de iniciada ésta. Sin embargo el comportamiento fué diferente en pectina o cáscara de limón, donde se observa una estimulación considerable. Por otro lado la producción de las exo-pectinasas se regulan aparentemente de la misma manera independientemente de la fuente de carbono utilizada, ya que la presencia del galacturónico desde el inicio de la fermentación, prácticamente no afecta la producción y ésta si se ve estimulada cuando se adicionó a las 24 horas.

A la fecha se desconoce cuales son los inductores directos de las enzimas pectinolíticas en hongos, sin embargo se ha observado que el ác. galacturónico induce la síntesis de endopoligalacturonasas y endopectintranseliminasa en *Verticillium albo-atrum* y de endopoligalacturonasa en *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (Aguilar & Huitrón, 1987). Por otro lado, D-galactarato (ác. múcico) parece estimular la producción de poligalacturonasa y pectinesterasa en *Penicillium chrysogenum* (Phaff, 1974)). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el ác. galacturónico estimula la producción tanto de la endo- como de la exo-pectinasa en *Aureobasidium* sp. CH-M-1018. Aunque no se ha demostrado que sea esta estimulación una inducción, nos inclinamos a pensar que así es por los antecedentes en otros hongos productores de pectinasas (Aguilar & Huitrón, 1987).

CONCLUSIONES.

- 1.- El hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 que es celulolítico verdadero, produce endo-pectinasas y exo-pectinasas extracelulares en un medio mínimo con pectina o materiales celulósicos que la contienen.
- 2.- Las enzimas pectinolíticas que produce *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, solo se biosintetizan cuando se cultivan en presencia de una fuente de carbono que contiene pectina.
- 3.- La mayor producción de endo-pectinasas como de exopectinasas se obtiene en bagacillo de caña al 2%.
- 4.- La glucosa adicionada a una fuente de carbono inductora afecta negativa y drásticamente la síntesis de la endo-pectinasa.
- 5.- El efecto negativo de la glucosa en la síntesis de la exo-pectinasa varía con la fuente de carbono utilizada.
- 6.- El glicerol afecta negativamente la síntesis tanto de la endo- como de la exo-pectinasa independientemente de la fuente de carbono utilizada.
- 7.- El ácido galacturónico adicionado al tiempo cero de la fermentación tiene un efecto negativo sobre la síntesis de la endo-pectinasa independiente de la fuente de carbono.
- 8.- El ácido galacturónico tiene un ligero efecto negativo sobre la síntesis de la exo-pectinasa cuando se adicionó desde el inicio de la fermentación.
- 9.- El ácido galacturónico como única fuente de carbono no permite la síntesis de la endo-pectinasa mientras que induce la síntesis de las exo-pectinasas.
- 10.- El ácido galacturónico adicionado a las 24 horas después de iniciada la fermentación ejerce un efecto positivo causando una mayor producción de exo-pectinasas independientemente de la fuente de carbono utilizada. En cambio no tiene efecto positivo en la producción de actividad endopectinolítica cuando se adicionó a las 24 horas al medio con bagacillo de caña, pero si hubo efecto positivo claro cuando se adicionó a las 24 horas al medio con pectina (P) y cáscara de limón (CL).

BIBLIOGRAFIA:

- Aguilar, G. y Huitrón, C. (1987). *Enzyme and Microbial Technol.* 9: 690-696.
- Atallah, M.T. y Nagel C.W. (1977). *Journal of Food Biochemistry* 1.
- Beguin, P. y Aubert, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 13: 25-58.
- Beldman, G., Rambout, F.M., Voragen, A.G. y Pilnik, W. (1984). *Enzyme and Microbial Technol.* 6: 503.
- BeMiller, J.N. (1986). In: *Chemistry and function of pectins.* Fishman, M.L. and J.J. Jen (Eds.) American Chem Soc. Symposium Series, 2.
- Bridge, C. W. (1959). *Mycopathol, Mycol. Applied* 12: 1.
- Carunchio, V., Girelli, A.M., Sinibaldi, M. y Tarolla, A.M. (1988). *Chromatographia* 25: 870.
- Chopra, S. y Metha, P. (1985). *Folia Microbiologica (Prague)* 3: 117.
- Courtois, J.E., Percheron, F. y Foglietti, M.J. (1968). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris, Serie D.*, 266: 164.
- Dean, R.A. y Timberlake, W.E. (1989). *The plant Cell.* 1: 275.
- Devdariani, T.G., Aizenberg, V.L., Bilai, T.I., Zakordonets, L.A., Mudzhiri, L.A. y Kvesitadze, G.I. (1982). *Pectolytic enzymes produced by Penicillium and Fusarium micromycetes.* Plenum Publishing Corp. Trans.
- Ensminger, A.H., Ensminger, M.E., Konlande J.E. y Robson, J.R.K. (1994). *Foods and Nutrition Encyclopedia.* 2nd. (Ed.) CRC PRESS 2: 1300, 2062.
- Farnell, R.G.W. (1924). *Intern. Sugar J.* 26: 48, 420.
- Feniksova, R.V. y Moldabaeva, R.R. (1967). *Appl. Microbiol. and Biochemistry* 3: 283.
- Finkelman, M.J. y Zajic, J.E. (1978). *Dev. Ind. Microbiol.* 46: 459-464.
- Flores, M.E., Ponce, E., Rubio, M. y Huitrón, C. (1993). *Biotechnol. Letts* 15: 595.
- Fogarty, W.M. y Kelly, C.T. (1983). En: *Microbial Enzymes and Biotechnology.* Fogarty, W.M. (Ed.) Applied Science Pubs. London. pp. 131.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Foglietti, M.J., Levaditou, V., Courtois, J.E. y Chararas, C. (1971). Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des Ses Filiales. 165: 1019.
- García, K. (1983). Tesis Profesional, Facultad de Química, UNAM.
- Gerhartz, W. (1990). Enzymes in Industry Production and Applications. Gerhartz, W. (Ed.) VCH Publishers, N.Y. (USA) 4: 126-128.
- Gilbón, A., Larios, G. y Huitrón, C. (1981). Rev. Tecnol. de Alimentos 16: 16.
- Gilbón, A., Huitrón, C., González Farías, F. y Ulloa, M. (1986). Mycologia 78: 804.
- Hatanaka, C. y Ozawa, J. (1969). Agr. Biol. Chem. 33: 116.
- Hildebrand, D.C. (1972) En: Proc. of the Third Int. Congress on Plant Pathogenic Bacteria. Geesteranus, H.P.M. (De.), p. 331.
- Huitrón, C., Saval, S. y Acuña, M.E. 1984. Annals Of the N. Y. Acad. Sciences. 434: 110.
- Ilezuk, Z. (1976). Acta Microbiologica Polonica 25: 401-411.
- Keen, N.T. y Norton, J.C. (1966). Can. J. Microbiol. 12: 443.
- Kelly, C.T. y Fogarty, W.M. (1978). Can J. Microbiol 24: 1164.
- Kertsz, Z.I. (1951). En: The pectic substances. Interscience Pub. N.Y. p. 378.
- Kilara, A. (1982). Process Biochemistry 35: 41.
- Larios, G. y Huitrón, C. (1981). Rev. Tecnol. de Alimentos (Méx.). 16: 24.
- Larios, G., Gilbón, A., Lara, Y. y Huitrón, C. (1982). Enzyme Engineering 6: 353
- Larios, G. y Huitrón, C. (1989). Biotechnol. Lett. 11: 729-734.
- Leuchtenberger, A., Friese, E. y Ruttloff, H. (1989). Biotechnol. Letts. 11: 255.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Luh, B.S., Phaff, M.J. (1951). Archives of Biochemistry and Biophysics 33: 212.
- McComb, E.A. y Mc Cready, R.M. (1957) Analytical Chemistry, 29: 819.
- Maldonado, M.C., Navarro, A. y Calliery, D. 1986. Biotechnol. Letts. 8: 501.

- Manachini, P.L., Parini, C. y Fortina, F.G. (1988). *Enzyme and Microbial Technol.* **10**: 682.
- Mah, R.A. y Hungate, R.E. (1965). *The journal of Protozoology* **12**: 131.
- Martin, L.F. (1965). En: *Principios de Tecnología azucarera*. Hong, P (Ed.) Continental, S.A. **6**: 173-187.
- Miller, G.L. (1959). *Analytic Chem.* **31**: 426-428.
- Newbold, R. y Joslyn, M.A. (1952). *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists.* **35**: 872.
- Nyeste, L. y Holló, J. (1963). *Food Research* **18**: 57.
- Phaff, H.J. (1974). *Arch. Biochem.* **13**: 67.
- Patel, R.N. y Ray, R.M. (1994). *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* **10**: 599.
- Pilnik, W. (1982). *Proc. Inter. Symp. Use of enzymes in Food Technology*. Versalles, France. pp. 425.
- Pilnik, W., Rombouts, F.M. y Voragen, A.G.J. (1973) *Chemie, Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel*, **2**: 122.
- Pilnik, W. Y Rombouts, F.M. (1981). En: *Enzymes and Food Processing*. Birch, G., Blakebrough, N. y K.J. Parker (Eds.) Applied Science Pubs. London **6**: 105.
- Porwal, S. y Chakravarli, B. (1970). *Acta Phytopathologica.* **5**: 327.
- Saval, S. (1985). Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM.
- Scala, F. y Zoina, A. (1983). *Annali de lla Facolta di Scienze Agrarie de lla Universita degli Studi di Napoli, Portici.* **17**: 122.
- Schultz, T.H. (1956). *Methods in Carbohydrate Chemistry*. (Ed) Academic Press. **5**: 38.
- Shinmyo, A., Davis, I.K., Nomoto, F., Tahara, T. y Enatsu, T. (1978). *Eur. J. of Appl. Microbiol.* **5**: 59.
- Spalding, D.H. y Abdul-Baki, A.A. (1973). *Phytopathology* **63**: 231.
- Solís, S. Favela, E. Viniegra, G. y Gutiérrez, M. (1993). *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **39**: 36.

- Tuttobello, R. y Mill, P.J. (1961). *Biochemical Journal* 79: 51.
- Vasv, S. (1967). *Revue Roumaine de Biochimie*. 4: 67.
- Voragen, A.G.J. y Pilnik, N. (1969). Pektin depolymerasen. *Mitt. Laborat Lebensmittel Chemie und Lebensmittel Mikrobiologie Landwirtschaft. Hochschule Wageningen*.
- Ward, O.P. y Fogarty, W.M. (1974). *Appl. Microbiol.* 27: 346.
- Whitaker, J.R. (1984). *Enzyme and Microbial Technol.* 6: 341.
- Whitaker, J.R. (1990). En: *Microbial enzymes and Biotechnology*. 2nd. Edition. Fogarty, W.M. y C.T. Kelly (Eds.) Academic, Press. 4:133-176.
- Zetelaki-Horváth, K. Y Békassy-Holnár.E. (1973). *Biotechnol. and Bioeng.* 15: 163.
- Zetelaki-Horváth, K. (1978). *Acta Alimentaria* 7: 209.