

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES

**EFFECTO DEL pH E INHIBIDORES DE LA
GLICOSILACION SOBRE LA SECRECION DE
PECTINASAS DE *Aspergillus* MGM-180.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A:
BIOL. LUIS DELGADO OLIVARES.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO D. F.

1997



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.

Agradecimientos

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

Dr. Guillermo Aguiar Osorio

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Dr. Fernando Montiel Aguirre

por sus valiosos comentarios, aportaciones y tiempo dedicado en el desarrollo de este trabajo.

Gracias al jurado formado por:

Dr. Ignacio Magaña Plaza

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Dr. Fernando Montiel Aguirre

Dr. Leobardo Serrano Carreón

por su tiempo dedicado a la eficiente revisión del trabajo.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de Dr. Guillermo Aguilar Osorio, contando con beca de CONACYT.

Agradecimientos

Agradezco especialmente al Dr. Guillermo Aguilar por su asesoría y paciencia durante la realización de este trabajo, a Blanca Trejo por su gran ayuda y sus valiosos comentarios. Gracias a ambos por brindarme su amistad y apoyo en los momentos difíciles.

Agradezco también a mis compañeros de laboratorio: Blanca Rosa, Matry, Berenice, Norma Oviedo, Leonardo y Marco por hacer más grata mi estancia en el laboratorio. Especialmente a Norma Camacho por su invaluable amistad.

A mis amigos compañeros: Veronica, Diana, Rosa, Romina, Lupita, Antonia, Nidia, Lulu, Maura, Dagoberto, Raul, Nahbi, Heremino y Enrique, por sus constantes consejos y estímulos para continuar.

Agradecimientos

A la memoria de mi madre con cariño y admiración.

A mi padre por su comprensión y ayuda en todo momento.

A mi hermana y su esposo por su presencia.

**No te quedes inmóvil
al borde del camino
no congeles el júbilo
no quieras con desgana
no te salves ahora
ni nunca
no te salves...**

Mario Benedetti

CONTENIDO.

Resumen.....	vii
CAPITULO 1.	
INTRODUCCION.....	1
Modificaciones postraduccionales.....	6
Glicosilación.....	7
Tipos de glicosilación.....	9
Función de la glicosilación.....	8
Inhibidores de la glicosilación.....	9
Hongos filamentosos.....	11
<i>Aspergillus</i>	12
Pectinasas.....	13
OBJETIVO.....	17
Estrategia de trabajo.....	17
CAPITULO 2.	
MATERIALES Y METODOS.	
Microorganismo.....	21
Medios y condiciones de cultivo.....	21
Actividad pectinolítica.....	22
Electroforesis desnaturalizante y actividad pectinolítica <i>in situ</i>	23
Rompimiento celular.....	24
Selección de la cepa de <i>Aspergillus</i>	24
Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa y la tunicamicina.....	25
Métodos analíticos.....	26
Determinación del pH intracelular.....	26
CAPITULO 3.	
RESULTADOS Y DISCUSION.	
Selección del microorganismo.....	27
Efecto del pH sobre el crecimiento de <i>Aspergillus</i> MGM-180 y la secreción de pectinasas.....	30
Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa.....	36
Efecto de la tunicamicina.....	42
CAPITULO 5.	
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS.....	50

RESUMEN

La producción de los diversos metabolitos de origen microbiano, incluyendo las enzimas, se encuentra afectada por las condiciones de cultivo, en particular por el pH del medio, el cual también puede modificar la fisiología celular, alterando la permeabilidad y potencial de la membrana plasmática, el pH interno, la expresión genética y la síntesis de proteínas. Los diversos estudios sobre el efecto que el pH del medio tiene sobre la fisiología y la producción de metabolitos microbianos han sido realizados en bacterias, en condiciones de pH óptimas para su crecimiento, existiendo poca información acerca de del efecto del pH en otros microorganismos y sobre todo, cultivados en condiciones extremas. Por lo que resulta interesante evaluar la respuesta de los hongos filamentosos cultivados en condiciones de estrés por pH debido a que estos microorganismos, tales como *Aspergillus*, son los principales productores de enzimas a nivel industrial, además de que tienen la capacidad de crecer en un amplio rango de pH, y sobre todo en condiciones ácidas, como ha sido reportado para *Aspergillus nidulans*, el cual es capaz de crecer en un medio con un valor de pH tan ácido como 3.5 ó tan alcalino como 9.0.

Este proyecto pretende evaluar el efecto que el pH del medio tiene sobre el pH interno y las modificaciones postraduccionales, específicamente la glicosilación, tratando de establecer cual es la relación entre éstos y la secreción proteica tomando como modelo de estudio a las enzimas pectinolticas. Debido a que en nuestro grupo contamos con cincuenta y dos cepas del genero *Aspergillus*, decidimos seleccionar aquella sobre la cual el efecto del pH del medio fuese mayor. Con este fin las diferentes cepas fueron cultivadas en medio sólido a pH de 2.5 y 3.5. Bajo estas condiciones un alto número de estos microorganismos creció a pH de 2.5, de los cuales la mayoría presentó alta actividad pectinolitica (determinada como halo de hidrólisis), a este valor de pH. Sin embargo, sólo siete de estas cepas presentaron una alta actividad específica. De estas últimas, al ser cultivadas en medio líquido, sólo la cepa MGM-180 mostró un alto nivel de actividad.

En forma general, el crecimiento de *Aspergillus* MGM-180 al ser cultivado en diferentes valores de pH (2.5, 3.5 y 6.5), fue muy similar con excepción del obtenido a pH de 2.5, condición en la cual éste se redujo alrededor de un 70%, relación al obtenido a los otros valores de pH. Por otro lado, la producción de la endopectinasa estuvo afectada por el pH del medio, produciéndose

sólo en un intervalo de pH de 2.5 a 3.5, mientras que la exopectinasa fue producida en un rango de pH más amplio y su producción no cambió tan drásticamente como la de endopectinasa. Ambos tipos de actividad pectinolítica tuvieron su mayor producción a un valor de pH muy ácido (2.5), tanto en volumen como en unidades específicas de actividad, siendo a este valor de pH donde se obtuvo una reducción en el crecimiento de este microorganismo, lo que sugiere una gran eficiencia de la síntesis y/o secreción de estas enzimas a valores extremos de pH.

Cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado en un rango de pH de 3.5 a 7.0, el pH intracelular, se mantuvo entre 5.8 y 6.3, pero cuando el valor de pH del medio fue de 2.5, el pH intracelular tuvo un valor de 4.2. Este decremento en el pH interno correlacionó con un incremento de ambas actividades pectinolíticas, tanto exo como endo. El análisis electroforético correspondiente mostró una disminución en el número de proteínas extracelulares, conforme el pH del medio se acidificó, observando la presencia de una banda de proteína con una masa molecular de 48 kDa, la cual presentó actividad pectinolítica en las muestras que provenían de los cultivos de pH de 2.5 y 3.5, pero no se detectó dicha actividad en la muestra de cultivo de pH de 6.5.

La presencia de 2-desoxi-D-glucosa redujo la producción de la actividad exopectinolítica, mientras que el efecto sobre la actividad endopectinolítica pareció responder más a un efecto de represión catabólica, aunque no se observó ningún efecto de este inhibidor sobre la actividad exopectinolítica intracelular y la proteína extra e intracelular. El análisis electroforético correspondiente mostró dos bandas con actividad pectinolítica: la primera con una masa molecular de 48 kDa, la cual se produjo en las diferentes condiciones de cultivo, mientras que la segunda con una masa molecular de 45 kDa, se detectó únicamente cuando el microorganismo creció en presencia de 2-desoxi-D-glucosa. Por otro lado, la presencia de tunicamicina en el medio de cultivo modificó la actividad exopectinolítica cuando el pH del medio tuvo un valor de 2.5 y 3.5, pero no cuando el pH fue de 6.5.

CAPITULO

II

INTRODUCCION.

Los hábitats de los microorganismos son muy variados, y los diferentes factores ambientales que pueden afectar su desarrollo son la disponibilidad de agua y nutrientes, el pH, la temperatura, el oxígeno y la luz, los cuales juegan un papel importante en la proliferación de los microorganismos dictaminando el tipo de desarrollo y cantidad de éstos. Entre los diversos factores existe una interrelación muy estrecha y la variación de uno de éstos puede afectar la respuesta del microorganismo hacia los demás (Rose, 1977; Kozakiewicz and Smith, 1994). Cuando un microorganismo se enfrenta a un cambio ambiental y permanece por largo tiempo en dichas condiciones, éste puede sufrir una adaptación al nuevo ambiente (Myrold y Nason, 1992).

Los microorganismos dentro de la naturaleza crecen y se desarrollan en ambientes con diferentes rangos de pH. Aunque para su crecimiento requieren una concentración muy pequeña de iones hidrógeno, ya que altas concentraciones de este ion pueden ejercer un efecto tóxico o letal para ellos (Rose, 1997). Las bacterias en general son microorganismos neutrófilos que sobreviven dentro de un rango de pH de 5.0 a 8.5, exhibiendo un máximo de crecimiento cercano a la neutralidad. Existen, sin embargo, algunas excepciones a esta regla, entre las que se encuentran las bacterias de ácido acético y sulfúreas que oxidan azufre a ácido sulfúrico. Algunos microorganismos tienen la capacidad de crecer en ambientes ácidos, como pueden ser algunos suelos y lagos, en donde el pH se encuentra en un rango de 3.5 a 5.0, además de que pueden crecer muy bien a un valor de pH neutro, por lo que se les conoce como acidotolerantes. A los microorganismos que presentan un valor de pH óptimo

de crecimiento menor de 5.0, se les denomina acidófilos, como el caso de las arqueobacterias *Sulfolobus* y *Thiobacillus*, que son acidófilos obligados ya que sólo pueden crecer en un rango de pH de 1.0 a 4.0, con un óptimo entre 2.5 y 3.5 (Cobley y Cox, 1983; Brok, 1991). Los hongos filamentosos se desarrollan en un amplio rango de pH, sin embargo, en la mayoría de ellos su crecimiento se ve favorecido por los ambientes ácidos (Caddik, 1986).

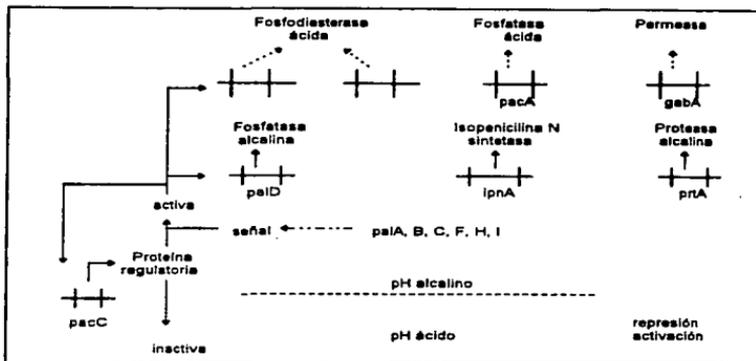


Figura 1. Esquema de regulación por pH, propuesto para algunas enzimas producidas por *Aspergillus nidulans* (Tilburn et. al., 1995).

El pH del medio en cual crece un microorganismo puede influir directamente en el tipo de metabolitos producidos, como es el caso de la fosfatasa ácida la cual sólo se produce cuando *Neurospora crassa* es cultivado a valores menores de 5.7 y la producción de la fosfatasa alcalina se obtiene si el pH de cultivo es superior a 7.4 (Nahas et. al., 1982). Arst y Orejas (1995) reportaron que en *Aspergillus nidulans* el pH actúa sobre cinco genes: *pacC*, el cual da origen a una proteína reguladora, que activa a los genes *paIA, B, C, H e I* los cuales a su vez dan lugar a proteínas que se producen en ambientes alcalinos, por ejemplo la fosfatasa alcalina, isopenicilina N sintetasa y la proteasa alcalina, reprimiendo además la síntesis de las

proteínas que se producen en medios ácidos, como la fosfatasa ácida, fosfodiesterasa ácida y la permeasa de GABA, pero cuando el medio es ácido la proteína reguladora se inactiva y por tanto los genes alcalinos se encontrarán reprimidos, y los genes ácidos se activarán (fig. 1).

El grado de acidez del medio puede modificar el potencial y permeabilidad de la membrana plasmática y el transporte de solutos (fig. 2) (Olson, 1993), además, ocasionar una alteración de los diversos procesos metabólicos y producir cambios a la morfología de un microorganismo, tal como ha sido observado en cultivo continuo de *Penicillium chrysogenum*, el cual al ser cultivado a un valor de pH por arriba de 6.0 la longitud de las hifas sufren una disminución, pero cuando el pH se eleva aproximadamente a 6.7, se forman pellas en lugar de hifas sueltas (Rose, A. H. 1997).

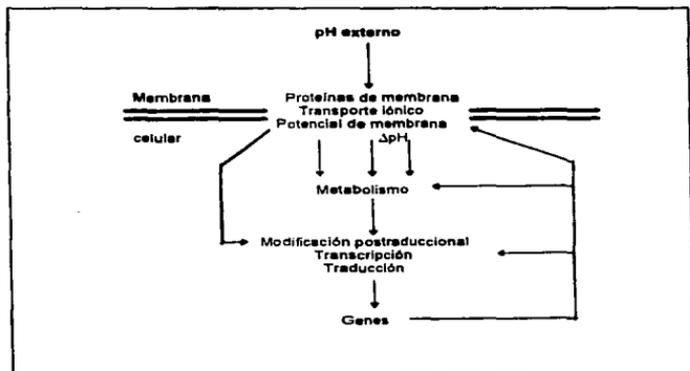


Figura 2. Efecto del pH extracelular, sobre diversos procesos fisiológicos (Olson, 1993).

Los cambios en el pH externo además pueden alterar el pH intracelular (pHi) lo que puede modificar los diversos procesos celulares, tales como las modificaciones postraduccionales,

debido a que el pH citoplasmático es cercano a la neutralidad, mientras que en algunos organelos membranosos como el complejo de Golgi, donde se llevan a cabo estas modificaciones es menor de 7.0, e incluso en algunos compartimientos, como las cisternas trans, el pH puede ser más ácido. Ha sido observado que algunas células que han sufrido alguna mutación en la que se daña su mecanismo de acidificación en estas cisternas se han observado ciertos problemas con el proceso de glicosilación de las proteínas, lo que implica que el bajo pH de las cisternas del aparato de Golgi es necesario para ésta función (Al-Awqati, 1986).

Existe una tendencia en las células a mantener el pH interno cerca de la neutralidad para la óptima actividad de las enzimas intracelulares (Brok, 1991). Booth (1985) reportó que los microorganismos acidófilos exhiben valores de pH intracelular en un rango de 6.5 a 7.0, mientras que en los neutrófilos el rango de pH interno es de 7.5 a 8.0 y los alcalófilos tienen valores de 8.4 a 9.0. Por ejemplo, *Aspergillus nidulans* puede crecer en un rango de pH externo de 3.5 a 9.0, mientras que el pH interno varía de 5.6 a 6.0 (Caddik, 1986). *Bacillus halophilus*, al crecer en un intervalo de pH externo de 9.0 a 11.0, mantiene su pH interno en un rango de 9.0 a 9.5 (Boot, 1985). Esta regulación del pH interno se encuentra dentro de rangos estrechos, a pesar que los cambios en el pH extracelular pueden ser muy grandes. Estos sólo se puede lograr mediante el control homeostático, el cual utiliza diversos mecanismos para regular el pH interno (pHi), entre los cuales se encuentran:

- 1) La permeabilidad de la membrana (Boot, 1985), la cual es relativamente impermeable a los iones hidrógeno e hidroxilo, por lo que la concentración en el citoplasma de estos iones puede permanecer relativamente constante, a pesar de las variaciones en el pH del medio que rodea a la célula.
- 2) La síntesis de proteínas extracelulares, que pueden funcionar como acarreadoras de protones (Myrold y Nason, 1992). Esta, al tener grupos ionizables, presentan una carga que depende en parte del pH del medio en el que se encuentren. Por lo que, cuando se

encuentran en condiciones intracelulares ácidas, pueden captar protones y acarrearlos fuera de la célula o al interior de algunos organelos.

3) La producción metabólica de ácidos o bases con capacidad amortiguadora. Booth (1985), reporta que algunos microorganismos al crecer en ambientes alcalinos, producen productos de fermentación ácidos y productos neutros cuando crecen en ambientes ácidos, para de esta forma contrarrestar el efecto tóxico del medio. Dos ejemplos de este fenómeno son: *Clostridium acetobutylicum*, que al encontrarse en un ambiente ácido sintetiza las enzimas para la producción de butanol a partir de butirato, y *Klebsiella aerogenes*, sintetiza enzimas para la producción de butanodiol a partir de acetato.

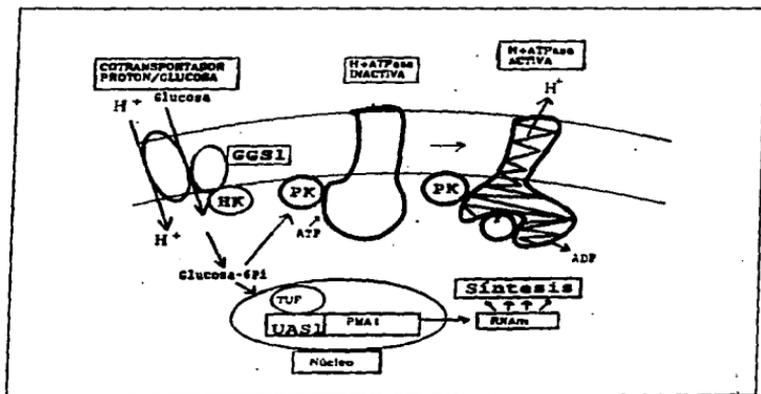


Figura 3. La ATPase funciona como un cotransportador de protones y participa en la regulación del pH interno.

La glucosa entra por un cotransporte con protones en un proceso activado por una proteína sensora de azúcares (GGS1) y se transforma de inmediato a glucosa-6-fosfato, mediante una hexoquinasa (HK). La glucosa-6-fosfato estimula a una proteína quinasa (PK) de membrana que a su vez fosforila a la H⁺ATPase activándola. En el núcleo, la glucosa-6-fosfato activa al promotor de la H⁺ATPase mediante un factor TFU, acelerando la síntesis de la ATPase (Guerra y Uribe, 1995).

4) La expulsión de protones (H^+) mediante el mecanismo de antiporte, que se basa en el intercambio de H^+ con otros iones (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), a través del acoplamiento con una ATPasa (Booth, 1985; Olson, 1993, Guerra y Uribe, 1995). Esta expulsa a los iones hidrógeno del ambiente intracelular, creando un gradiente de potencial electroquímico que suministra la energía para introducir iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares. El intercambio de iones hidrógeno por otras moléculas extracelulares permite la regulación del pH interno. La ATPasa se ha encontrado en varios tipos de hongos: *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Dictyostelium discoideum* y *Kluyveromyces lactis* (fig. 3) (Guerra y Uribe, 1995).

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES.

En los organismos eucariontes, las proteínas sintetizadas por los ribosomas son depositadas directamente en el lumen del retículo endoplásmico y después son transportadas al aparato de Golgi. En su paso por estos sistemas membranosos, éstas sufren diversos cambios estructurales, o modificaciones postraduccionales, proceso que también se les conoce como maduración de la proteína, y que da lugar a una biomolécula activa y funcional. La maduración la cadena polipeptídica implica un proceso de:

- a) **Plegamiento**, en donde la cadena polipeptídica se dobla sobre si misma mediante la formación de enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals.
- b) **Proteólisis**, que consiste en la remoción proteolítica de algunas secuencias de aminoácidos.
- c) **Modificación química**, mediante la cual son adicionados algunos grupos acetil, metil, fosfato, hidroxil y carboxil a la cadena polipeptídica.
- d) **Acilación**, o adición de ácidos grasos a la proteína.
- e) **Glicosilación**, en la cual se unen cadenas de carbohidratos a la proteína.

GLICOSILACION.

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más generalizadas que se llevan a cabo en las proteínas extracelulares y proteínas de membrana. En el proceso de glicosilación, los oligosacáridos que se unen a la proteína sufren diversos cambios a su paso por el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, los cuales deben hacerse correctamente ya que el tipo y secuencia de los carbohidratos juega un papel importante en el almacenamiento, distribución y funcionalidad de dichas proteínas. En la glicosilación uno de los azúcares más importantes es la manosa, se ha propuesto que dependiendo del contenido de este azúcar, la proteína puede ser almacenada en los lisosomas o trasladada al exterior de la célula (Voett, 1992).

TIPOS DE GLICOSILACION.

Básicamente existen dos tipos de glicosilación, la N- y la O-glicosilación. En la N-glicosilación, La adición de azúcares en la N-glicosilación, se inicia en el retículo endoplásmico en donde la manosa se une con un residuo de N-acetilglucosamina (NAG) a la cadena polipeptídica, mediante un enlace β -N-glicosídico con un nitrógeno del grupo amino de un residuo de asparagina (Asn), que se encuentre en la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde X es un residuo de cualquier aminoácido con excepción de prolina (Pro) o aspartato (Asp) (fig. 4a), la estructura formada es ramificada y en la cual pueden estar involucrados diferentes tipos de azúcares, en su procesamiento están involucradas por lo menos once diferentes enzimas. La O-glicosilación se inicia en el aparato de Golgi, en donde el disacárido β -galactosil-(1-3)- α -N-acetilgalactosamina, se une a la cadena polipeptídica a través de un enlace α -O-glicosídico, a un oxígeno del grupo -OH, de un residuo de serina (Ser), o treonina (Thr), siendo poco común que algunos azúcares como xilosa o galactosa puedan formar enlaces α -O-glicosídicos con Ser o Thr. (fig. 4b), su estructura es simple, en relación a la N-glicosilación, la cual puede contener uno o varios azúcares y la adición de los carbohidratos, puede ser catalizada por glicosiltransferasas distintas a las que están involucradas en la N-glicosilación. (Voett, 1992).

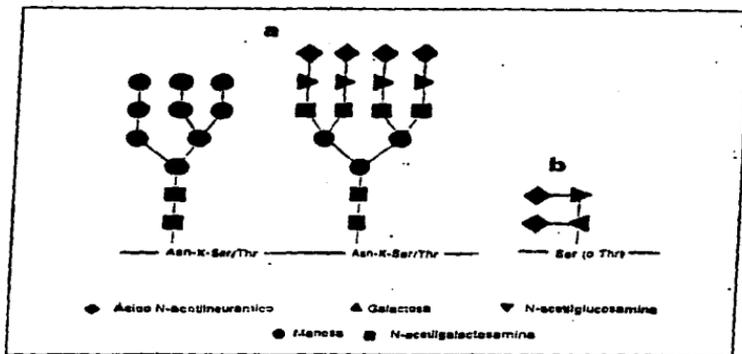


Figura 4. Tipos estructurales de carbohidratos que se pueden unir a las proteínas por un enlace de tipo: (a) N-glicosídico a un residuo de Asn o (b) O-glicosídico a un residuo de Ser o Thr (Jenkins and Curling, 1994).

FUNCIÓN DE LA GLICOSILACIÓN.

Ambos tipos de glicosilación proporcionan a la proteína características importantes. En diversos estudios se ha encontrado que la O-glicosilación está involucrada con la secreción proteica, mientras que la N-glicosilación esta relacionada con la estabilidad de las proteínas (tabla 1), se ha observado que cuando un mismo tipo de proteína presenta diferente grado de glicosilación su actividad y estabilidad se modifica (Frukawa y Kobata, 1992). Otras de las funciones de la glicosilación son: el dar protección a la proteína contra ataques proteolíticos, debido a que los carbohidratos son un impedimento físico para que las proteasas actúen. Además, la unión de los carbohidratos a la proteína le confiere una mejor solubilidad, puesto que los residuos hidrofóbicos son cubiertos por los carbohidratos, también se ha reportado que la glicosilación tiene relación con la respuesta inmune (Jenkins y Curling, 1994).

Tabla 1. Efecto de la N- y O-glicosilación sobre la secreción y la actividad enzimática.

Enzima	Tipo de glicosilación	Efecto	Referencia
α -Amilasa	N-glicosilación	liberación extracelular	Rios y laborda; 1984
Endo glucanasa I	N-glicosilación	estabilidad	Merivouri <i>et. al.</i> ; 1985
Endo glucanasa II	O-glicosilación	secreción	Kubicek <i>et. al.</i> ; 1987
Exo glucanasa	N-glicosilación	conformación y estabilidad	Sánchez <i>et. al.</i> ; 1992
	O-glicosilación	secreción	Sánchez <i>et. al.</i> ; 1992
Invertasa	O-glicosilación	secreción	Chu <i>et. al.</i> ; 1978
			Kou y Lampen; 1972
Fosfatasa ácida	O-glicosilación	secreción	Kou y lampen; 1972

INHIBIDORES DE LA GLICOSILACIÓN.

El estudio de la glicosilación se ha llevado a cabo mediante el uso de inhibidores que bloquean la síntesis de la cadena de los oligosacáridos. La inhibición de la N-glicosilación, se obtiene al utilizar a la tunicamicina (TM) (fig. 5a), la cual inhibe la reacción de dolicol-P y uridín difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-N-acetilglucosamina) ya que la tunicamicina es un antibiótico análogo del UDP-N-acetilglucosamina, el cual es necesario para la formación del dolicol-PP-N-acetilglucosamina, siendo éste el acarreador de los carbohidratos a la cadena polipeptídica, en la N-glicosilación.

Por otro lado, el estudio *in vivo* de la O-glicosilación no ha sido fácil debido a la falta de inhibidores específicos para este tipo de glicosilación, aunque en diversos estudios se ha utilizando la 2-desoxi-D-glucosa (fig. 5 b), el cual es un análogo de la glucosa y manosa. No se conoce a ciencia cierta cómo actúa este desoxiazúcar, aunque se ha propuesto que la inhibición de glicoproteínas por la 2-desoxi-D-glucosa es debido a la inhibición de la fosfoglucosa isomerasa y la fosfomanosa isomerasa, enzimas necesarias para la síntesis de manosa, la cual es necesaria para la iniciar la O-glicosilación, en las proteínas, mediante la unión de la manosa al grupo hidroxilo de un residuo de serina/treonina (Kubicek. *et. al.*, 1987; Kuo and Lampen. 1972, Krátary *et. al.*; 1975). Por otro lado, se ha propuesto que la 2-desoxi-D-glucosa puede interferir directamente con la síntesis de proteínas, como ha sido

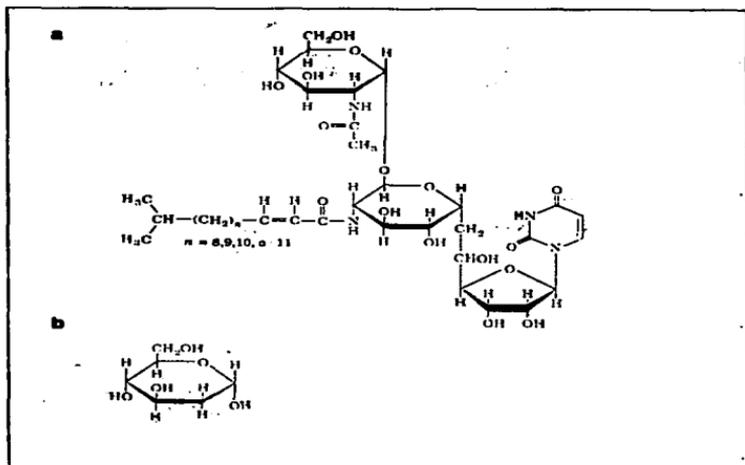


Figura 5. Estructura química de (a) la tunicamicina y (b) la 2-desoxi-D-glucosa (Voett, 1992).

observado en protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*, donde este microorganismo produce glicoproteínas como la fosfatasa ácida e invertasa, pero cuando es cultivado en presencia de 2-desoxi-D-glucosa, no se presentan dichas enzimas libres de manosa. Por otro lado, la cantidad de invertasa intracelular, es similar a la encontrada en presencia de cicloheximida, lo que sugiere que este efecto tiene que ver con una inhibición en la síntesis de proteínas (Krátarý *et. al.*, 1975). También se conoce que este desoxiazúcar inhibe simultáneamente la síntesis y secreción de manoproteínas, e interfiere con la formación de polisacáridos involucrados en la síntesis de la pared celular.

Diversas proteínas con implicaciones comerciales, tanto para terapia humana como para usos alimenticios, han sido obtenidas mediante técnicas de recombinación *in vitro*, sin embargo, uno de los mayores problemas se presenta cuando se utilizan organismos procarióticos como sistemas de expresión, ya que éstos no puede glicosilar a las proteínas, por lo que éstas biomoléculas presentan deficiencias en su función. A este respecto los hongos filamentosos presentan mayor ventaja al ser utilizados como vehículos de clonación de genes de origen eucariótico, ya que poseen una vía de secreción que permite que se lleve acabo la glicosilación de las proteínas, presentando una mayor eficiencia en la expresión y una alta capacidad de secreción.

LOS HONGOS FILAMENTOSOS.

Los hongos filamentosos han sido utilizados como modelos biológicos para estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos, en donde se ha logrado entender el funcionamiento celular de los organismos eucariontes. Los conocimientos obtenidos sobre estos microorganismos han tenido gran importancia en el campo de la medicina, agricultura, industria e investigación básica y aplicada.

Estos microorganismos son saprófitos, aunque también existen algunas especies parásitas. Son capaces de crecer en una amplia variedad de hábitats y condiciones, aunque, en general la mayoría de ellos, crecen en hábitats terrestres que presentan una alta actividad de agua (A_w) (Brok, 1991), se desarrollan sobre el suelo, materia vegetal muerta o en estado de descomposición, la cual degradan a partir de las enzimas extracelulares que ellos mismos secretan, desempeñando así una importante función en el reciclamiento del carbono orgánico, ya que debido a su gran diversidad metabólica y de su amplio sistema enzimático, estos microorganismos son capaces de degradar una gran variedad de productos tóxicos (Lamar, 1992).

Los hongos filamentosos pueden ser utilizados para la producción de diversos metabolitos de interés humano, como ácidos orgánicos, antibióticos, proteínas y enzimas. Algunos

ejemplos de esto son *Penicillium* y *Cephalosporium* los cuales son productores de antibióticos (Brok, 1991) y *Aspergillus niger* productor de ácido cítrico y diversas enzimas (Kozakiewicz and Smith, 1994).

Aspergillus

El género *Aspergillus* contiene 200 especies y variedades, algunas de ellas han sido clasificadas como hongos imperfectos dentro de la división Deuteromycota ya que no se les conoce una fase sexual dentro de su ciclo de vida (por ejemplo *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, etc.), mientras que a otras especies, como *A. nidulans*, la cual presenta una fase sexual, se le clasifica dentro de la división Ascomycota, siendo su nombre correcto *Emericella nidulans*, aunque el nombre comúnmente utilizado es el de el estado imperfecto (Ward, 1991).

Estos hongos presentan gran versatilidad para crecer en diferentes condiciones ambientales, algunas muy desfavorables, por ejemplo *Aspergillus nidulans* que es capaz de sobrevivir en un rango de pH entre 3.5 y 9.0 (Caddick, *et. al.*, 1986). Algunas especies de este género presentan mayor importancia económica, como *Aspergillus niger*, que produce el 95% de las enzimas comerciales (Smith, 1994), las cuales pueden ser utilizadas en la elaboración de alimentos para consumo humano (tabla 2), ya que algunos de estos microorganismos son considerados como GRAS (Generally Recognized As Safe). Estos hongos también son productores de antibióticos y pigmentos, ácido glucónico y cítrico, como es el caso de *Aspergillus niger*, *A. calvatus*, *A. japonicus* y *A. wentii*. Sin embargo, existen miembros de este género que pueden causar graves daños al hombre, ya que algunos son productores de micotoxinas como *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* y *Aspergillus flavus*, éste último es contaminante de granos y alimentos almacenados mientras que, *A. fumigatus* es el causante de la aspergilosis pulmonar (Kozakiewicz and Smith, 1994).

Tabla 2. Enzimas producidas por diferentes cepas de *Aspergillus*.

Enzima	Aplicaciones	<i>Aspergillus</i>
α -Amilasa	Ind. destiladora panadería	<i>oryzae</i>
Glucamilasa	Ind. del almidón	<i>niger</i>
Glucosa oxidasa	Ind. destiladora Jugos y vinos Panadería	<i>awamori</i>
Glucosa deshidrogenasa		<i>app.</i>
β -Glucanasa	Carvecería	<i>app.</i>
β -Glucosidasa		<i>niger</i>
β -Galectosidasa		<i>niger</i>
Lipasa	Productos lácteos Jugos y vinos	<i>niger</i>
Pectinasa		<i>niger</i>
Metiloproteinasa		<i>niger</i>
Celulasa	Jugos y vinos Alimento para animales	<i>app.</i>
Colestasa	Jugos y Vinos	<i>app.</i>
Fibasa	Alimento para animales	<i>app.</i>
Lactasa	Productos lácteos	<i>app.</i>
Protasa	Cuero Panadería	<i>app.</i>
Sulfhídri oxidasa	Productos lácteos	<i>app.</i>
Tanasa	Id	<i>app.</i>
Catalasa	Teniles	<i>niger</i>
Glicerol oxidasa		<i>japanicus</i>

Tomada de *Aspergillus*, editado por Smith, 1984.

PECTINASAS.

Entre las diversas enzimas producidas por *Aspergillus* se encuentran las pectinasas, estas enzimas están ampliamente distribuidas dentro de la naturaleza, tanto en plantas como en microorganismos, en donde juegan un papel importante en la degradación y reciclaje del material vegetal. En su producción industrial se utilizan hongos del género *Aspergillus* tales como *A. niger*, *A. oryzae* y *A. wentii* (Fogarty y Kelly, 1982).

El principal uso industrial de las pectinasas se encuentra en el procesamiento de frutas y verduras, para la elaboración y clarificación de jugos, vinos y concentrados, debido a que estas enzimas solubilizan las sustancias pécticas y disminuyen la viscosidad de los concentrados, favoreciendo así la maceración de los tejidos vegetales, aumentando el rendimiento en la producción (Witaker, 1984), y la extracción del color de los vegetales.

Otras industrias como la textil y la maderera hacen uso de este tipo de enzimas en los procesos de tinción de las telas y conservación de la madera (Fogarty y Kelly, 1982; Kurowsky y Dunleavy, 1976).

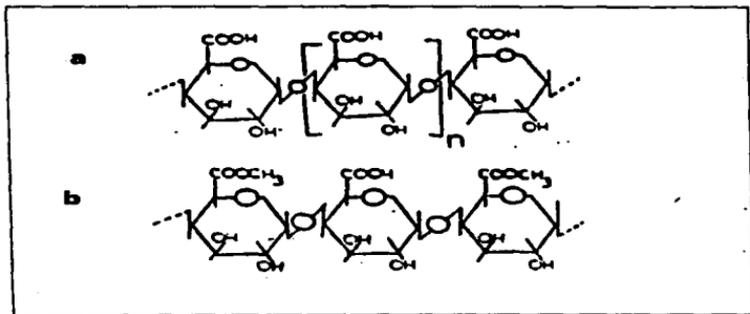


Figura 6 . Estructura de las sustancias pecticas, a) ácido poligalacturónico y b) pectina (Kilara, 1982).

Las pectinasas son un complejo de diferentes enzimas extracelulares que actúan sobre las sustancias pecticas (fig. 6), actúan de una manera coordinada entre sí. Estas se clasifican, principalmente, dentro de tres categorías: 1) solubilizantes, 2) esterasas y 3) despolimerizantes (tabla 3), la nomenclatura dada por la Enzyme Commission (E.C.) se basa en tres criterios (Fogarty y Kelly, 1982):

- 1.- De acuerdo al sustrato sobre el que actúan (pectina, ácido pectico u oligo-D-galacturonatos).
- 2.- Por el tipo de reacción que catalizan (hidrólisis o trans-eliminación).
- 3.- Por el sitio, en el polisacárido, en donde se lleva a cabo la reacción catalítica (endo si es dentro de la cadena, y exo si es en extremo reductor de ésta).

La pectin esterasa (PE) es una hidrolasa que desesterifica la pectina, produciendo metanol y ácido poligalacturónico (fig. 7), tiene un rango de pH óptimo de actividad de 5.0 a 6.5

(Fogarty y Ward, 1974). El ácido poligalacturónico es hidrolizado por las poligalacturonasas (PG), las cuales pueden romper los enlaces internos de la cadena (Endo-PG) formando oligogalacturonatos, o pueden cortar los azúcares del polisacárido que se encuentran en el extremo reductor (Exo-PG) dando origen a monómeros o trómeros (Rombouts y Pitnik, 1980), el pH óptimo para su actividad catalítica de las PG se encuentra entre 4.0-6.0. Las polimetilgalacturonasas (PMG), por su parte, tienen como sustrato a la pectina, en lugar del ácido poligalacturónico (Fogarty y Kelly, 1982; Kilara, 1982).

Otras pectinasas que también degradan las sustancias pécticas, son las liasas, que rompen enlaces α -1,4 glucosídicos mediante el mecanismo de transeliminación (Whitaker, 1984), estas enzimas tienen un pH óptimo, generalmente de 8.0 a 10.0 (Whitaker, 1984; Fogarty y Kelly, 1982; Mac Millan et al, 1964a).

Tabla 3. Clasificación de las pectinasas.

Enzima	Mecanismo de acción	No. EC	Productos
Dehidrolizantes			
Protepectinasas (PP)	Hidrólisis	-----	Pectina
Ramnogalacturonasa (RG)	Hidrólisis	-----	
Actúan sobre pectina.			
Desacetificantes			
Pectinesterasa (PE)	Hidrólisis	3.1.1.11	Ácido poligalacturónico + metanol
Pectinasas despolimerizantes			
Polimetilgalacturonasas (PMG)	Hidrólisis	-----	
Endo-PMG	-----	-----	Metil oligogalacturonatos
Exo-PMG	-----	-----	Metil monogalacturonato
Polinimetilgalacturonato liasas (PMGL)	Transeliminación	-----	
Endo-PMGL	-----	4.2.2.10	Metil oligogalacturonatos insaturados
Exo-PMGL	-----	-----	Metil monogalacturonato insaturado
Actúan sobre poligalacturonas			
Poligalacturonasa (PG)	Hidrólisis	-----	
Endo-PG	-----	3.2.1.15	Oligogalacturonatos
Exo-PG-1	-----	3.2.1.67	Monogalacturonato
Exo-PG-2	-----	3.2.1.82	Monogalacturonato
Poligalacturonato liasa (PGL)	Transeliminación	-----	
Endo-PGL	-----	4.2.2.2	Oligogalacturonato insaturado
Exo-PGL	-----	4.2.2.9	Monogalacturonato insaturado
Actúan sobre oligo-D-galacturonatos (OG)			
Oligogalacturonasa	Hidrólisis	-----	Monogalacturonato
Oligogalacturonato liasa	Transeliminación	4.2.2.6	Monogalacturonato insaturado

Adaptado de Fogarty y Kelly (1982)

No. EC Número dado por la Enzyme Commission.

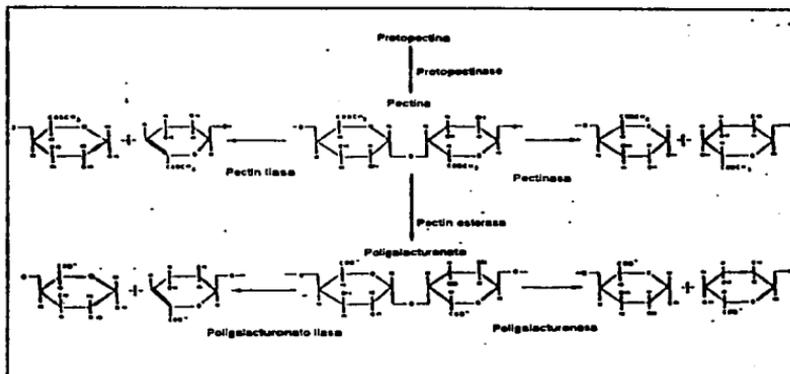


Figura 7. Mecanismos de catálisis de las pectinasas (Sakai yWinkermann,1992).

Este complejo enzimático es muy amplio y ofrece una gran ventaja al utilizar dichas enzimas como modelo de estudio en la secreción proteica en hongos filamentosos como *Aspergillus*.

Aun cuando se han realizado diversos estudios sobre el efecto que el pH del medio tiene sobre la fisiología microbiana, la mayoría de éstos han sido llevados a cabo en bacterias, por lo que aún se desconocen muchos de los aspectos del efecto que el pH tiene sobre los hongos filamentosos, sobre todo cuando estos se encuentran en condiciones de acidez extrema. Por lo que resulta importante realizar estudios sobre la producción y secreción enzimática en condiciones de acidez extrema, ya que esto dará como resultado:

- Entender cómo el microorganismo responde a los cambios ambientales.
- Aprovechar este tipo de respuesta para manipular la producción y calidad enzimática.

Es posible que debido al grado de acidez del pH externo, el valor del pH interno se modifique dando origen a cambios importantes en el grado de acidez en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, como un mecanismo del control hemostático, modificando así los patrones de glicosilación de las pectinasas, lo que puede alterar los niveles de secreción de estas enzimas.

OBJETIVO:

El objetivo de la realización de este trabajo fue:

"Evaluar la secreción de pectinasas de *Aspergillus*, cultivado en condiciones de acidez extrema."

Para lograr este objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a) Seleccionar una cepa que creciera y produjera enzimas pectinolíticas en condiciones de acidez extrema.
- b) Evaluar el efecto del pH sobre el crecimiento, pH intracelular y la secreción de pectinasas.
- c) Evaluar el efecto de inhibidores de la glicosilación sobre la secreción de estas enzimas.

ESTRATEGIA DE TRABAJO.

Para alcanzar los objetivos planteados se siguió la siguiente estrategia de trabajo.

Debido a que contamos con un número grande de diferentes cepas de *Aspergillus*, se decidió seleccionar una cepa que al ser cultivada en condiciones de acidez extrema presentara una reducción en el crecimiento y un incremento en la secreción. Dicho efecto fue definido como una condición de estrés por pH ácido, para lo cual se siguieron los siguientes criterios:

- 1) que el microorganismo creciera a pH de 2.5, pero que su crecimiento fuera menor, en comparación al obtenido a pH de 3.5.
- 2) que el microorganismo fuera capaz de producir pectinasas a pH de 2.5.

- 3) que las pectinasas producidas a pH de 2.5 presentaran mayor actividad especifica que las producidas a pH de 3.5.

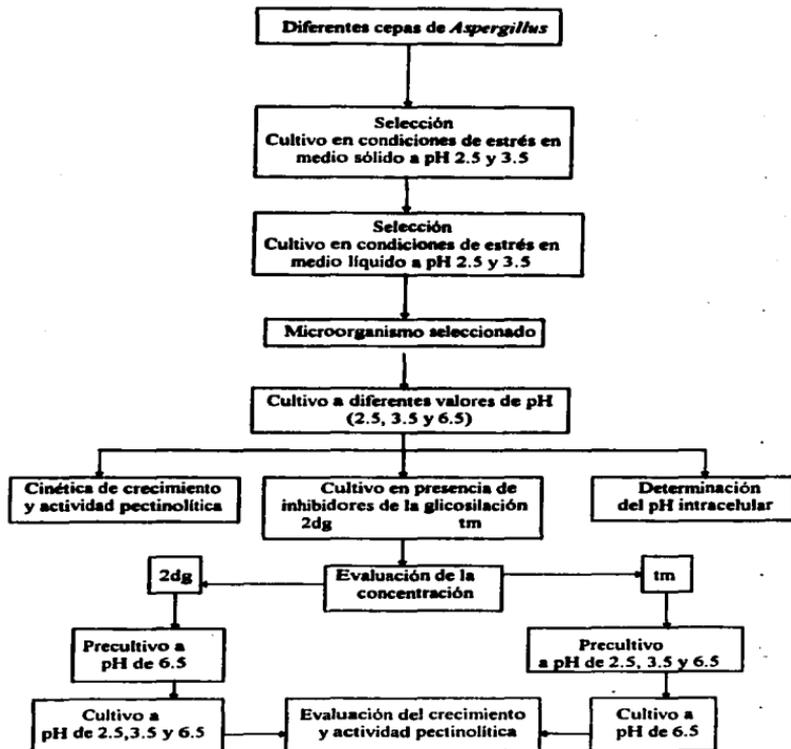
La primera parte de la selección se realizaría en medio sólido, a pH de 2.5 y 3.5, determinando la actividad como halos de hidrólisis y su crecimiento como diámetro de la colonia, lo es una forma rápida de probar un gran número de cepas. Después las cepas preseleccionadas, serían cultivadas en medio líquido determinando su actividad, como halos de hidrólisis y el crecimiento como peso seco, seleccionando aquellas cepas que presentaran un mayor estrés por efecto del pH. Posteriormente, a los microorganismos seleccionados se les determinaría la actividad exopectinoltítica, presente en el medio de cultivo libre de células, eligiendo a la cepa que presentara la mayor actividad específica, calculada en base su crecimiento.

Una vez seleccionada la cepa con la que se habría de trabajar, se procedería a realizar las cinéticas de crecimiento y producción de la actividad exo y endopectinoltítica, cultivando al microorganismo en tres valores de pH, eligiendo para esto un valor cercano a la neutralidad (6.5), otro que ha sido reportado por Fogarty y Kelly, 1982 como el óptimo para la producción de estas enzimas (3.5) y por último un valor ácido en donde el crecimiento se redujera notablemente (2.5). También el pH intracelular sería determinado cultivando a este microorganismo dentro de un rango de pH externo de 2.5 a 7.0. Con el fin de determinar si la alteración en el pH intracelular modifica la glicosilación y de relacionar estos cambios con los niveles de secreción, observados cuando el microorganismo es cultivado a pH de 2.5.

Por otro lado, se evaluó el efecto de dos inhibidores de la glicosilación, (2-desoxi-D-glucosa para el tipo O- y tunicamicina para el tipo N-), sobre la secreción de las pectinasas de *Aspergillus*, afin de correlacionar esta información con las posibles modificaciones producidas por el valor de pH del medio. Para lo cual primero se debería buscar la concentración de 2-desoxi-D-glucosa y tunicamicina, que inhiben la O- y la N-glicosilación, sin que se viesen afectadas otras funciones vitales de la célula. Una vez encontrada la concentración para ambos inhibidores, el microorganismo sería cultivado en presencia de

cada uno de ellos por separado y evaluado su efecto sobre la actividad exo y endopectinolítica.

En el caso de la 2-desoxi-D-glucosa, que es un análogo de la glucosa y que se conoce que puede causar represión catabólica (Gancedo, 1988) también se utilizó glucosa a la misma concentración que este inhibidor.

DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA DE TRABAJO

CAPITULO

2

MATERIALES Y METODOS.

MICROORGANISMOS.

Durante la selección, primera etapa del trabajo se utilizaron 52 cepas del género *Aspergillus*, 47 de las cepas fueron aisladas de material vegetal en estado de descomposición y las otras 5 cepas fueron de colección (Northern Regional Research Laboratories, Peoria Illinois, USA). Posteriormente, en la segunda etapa se empleó a la cepa seleccionada, *Aspergillus* MGM-180. Todos estos microorganismos fueron conservados en tubos con medio inclinado de papa dextrosa agar (PDA), e incubadas por un periodo de 72 horas, a una temperatura constante de 37°C.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Los microorganismos fueron cultivados en medio basal (MB), para la producción de pectinasas, el cual tuvo la siguiente composición: $K_2 HPO_4$ al 0.2%; $KH_2 PO_4$ al 0.2% y $(NH_4)_2 SO_4$ al 0.2%, utilizando como fuente de carbono pectina citrica de 47% de esterificación, al 1.0% (Sigma Chemical Co. U.S.A.).

Para el cultivo en medio sólido, el cual estuvo formado por medio basal y agar al 0.05%, los valores de pH inicial fueron 2.5 y 3.5, inoculando el medio por picadura, e incubado a una temperatura de 37°C por 72 horas.

La producción en medio líquido fue llevada a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 200 ml de medio, utilizando tres valores de pH inicial para la fermentación (2.5, 3.5 y 6.5), a menos que se indique lo contrario. El tamaño del inóculo fue de 1×10^6 esporas/ml de medio. Se incubaron a una temperatura de 37°C, con agitación constante de 100 golpes/min., en un agitador recíprocante de 1 pulgada de desplazamiento.

ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA.

La actividad pectinolítica total en medio sólido fue determinada por dos variantes del método de difusión. En el primero, utilizado durante la primera etapa de la selección, en el cual se tomó un cilindro de agar de la parte apical de las colonias, ya que se ha reportado que en esta región se encuentra localizada la mayor secreción de enzimas extracelulares (Wösten *et. al.*; 1991), las cuales fueron crecidas previamente en medio sólido, las cuales fueron colocadas sobre una placa de agarosa-pectina, e incubadas toda la noche (14 horas) en una cámara húmeda a 37°C. Después de este tiempo los cilindros fueron retirados de la placa de agarosa-pectina, revelando la actividad con rojo de rutenio al 0.05%, durante 30 minutos, después el exceso de colorante fue removido, enjuagando la placa con agua destilada, observando las zonas de hidrólisis, a las que se les determinó el diámetro (cm). La segunda variante del método empleada en la segunda parte de la selección, consistió en utilizar 10 µl del filtrado libre de células, provenientes de los cultivos en medio líquido, de las diferentes cepas, los cuales se depositaron dentro de pozos de 5.0 mm de diámetro, en una placa de agarosa-pectina, éstos fueron incubadas toda la noche, revelando la actividad con rojo de rutenio, como se describió anteriormente. En ambas variantes del método de difusión en agar la concentración de pectina en las placas de agarosa-pectina fue de 0.1%.

La actividad exopectinolítica presente en medio líquido fue evaluada por la cuantificación de los azúcares reductores producidos a partir de una solución de pectina al 1.0%, después de la incubación a 45°C durante 20 min. a pH de 5.0. Una unidad de actividad exopectinolítica fue definida como la cantidad de enzima que catalizó la formación de 1.0 µmol de ácido galacturónico en las condiciones de ensayo.

La actividad endopectinolítica producida en medio líquido fue medida por el cambio de la viscosidad en una solución de pectina al 1.0%, a pH de 4.2, a una temperatura de 30°C, en un viscosímetro de Oswald (CANNON 200 651 1Y). Una unidad de actividad endopectinolítica fue definida como la cantidad de enzima que redujo en un 50% la viscosidad de la solución de pectina, en un tiempo de 10 min. (Aguilar et. al., 1991).

ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE Y ACTIVIDAD *in situ*

La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturizantes de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Los geles contenían acrilamida al 10%, bis-acrilamida al 2.7% (Bio-Rad laboratories). Las muestras fueron colocadas en un baño a ebullición por 60 segundos en buffer de muestra, el cual estuvo formado por SDS al 4% (Bio-Rad laboratories), glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10% (Bio-Rad laboratories), buffer Tris-HCl 125 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol al 0.005%. La electroforesis fue llevada a cabo con 150 µg de proteína de cada muestra, a una corriente constante de 30 mA., en una unidad de geles verticales de 1.5 mm. SE-600 (Hoefer Sci. Ins. U.S.A.) por un tiempo de 2 a 3 hrs. Después de este tiempo los geles fueron sumergidos en solución de tinción, que contenía azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad laboratories) al 0.125%, metanol al 50% y ácido acético al 10%, durante 1 hora, y después fueron desteñidos con una solución de ácido acético al 10%.

La actividad *in situ* (zimograma), fue realizada por dos técnicas distintas, 1) gel réplica de agarosa con sustrato ó 2) con el sustrato acoplado al gel de acrilamida.

1) El gel réplica de agarosa-pectina, se preparó disolviendo por calentamiento la agarosa, a una concentración final de 1.0%, en buffer acetatos 0.17M a pH 5.0, adicionando la pectina o ácido poligalacturónico, a una concentración final de 0.1%, y mezclando. Este gel de agarosa-pectina fue colocado sobre el gel de acrilamida y cubierto con buffer acetatos 0.17 M, a un pH de 5.0, e incubado a temperatura ambiente toda la noche (14 h).

Transcurriendo este tiempo se revelo la actividad, colocando el gel de agarosa-pectina en una solución de rojo de rutenio al 0.05% y enjuagado posteriormente con agua destilada.

2) Para los gels de sustrato acoplado a la acrilamida, destinados para determinar la actividad, se les adicionó pectina o ácido poligalacturónico al 0.1%, según se indique en el texto. Después de llevar acabo la electroforesis, éstos fueron incubados toda la noche (14 horas) en ácido succínico 0.1M, el cual se eliminó al termino de la incubación, posteriormente los gels de acrilamida-sustrate fueron teñidos con una solución de rojo de rutenio al 0.05%, y tratados como se describió anteriormente.

ROMPIMIENTO CELULAR.

Para la evaluación de la actividad y proteína intracelular, utilizando 1.2 mg/ml de peso seco. La biomasa fue lavada con solución isotónica de NaCl al 0.85% y colocada en un desintegrador (Sonic Dismembrator 550, Fisher Sci.) para el rompimiento celular, el cual se realizo en frío. Los restos celulares fueron separados por centrifugación a 5000 r.p.m. el sobrenadante fue recuperado y utilizado para su análisis.

SELECCION.

Para la selección de la cepa de *Aspergillus* se buscó aquella que al ser cultivada en condiciones de acidez extrema, presentara una reducción en el crecimiento y un incremento en la secreción. dicho efecto fue definido como una condición de estrés inducido por pH.

Las 52 cepas de *Aspergillus* fueron cultivadas en MB sólido, conteniendo pectina como única fuente de carbono, a un pH inicial de 2.5 y 3.5, por un tiempo de 72 horas. Tras ello se midió el diámetro de la colonia (cm), y se analizó la actividad pectinolítica total, utilizando un cilindro de agar de la parte apical de la colonia, como fue descrito anteriormente.

Las cepas que respondieron al estrés por pH en medio sólido fueron cultivadas en MB líquido, a valores de pH inicial de 2.5 y 3.5, e incubadas a 37°C durante 72 horas transcuriendo este tiempo la biomasa fue separada, por filtración, y se evaluó el crecimiento, y se determino la actividad pectinolítica utilizando 10 µl de filtrado como ya fue descrito. A las cepas que presentaron una mayor respuesta de estrés por pH, se les determinó la actividad exopectinolítica, seleccionando la cepa que mostró la mayor actividad específica.

EFECTO DE LA 2-DESOXI-D-GLUCOSA (2DOG) Y LA TUNICAMICINA (TM)

Se utilizó 2-desoxi-D-glucosa (Grado II de Sigma). Para lo cual, el micelio fue precultivado en el MB, a pH de 6.5, durante 24 h., con el fin de obtener suficiente cantidad de biomasa después de este tiempo el micelio fue recuperado, lavado con solución isotónica (NaCl al 0.85%) y trasladado a medio fresco, en donde fue cultivado a diferentes valores de pH inicial (2.5, 3.5 y 6.5). Se probaron diferentes concentraciones de 2-desoxi-D-glucosa (100, 150 y 250 µg/ml). Utilizando también glucosa (G) a la misma concentración que el inhibidor, para asegurar que el efecto observado fuese debido a las alteraciones en la glicosilación y no a un posible problema de represión catabólica causada por la 2-desoxi-D-glucosa. En el caso del control el microorganismo fue tratado igual pero sin adicionar ninguno de estos azúcares.

La tunicamicina (Sigma Chem. Co; USA) fue empleada para inhibición de la N-glicosilación. Este antibiótico es insoluble a valores de pH menores de 6.0 (CalBiochem), por lo que fue necesario inducir la síntesis de las pectinasas a los diferentes valores de pH inicial evaluados, antes de utilizarlo, para lo cual el microorganismo fue precultivado en MB conteniendo pectina como única fuente de carbono, a diferentes valores de pH (2.5 3.5 y 6.5), durante 24 horas. Posteriormente, la biomasa fue recuperada y lavada con solución isotónica, después fue transferida a un medio fresco con un valor de pH de 6.5. En esta condición fueron probadas diferentes concentraciones de tunicamicina (20 y 30 µg/ml),

previamente disuelta en NaOH 20mM. Un volumen equivalente de NaOH 20mM fue adicionado al control sin antibiótico.

METODOS ANALITICOS.

El crecimiento celular en medio sólido fue evaluado determinando el diámetro de la colonia formada en las condiciones de cultivo (cm), mientras que en medio líquido éste fue determinado como peso seco (PS). La proteína fue estimada en muestras dializadas y libres de células por el método de Lowry (1951), utilizando como estándar albúmina de suero bovina (ABS).

DETERMINACION DEL pH INTRACELULAR.

El pH intracelular fue evaluado de acuerdo al método descrito por Caddick (1986). En donde la biomasa fue macerada en hielo seco y acetona, y resuspendida en solución isotónica. A la cual se le midió el pH utilizando un potenciómetro convencional (Beckman 34 pH meter).

CAPITULO

3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO

De las 52 cepas cultivadas en medio sólido se encontró que el 90% de estos microorganismos crecieron y produjeron pectinasas a un pH de 2.5, (tabla 4 a). De estas cuarenta y siete cepas, treinta y siete mostraron una reducción en su crecimiento en comparación al obtenido a pH de 3.5, lo que se observa como valores menores de 1.0 en la tabla 4 b.

La mayoría de las cepas presentaron una mayor producción de actividad pectinolítica, cuando el pH del medio fue de 2.5 (tabla 4, columnas c y d). La relación de la actividad específica entre ambos valores de pH, mostró que las cepas MGM-30, 50, 120, 160, 180, 240 y 360 presentaron una mayor respuesta al estrés inducido por pH. Por otro lado, las cepas MGM-150, 280, 370 y 440 tuvieron un crecimiento similar en ambos valores de pH, mientras que las cepas MGM-10, 170, 200 y 310, al igual que *Aspergillus awamori* y *A. carbonarius*, incrementaron su crecimiento cuando el pH del medio fue de 2.5, en comparación al obtenido a pH de 3.5 (tabla 4 b). Esto indica que no todos los microorganismos responden igual ante las condiciones ácidas del medio, y es posible que éstos puedan soportar valores de pH aún más ácidos.

Tabla 4. Prospección de las cepas de *Aspergillus*, en medio ácido

CEPA	a	b	c	d	e	CEPA	a	b	c	d	e
MGM-10	C	1.58	0.16	0.2	0.80	MGM-270	C	0.83	0.31	0.20	1.68
MGM-20	C	0.61	0.60	0.31	1.61	MGM-280	C	0.64	0.20	0.21	0.68
MGM-30	C	0.48	0.42	0.16	2.33	MGM-290	C	0.39	1.00	0.33	0.88
MGM-40	NC	---	---	---	---	MGM-300	C	0.72	0.39	0.21	1.67
MGM-50	C	0.43	1.71	0.57	2.08	MGM-310	C	1.24	0.19	0.25	0.73
MGM-60	C	0.44	0.85	0.50	1.72	MGM-320	C	0.35	0.59	0.36	1.55
MGM-70	C	0.48	0.60	0.48	1.67	MGM-330	C	0.81	0.28	0.21	1.33
MGM-80	C	0.66	0.67	0.74	1.18	MGM-340	C	0.68	0.33	0.50	0.68
MGM-90	NC	---	---	0.56	0	MGM-350	C	0.62	0.23	0.21	1.10
MGM-100	C	0.77	0.38	0.23	1.65	MGM-360	C	0.35	1.13	0.52	1.77
MGM-110	C	0.34	0.50	0.39	1.28	MGM-370	C	1.00	3.00	2.33	1.29
MGM-120	C	0.47	0.64	0.30	2.13	MGM-380	C	0.70	0.60	1.00	0.26
MGM-130	C	0.31	1.20	0.61	1.48	MGM-390	C	0.40	0.67	0.43	1.66
MGM-140	C	0.63	0.62	0.30	1.73	MGM-400	C	0.50	1.40	1.05	1.33
MGM-150	C	1.00	0.16	0.20	0.8	MGM-410	C	0.50	1.50	1.10	1.36
MGM-160	C	0.28	1.20	0.50	2.4	MGM-420	C	0.59	1.50	1.06	1.42
MGM-170	C	1.25	0.20	0.29	0.69	MGM-430	C	0.67	0.24	0.23	1.04
MGM-180	C	0.66	1.78	0.79	2.22	MGM-440	C	0.66	0.24	0.23	1.04
MGM-190	C	0.50	1.25	0.63	1.98	MGM-450	C	0.62	0.66	0.62	1.42
MGM-200	C	1.18	0.32	0.23	1.39	MGM-460	C	0.66	0.29	0.23	1.26
MGM-210	C	0.46	1.50	1.00	1.6	MGM-470	C	0.77	1.80	1.85	1.03
MGM-220	NC	---	---	---	---	<i>A. niger</i> ^{a)}	C	0.67	0.26	0.17	0.85
MGM-230	NC	---	---	---	---	<i>A. swamoni</i> ^{a)}	C	1.50	0.39	0.67	0.88
MGM-240	C	0.50	0.66	0.29	2.97	<i>A. carbonarius</i> ^{a)}	C	1.20	0.28	0.40	0.63
MGM-250	C	0.60	0.50	0.30	1.67	<i>A. fumigatus</i> ^{a)}	C	0.59	0.80	0.82	1.29
MGM-260	NC	---	---	0.71	0	<i>A. ochraceus</i> ^{a)}	C	0.76	0.17	0.11	1.55

a) Crecimiento a pH de 2.6 (C, crece); NC, no crece).

b) Relación entre el crecimiento a pH de 2.6 y 3.5.

c) Actividad específica, a pH de 2.6, estera ácido poligalacturónico. (cm de halo de hidrólisis/cm diámetro de la colonia).

d) Actividad específica, a pH de 3.6, estera ácido poligalacturónico. (cm de halo de hidrólisis/cm diámetro de la colonia).

e) Relación de la actividad específica a pH de 2.5 y 3.5

*) Cepa de colección.

El alto número de cepas que crecieron en condiciones de acidez extrema muestra la enorme capacidad de *Aspergillus* para adaptarse a condiciones adversas, la cual es una característica muy estable, aún después de que algunos de estos microorganismos estuvieron por largo tiempo en condiciones menos desfavorables, como es el caso de las cepas de colección. *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* y *A. ochraceus*, mostraron una reducción en su crecimiento a pH de 2.5, mientras que en estas mismas condiciones *Aspergillus swamoni* y *A. carbonarius* lo incrementaron, en un 50 y 20%, respectivamente.

En la segunda parte de la selección las cepas MGM-30, 50, 120, 160, 180, 240 y 360 fueron cultivadas en medio líquido a pH de 2.5 y 3.5, en donde se observó, que bajo éstas condiciones de cultivo, la relación del crecimiento entre ambos valores de pH (2.5/3.5), fue mayor en comparación al cultivo en medio sólido (tabla 5), con excepción de la cepa MGM-360, la cual aumentó su crecimiento al ser cultivada en medio líquido, esto pudo ser originado por las diferencias en las respuestas fisiológicas que existen entre los cultivos en medio sólido y líquido (Minjares, *et. al.*, 1997). Con lo que respecta a la actividad pectinolítica las cepas MGM-120, 160 y 180 las que presentaron mayores (tabla 5), siendo la cepa MGM-180 la que presentó la máxima actividad, mientras que las cepas MGM-120 y 160 mostraron una actividad del 83% y 90% respectivamente, en comparación a la cepa MGM-180. La cepa MGM-360 por otro lado, a pesar de no presentar una reducción en su crecimiento mostró una actividad pectinolítica correspondiente al 72% de la máxima.

Tabla 5. Preselección en líquido.

Cepas ^a	Relación del crecimiento (mm)	Actividad ^b	
		(mm)	(%)
MGM-30	0.270	1.40	(48.6)
MGM-50	0.179	1.40	(48.6)
MGM-120	0.207	2.50	(83.3)
MGM-160	0.278	2.70	(90.0)
MGM-180	0.372	3.00	(100.0)
MGM-240	0.280	1.80	(53.3)
MGM-360	1.130	2.15	(71.6)

^a Cepas cultivadas en medio líquido a pH de 2.5 y 3.5, sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono, por 72 horas.

^b Actividad determinada como halo de hidrólisis en los filtrados de pH de 2.5.

● Relación del crecimiento a pH de 2.5/ 3.5.

Cuando se determinó actividad exopeptinolítica presente en el medio de cultivo libres de células obtenidos de estas cuatro cepas, los mayores niveles de actividad específica fueron obtenidos por las cepas MGM-120 y 180 (tabla 6), los cuales fueron muy semejantes entre sí, siendo la cepa MGM-180 la que presentó un 14% mayor secreción de proteína que la cepa MGM120. La cepa MGM-160 presentó el nivel máximo de proteína extracelular, sin embargo, la actividad que presentó correspondió al 66% de la máxima obtenida con la cepa MGM-180. Con lo que respecta a la cepa MGM-360, ésta presentó niveles de proteína

extracelular semejantes a las cepas MGM-160, pero la actividad exopectinolítica, específica, fue menor al 50% en relación a la obtenida con la cepa MGM-180.

Tabla 6. Actividad pectinolítica específica de diferentes cepas de *Aspergillus*.

Cepa	Proteína		Actividad exopectinolítica	
	ug/ml	%	U/ml P.S.	%
MGM-120	36.8	74.72	41.30	87.36
MGM-160	49.25	100.00	28.30	66.71
MGM-180	43.56	88.44	42.42	100.00
MGM-360	42.81	86.92	8.16	12.16

* Cepas cultivadas en medio líquido a pH de 2.5, sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono, por 72 horas.

De acuerdo a los resultados anteriores se eligió a la cepa de *Aspergillus* MGM-180, la cual presentó el mayor efecto de estrés inducido por pH ácido.

EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Aspergillus* MGM-180 Y LA SECRECION DE PECTINASAS.

Aspergillus MGM-180 fue cultivado en medio líquido a diferentes valores de pH inicial (2.5, 3.5 y 6.5), los cuales se mantuvieron casi constantes a lo largo de la fermentación (fig. 8 A) existiendo un ligero incremento del pH cuando la fermentación inició a pH de 6.5. Mientras que el crecimiento obtenido a los valores de pH de 3.5 y 6.5 fue similar en ambos casos, pero cuando el microorganismo creció a un valor de pH de 2.5, la cantidad de biomasa se redujo en un 76% con respecto a los valores de pH de 3.5 y 6.5 (fig. 8 B). La actividad exopectinolítica específica, obtenida a pH inicial de 2.5, a las 24 horas fue 13 veces más alta que la obtenida a pH de 3.5 y 6.5, (fig. 9 A), aunque la actividad a pH de 2.5 disminuyó después de las 24 horas, en el último tiempo se encontró que la actividad era 8 veces superior a la encontrada en condiciones menos ácidas. La actividad exopectinolítica medida en unidades volumétricas (U/ml), a los diferentes valores de pH, siguió el mismo perfil, a pH de 2.5 la actividad fue de 21 U/ml, mientras que para los valores de pH de 3.5 y 6.5 la actividad fue de 12.4 y 9.7 U/ml respectivamente. Por otro lado, la actividad endopectinolítica específica (U/mg PS) obtenida a pH de 2.5 fue 5.5 veces más alta que a pH

de 3.5 (fig. 9 B). La actividad volumétrica (U/ml) presentó un incremento del 27% a pH de 2.5 en relación a la actividad que se obtuvo a pH de 3.5, dicha actividad no fue producida cuando el pH del medio fue de 6.5.

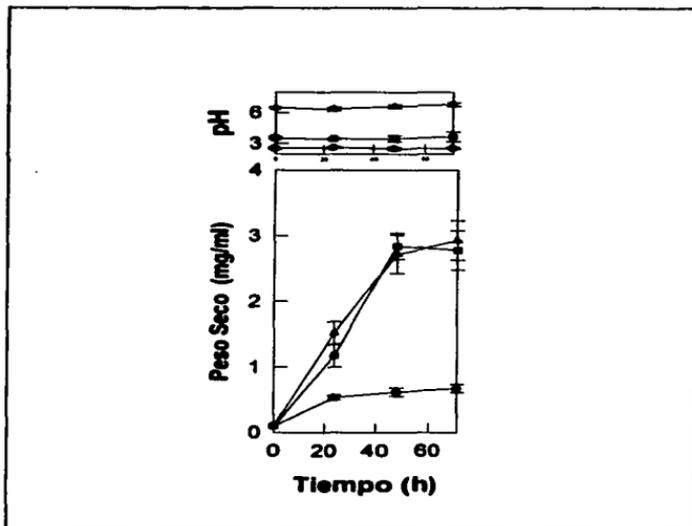


Figura 8. A) Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación y B) el efecto del pH sobre el crecimiento de *Aspergillus* MGM-180, cultivado en medio líquido, sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono a diferentes valores de pH inicial, 2.5 (●), 3.5 (■) y 6.5 (▲).

El análisis de la proteína extracelular obtenida al cultivar a *Aspergillus* MGM-180 en las diferentes condiciones de cultivo mostró que a pH de 6.5 se secretan altos niveles de proteína (fig. 10 A), sin embargo cuando el pH inicial del medio de cultivo fue de 2.5 se obtuvo mayor cantidad de proteína que a pH de 3.5, lo que representó un 69% de la

cantidad obtenida a pH de 6.5. Por otro lado, al observar la cantidad de proteínas secretadas por unidad de biomasa (fig. 10 B) observamos que a pH de 2.5 se obtiene el máximo nivel de secreción inducida por el estrés por pH.

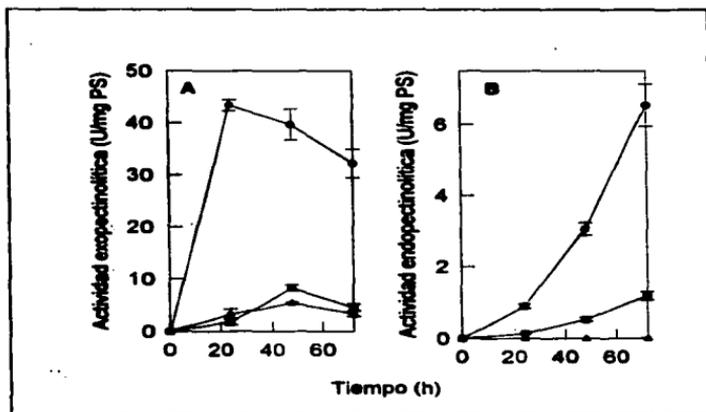


Figura 9. Efecto del pH sobre las actividades exopectinolitica (A) y endopectinolitica (B), producida por *Aspergillus* MGM-180, obtenida a diferentes valores de pH de cultivo, 2.5(●), 3.5(■) y 6.5(▲).

Los patrones electroforéticos de las proteínas extracelulares obtenidas a los distintos valores de pH de cultivo mostraron cambios importantes en los perfiles de secreción a los diferentes valores de pH (fig. 11). Cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado a un pH de 2.5 el número de bandas proteicas detectadas en el gel de acrilamida fue muy reducido en comparación a condiciones de cultivo menos ácidas (3.5 y 6.5). Entre las bandas de proteína encontradas, sólo la banda con una masa molecular de 48 kDa presentó actividad pectinolitica, esta banda se detectó cuando el pH inicial del medio fue de 2.5 y 3.5 (fig. 11,

líneas 1, a y 2, b), pero no se detectó a un pH de 6.5 (fig. 11, líneas 3 y c). Este hecho sugiere que la banda de 48 kDa corresponde a la actividad endopectinolítica, mientras que la actividad exopectinolítica no pudo ser detectada por este método.

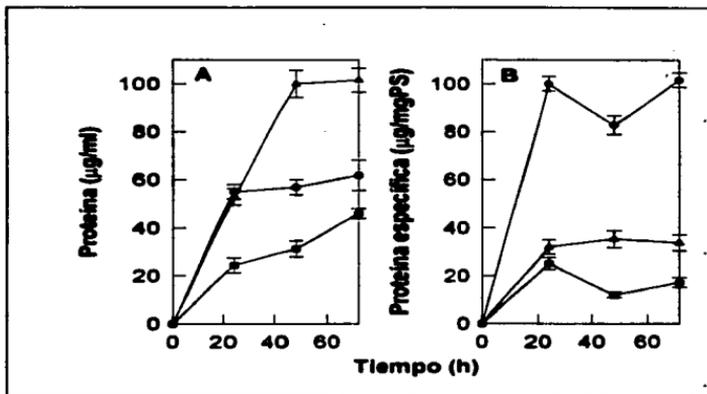


Figura 10. Efecto del pH sobre la secreción de proteína extracelular de *Aspergillus* MGM-180, cultivado a diferente valor de pH inicial de cultivo, 2.5 (●), 3.5 (■) y 6.5 (▲).

El bajo crecimiento obtenido a pH de 2.5 sugiere importantes trastornos metabólicos en el microorganismo, que provocaron además un aumento en la secreción de pectinasas. Como pudo ser observado, el número de proteínas extracelulares disminuyó conforme el pH del medio era más ácido, sin embargo a pH de 2.5, los niveles de proteína extracelular presente en el filtrado fueron mayores que los encontrados a pH de 3.5 y un 30% menos que la proteína secretada a pH de 6.5. Todo esto indica que la mayor parte de la proteína secretada por este microorganismo, a pH de 2.5, corresponde a enzimas pectinolíticas, lo que significa que la síntesis de otras proteínas extracelulares es inhibida cuando el pH del medio es

extremadamente ácido, logrando así un importante ahorro de energía para el propio microorganismo. Además, el aumento de la producción de estas enzimas asegura la degradación del sustrato con mayor eficiencia para sobrevivir en las condiciones adversas.

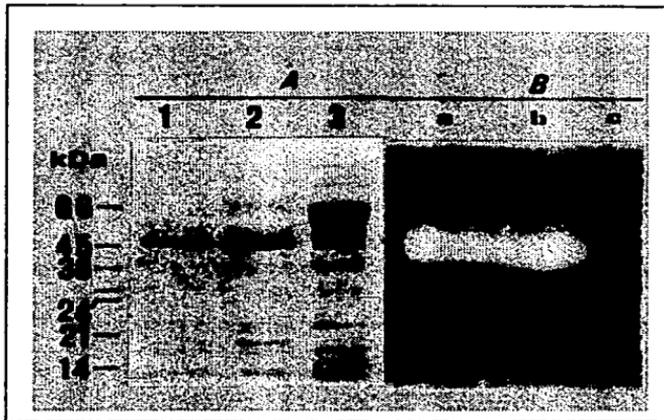


Figura 11. A) Electorforesis desnaturante de muestras obtenidas de *Aspergillus* MGM-180, cultivado a diferentes valores de pH inicial a las 72 horas de cultivo, y (B) zimograma de la actividad pectinolítica *in situ* correspondiente, utilizando pectina como sustrato. La actividad se detectó revelando el gel de agarosa-pectina con rojo de rutenio, después de incubarlo durante 14 horas. Los diferentes valores de pH inicial fueron 2.5 (Líneas 1 y a), 3.5 (líneas 2 y b) y 6.5 (líneas 3 y c).

La actividad exopectinolítica fue producida en los diferentes valores de pH inicial, evaluados, mientras que la actividad endopectinolítica sólo se produjo en un intervalo de pH de 2.5 a 3.5, no encontrándose a pH de 6.5. Esta actividad es una de las más importantes entre las diferentes actividades pectinolíticas, ya que hidroliza rápidamente la cadena del polisacárido, aumentando la disponibilidad del sustrato y disminuyendo la viscosidad del medio. Este tipo de enzimas tienen un pH óptimo superior a 2.5, lo que indica que cuando estas enzimas son producidas a este valor de pH inicial, su velocidad de catálisis es menor,

por lo que es probable que la célula incremente la concentración de estas enzimas en el medio, para tratar de compensar la baja actividad y aumentar la cantidad de azúcares disponibles en el medio.

La reducción del crecimiento de esta cepa sugiere importantes cambios metabólicos, por lo que se determinó el pH interno de este microorganismo, para lo cual *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado en un rango de pH de 2.5 a 7.0. Se encontró que entre valores de pH extracelular de 3.5 a 7.0, el pH interno se mantuvo casi constante entre 5.8 y 6.3 (fig. 12), lo que sugiere la eficiencia del control hemostático en este intervalo de pH. Sin embargo, que cuando el pH del medio fue de 2.5, el pH interno se acidificó hasta un valor de 4.2. Si bien

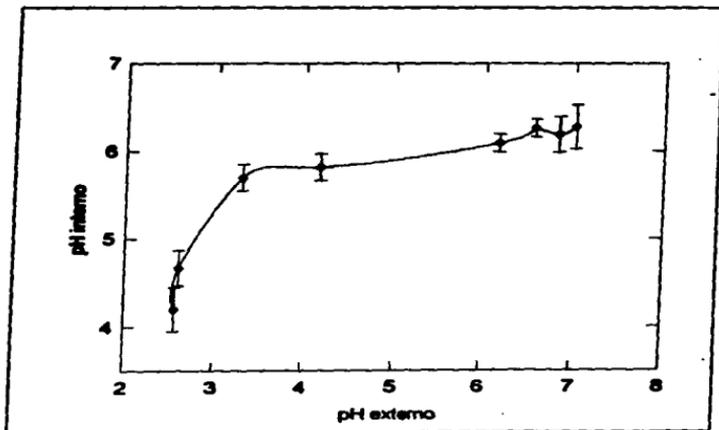


Figura 12. pH intracelular (pH int.), como una función del pH externo (pH ext.), en *Aspergillus* MGM-180, cultivado por 72 horas, a diferentes valores de pH inicial.

la célula no pudo mantener el pH interno cerca de la neutralidad, éste no llegó a valores tan ácidos como en el medio externo, éste decremento en el valor de pH interno ocasionó una disminución de la biomasa y un aumento en la actividad pectinolítica encontrada en el medio de cultivo.

Los resultados concuerdan con lo reportado por Caddik y Arts (1986), que trabajaron con una cepa de *Aspergillus nidulans*, y observaron que la acidificación del medio de cultivo ocasionó una acidez del pH intracelular. Myrold y Nason (1992), reportaron el mismo efecto en *Rhizobium meliloti*. En ambos trabajos se establece que el efecto del pH externo puede modificar la expresión de ciertos genes responsables en el control del pH, lo que se demuestra al generar cepas mutadas ácido sensibles, los cuales no pudieron controlar su pH interno.

Cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado a pH de 2.5, el ambiente intracelular sufrió una acidificación importante, con lo que es posible que diversos procesos celulares fueran modificados, entre ellos la glicosilación, puesto que el valor de pH del retículo endoplásmico y aparato de Golgi podría ser más ácido, lo que alteraría el proceso de glicosilación proteica y eso a su vez, modificaría los niveles de secreción o actividad de estas enzimas.

EFECTO DE LA 2-DESOXI-D-GLUCOSA (2DOG) SOBRE LA SECRECION DE PECTINASAS.

El efecto de diferentes concentraciones de 2-desoxi-D-glucosa (100, 150 y 250 µg/ml) fue evaluado sobre el crecimiento de *Aspergillus* MGM-180, a pH de 2.5 y 6.5. En donde no se observó ningún efecto negativo, mientras que la actividad tuvo una mayor reducción a 250 µg/ml (fig. 13), por lo que se decidió utilizar ésta concentración este inhibidor.

Cuando la 2-desoxi-D-glucosa estuvo presente en el medio de cultivo, a pH de 2.5 (fig. 14 A), la actividad exopectinolítica, apareció después de las 14 horas, lo que no sucedió en presencia de glucosa o el control, obteniendo a las 48 horas se obtuvo un 53% de la

actividad alcanzada con el control, mientras que en presencia de glucosa, la actividad durante las primeras 24 horas fue muy parecida al control, en donde a las 48 horas se obtuvo un 37% menos de actividad. A pH de 3.5 (fig. 14 B), en presencia de 2-desoxi-D-glucosa, la actividad se mantuvo por abajo del control a lo largo de la fermentación, mientras que en presencia de glucosa, la actividad se detectó después de las 24 horas, alcanzando niveles semejantes al control al final de la fermentación. Cuando la fermentación se inició a un pH de 6.5 (fig. 14 C), la presencia de desoxiglucosa ocasionó una disminución en la actividad en más de un 50% mientras que la presencia de glucosa, en estas condiciones de cultivo, no tuvo ningún efecto sobre la producción de la actividad.

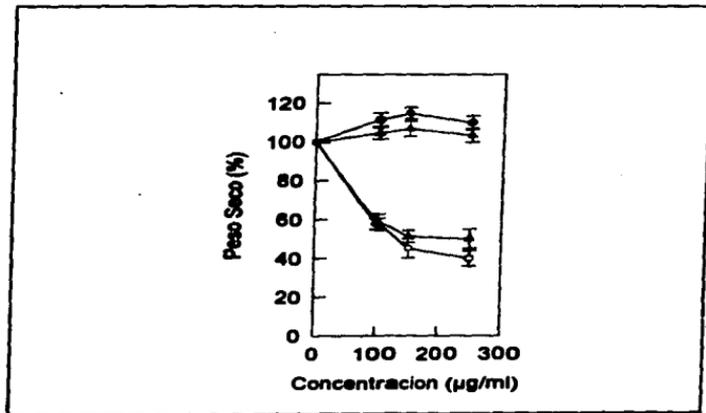


Figura 13. Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre el crecimiento de *Aspergillus* MGM-180 a 72 horas de cultivo, en diferentes concentraciones de 2-desoxi-D-glucosa a pH de 2.5 (●) y 6.5 (▲). Los círculos cerrados corresponden al crecimiento y los símbolos abiertos a la actividad.

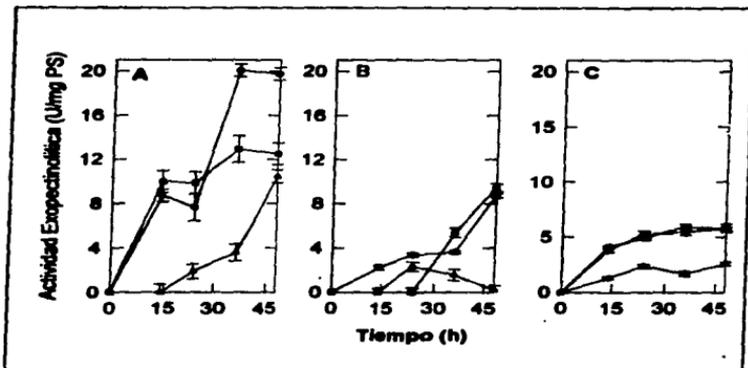


Figura 14. Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre la actividad exopectinolítica, cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono a valores de pH de 2.5 (A), 3.5 (B) y 6.5 (C). control (●), en presencia de glucosa (■) y en presencia de 2-desoxi-D-glucosa (▲) a una concentración de 250 µg/ml.

Si bien la presencia de desoxiglucosa ocasionó una disminución de la actividad exopectinolítica extracelular en todos los casos de alrededor de un 50% (fig. 14), intracelularmente (fig. 15), no se observaron grandes cambios por la presencia de la 2-desoxi-D-glucosa o glucosa siendo los mayores cambios observados en los niveles de ésta actividad se debidos al del pH inicial de cultivo.

Estos resultados sugieren que la disminución de la actividad exopectinolítica en presencia de 2-desoxi-D-glucosa fue debido a un probable efecto sobre la glicosilación de tipo O, dando como resultado una menor secreción, sin embargo la actividad intracelular no se modifica por la presencia de 2-desoxi-D-glucosa.

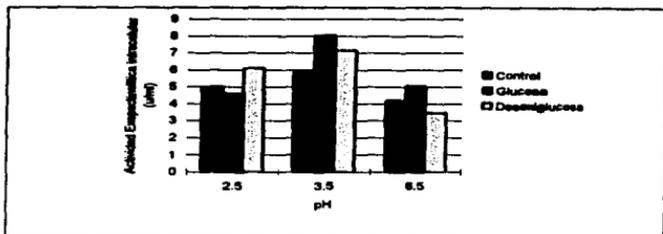


Figura 15. Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre la actividad exopectinolítica intracelular, cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono a valores de pH de 2.5, 3.5 y 6.5.

La producción de la actividad endopectinolítica, cuando el microorganismo fue cultivado a un valor de pH de 2.5, en presencia de desoxiglucosa o glucosa, mostró una disminución de más de un 80% en ambos casos (fig. 16 A). Mientras que a pH de 3.5 esta actividad fue muy baja, incluso en el control, aunque ésta actividad también es producida normalmente a éste valor de pH, es muy probable que el valor de pH de 6.5, al que se realizó el precultivo influyó en estos resultados, ya que esta actividad no se produce a este valor de pH (6.5). El hecho de que a pH de 2.5, la 2-desoxi-D-glucosa y glucosa causaran una disminución en la actividad pudo deberse a una represión catabólica sobre la producción de la actividad endopectinolítica, sin embargo esto no es muy claro, debido a que la concentración utilizada de estos azúcares fue baja, aunque es claro que la disminución de la actividad se debe a la presencia del azúcar y no a un efecto sobre la glicosilación. La actividad endopectinolítica intracelular no fue detectada en las células.

En estas condiciones de cultivo los niveles más altos de proteína fueron obtenidos a pH de 2.5, diferente a lo que sucedió en condiciones normales de cultivo (ver fig. 10), la presencia del inhibidor o la glucosa no afectaron la concentración proteica, sin embargo, mientras que a pH de 3.5 y 6.5 se presentó una reducción del 30 al 40% en relación a la proteína secretada a pH de 2.5 (fig. 17). Mientras que a pH de 3.5 y 6.5, en presencia de 2-desoxi-D-glucosa la concentración de proteína es menor. La proteína intracelular, al

contrario de lo que sucedió con la proteína extracelular, fue menor conforme el pH inicial del medio fue más (fig. 18). Esto sugiere que la liberación de proteína no está afectada por la glicosilación de tipo O-, sino por efecto del pH inicial del cultivo.

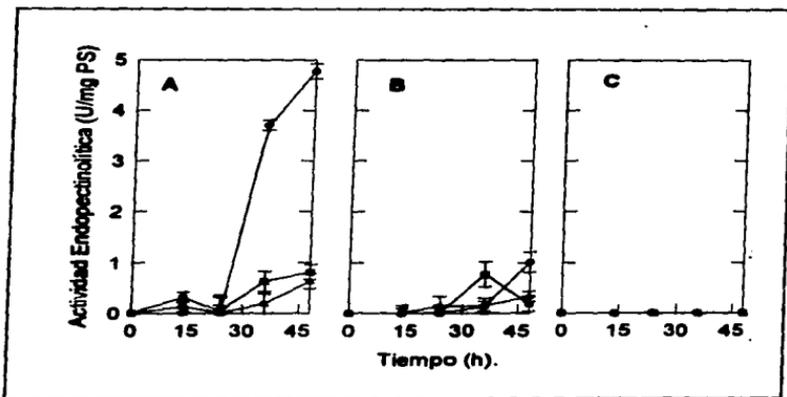


Figura 18. Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre la actividad endopectinolítica producida por *Aspergillus* MGM-180, cultivado sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono a valores de pH de 2.5 (A), 3.5 (B) y 6.5 (C). Control (●), en presencia de glucosa (■) y en presencia de 2-desoxi-D-glucosa (▲).

Al realizar la electroforesis desnaturizante correspondiente, con las muestras de filtrados obtenidas cuando el microorganismo fue cultivado a pH de 2.5, en presencia de 2-desoxi-D-glucosa, glucosa y en ausencia de estos azúcares, se observaron, para los tres casos, perfiles de corrimiento muy semejantes. El zimograma correspondiente mostró que cuando la única fuente de carbono es pectina, la única banda proteica que presentó actividad pectinolítica, tenía una masa molecular de 48 kDa, (fig. 19 líneas 1 y a), mientras que la presencia de desoxiglucosa en el medio de cultivo dio origen a dos bandas de proteína con

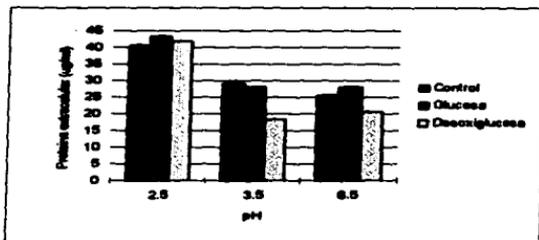


Figura 17. Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre la secreción de la proteína extracelular, cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono a valores de pH de 2.5, 3.5 y 6.5.

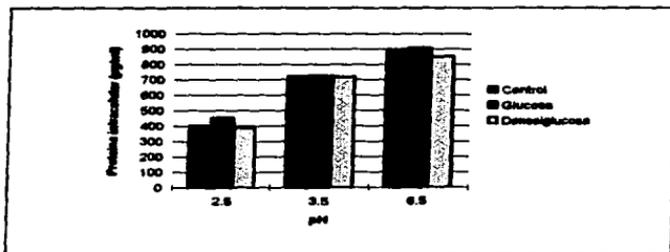


Figura 18. Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre la proteína intracelular, cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono a valores de pH de 2.5, 3.5 y 6.5.

actividad pectinolítica, las cuales presentaron una masa molecular de 48 y 45 kDa, (fig. 19 líneas 2 y b), en presencia de glucosa sólo se encontró una banda con actividad pectinolítica, la cual correspondió a la proteína de 48 kDa (fig. 19 líneas 3 y c).

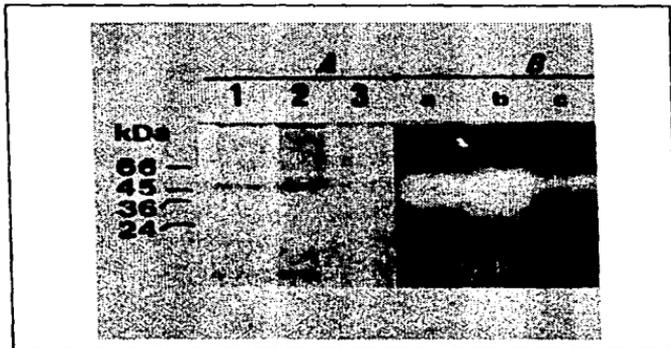


Figura 10. (A) Electroforesis desnaturalizante y (B) actividad pectinolítica in situ, de los filtrados del cultivo de *Aspergillus* MGM-180, crecido a pH de 2.5 sobre diferentes sustratos: pectina (1.0%) (líneas 1 y e), pectina (1.0%) adicionada con 2-desoxi-D-glucosa (0.025%), (líneas 2 y b), pectina (1.0%) con glucosa(0.025%), (líneas 3 y c).

Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de 2-desoxi-D-glucosa modifica la glicosilación parcial de las glicoproteínas en donde la segunda banda de 45 kDa correspondería a una proteína con menor grado de glicosilación, ocasionando una menor actividad pectinolítica, mientras que ésta diferencias en la glicosilación no parecen modificar la secreción de las proteínas extracelulares totales.

EFECTO DE LA TUNICAMICINA (TM) SOBRE LA SECRECION DE PECTINASAS.

La tunicamicina es un antibiótico ampliamente utilizado para la inhibición de la N-glicosilación. El empleo de este inhibidor es muy delicado ya que si el pH del medio se encuentra por debajo de un valor de pH de 6.0 este antibiótico se inactiva. Por dicha razón el microorganismo fue previamente cultivado a diferentes valores de pH inicial (2.5, 3.5 y

6.5), posteriormente el micelio fue cosechado y transferido a un medio fresco con un pH de 6.5 en donde se analizó el efecto de este inhibidor. Dos diferentes concentraciones de tunicamicina (20 y 30 $\mu\text{g/ml}$) fueron evaluadas sobre el crecimiento de *Aspergillus* MGM-180. Los resultados mostraron que a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, el micelio proveniente de pH 2.5 y 3.5 presentó una disminución en el crecimiento del 12 y 9 %, respectivamente (fig. 20), mientras que en micelio precultivado a pH de 6.5, el efecto fue mayor, presentando una reducción del crecimiento del 28%. Cuando la concentración fue de 30 $\mu\text{g/ml}$, el efecto tóxico en todos los casos fue muy marcado obteniendo una reducción en la concentración de la biomasa del 17, 29 y 57 a pH de 2.5, 3.5 y 6.5, respectivamente. Por lo anterior, se determinó que la concentración de TM más conveniente a utilizar era la de 20 $\mu\text{g/ml}$, para evaluar su efecto sobre la secreción de las pectinasas.

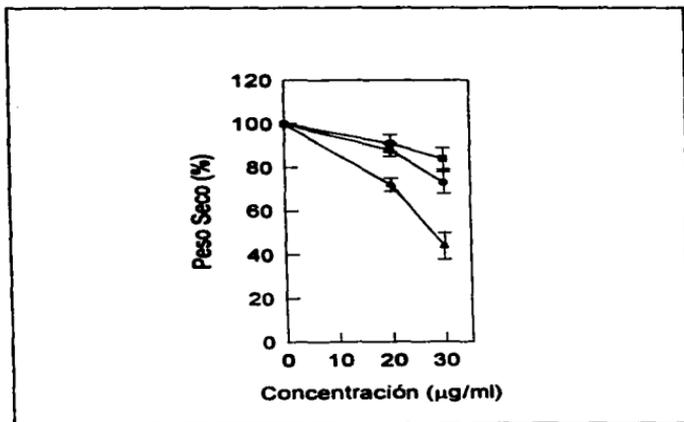


Figura 20. Efecto de la concentración de tunicamicina sobre el crecimiento de *Aspergillus* MGM-180, cultivado en diferentes concentraciones del inhibidor y a un valor de pH inicial de: 2.5(●), 3.5(■) y 6.5(▲).

En estas condiciones de ensayo la presencia de tunicamicina en el medio de cultivo, produjo un decremento en la actividad exopectinolítica obtenida con micelio precrecido a pH de 2.5 y 3.5. Con el micelio precrecido a pH de 2.5, a las 12 horas, se obtuvo un 33% de la actividad en comparación al control, mientras que a las 48 horas, se detectó un 67% de esta actividad en relación con respecto al control (fig. 21 A). Para el micelio precrecido a pH de 3.5 la actividad exopectinolítica en presencia de tunicamicina produjo a las 12 horas un 15% de actividad, la cual aumentó más lentamente, alcanzando el máximo a las 36 horas (fig. 21 B). Mientras que a pH de 6.5 (fig. 21 C), la actividad exopectinolítica intracelular no mostró diferencias significativas por la presencia de tunicamicina o por efecto del pH (fig. 22). Con lo que respecta a la actividad endopectinolítica en estas condiciones de cultivo no se detectó.

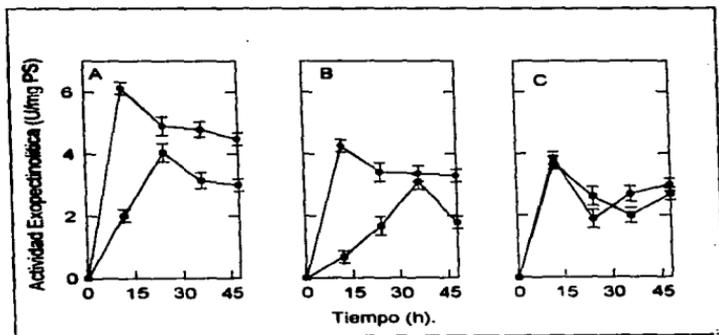


Figura 21. Efecto de la tunicamicina sobre la actividad exopectinolítica cuando *Aspergillus* MGM-160 fue cultivado sobre pectina (1.0%) a pH de 2.5 (A), 3.5 (B) y 6.5 (C), control (●) y con tunicamicina (■) a una concentración de 20µg/ml.

La evaluación del efecto de la tunicamicina sobre la actividad exopectinolítica sugirió que la glicosilación en posición N- afecta dicha actividad. Hay que notar que cuando el

microorganismo fue precultivado a pH de 2.5, la presencia de tunicamicina da como resultado niveles de actividad semejantes a los que se obtienen a pH de 3.5 en ausencia de este inhibidor. Lo sugiere que cuando el pH extracelular tiene un valor de 2.5, puede existir una modificación de la N-glicosilación dando lugar a proteínas extracelulares con un diferente grado de glicosilación, lo cual podría servir como protección a la proteína contra las condiciones adversas a las que se enfrentará en el ambiente extracelular.

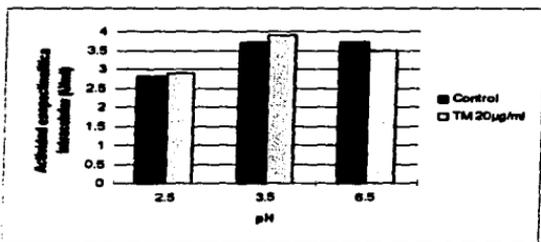


Figura 22. Efecto de la tunicamicina sobre la actividad exopectinolítica intracelular, cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado sobre pectina (1.0%) como única fuente de carbono a diferentes valores de pH inicial: 2.5, 3.5 y 6.5.

Por otro lado, cuando el microorganismo fue cultivado en presencia de glucosa a pH de 2.5, se observó una disminución de la actividad exopectinolítica, lo que sugiere que en estas condiciones de cultivo, este hongo es más susceptible a un efecto de represión catabólica, que a valores de pH menos ácidos. La presencia de 2-desoxi-D-glucosa tuvo un mayor efecto sobre la actividad en los tres valores de pH probados, lo que no sucedió con glucosa, por lo que esta disminución en la actividad exopectinolítica no se puede atribuir totalmente a un efecto de represión catabólica. Seguramente el hecho de que las proteínas, en particular las pectinasas, se encuentren total o parcialmente desglicosiladas en la posición O-, es la causa de una disminución en la actividad pectinolítica. Sin embargo, este tipo de glicosilación no afectó la retención o la salida de este tipo de enzimas del interior de la célula.

El hecho de que el micelio haya provenido de un medio con un valor de pH de 6.5, posiblemente afectó la síntesis de estas enzimas. Cuando el micelio se trasladó a un medio fresco con valores de pH de 3.5 y 6.5, es posible que el pH intracelular no sufriera una alteración marcada, por lo que estas enzimas no se produjeron, pero cuando el medio fresco tuvo un valor de pH de 2.5, existió un cambio importante en el pH intracelular, lo que posiblemente produjo que la actividad endopectinolítica apareciera después de las 24 horas, tiempo en el cual probablemente el sistema homeostático sufriera un desequilibrio, a este valor de pH (2.5). En la actividad endopectinolítica se produjo el mismo efecto tanto en presencia de glucosa como de 2-desoxi-D-glucosa. Quizás esto pueda deberse a un efecto de represión catabólica sobre las pectinasas de tipo endo y no a un efecto sobre la glicosilación.

Es posible que la presencia de azúcares unidos en posición O-, a las enzimas pectinolíticas de tipo exo, son importantes para su actividad, lo que no pudo observarse para las enzimas de tipo endo quienes al parecer son más sensibles a la represión catabólica. El efecto de la 2-desoxi-D-glucosa, no afectó la síntesis de las proteínas totales, ni la secreción proteica por *Aspergillus* MGM-180 contrario a lo reportado por Kuo y Lampen (1972), Kubicek *et al.* (1987), y Sánchez *et al.* (1992), quienes para otros sistemas enzimáticos encontraron que este tipo de glicosilación era importante no tanto para la actividad, sino para la secreción.

Al parecer la delección total o parcial de la N-glicosilación afecta a la actividad exo y endopectinolítica, teniendo un mayor efecto a pH de 2.5 y 3.5. Es importante notar que a pH de 2.5 en presencia de tunicamicina, los niveles de actividad exopectinolítica, son similares a la actividad producida a pH de 3.5, en ausencia de este inhibidor, aunque el tiempo en el que alcanzan su máximo de actividad es diferente. Es muy probable que la presencia de tunicamicina a pH de 2.5 dé como resultado exopectinasas con patrones de glicosilación semejantes a las que se dan a valores de pH menos ácidos, aunque esto no fue probado en el presente trabajo. Por otro lado, no existió una retención de la actividad exopectinolítica en el interior de la célula debida a la presencia de tunicamicina.

La actividad obtenida a pH de 2.5, en presencia de 2-desoxi-D-glucosa o tunicamicina, fue semejante a la que se produjo, sin ninguno de estos inhibidores a pH de 3.5 ó 6.5. Esto

podiera ser debido a que la glicosilación en condiciones de acidez extrema sea diferente a la que se produce a pH de 3.5 y 6.5, lo que podría ocurrir por las diferencias tan grandes en el pH interno. Sin embargo, los patrones de glicosilación en las diferentes condiciones de pH de cultivo no fueron analizadas.

CAPITULO

5

CONCLUSIONES

La respuesta al estrés inducido por pH ácido, la cual es traducida como una reducción en el crecimiento y un incremento en la actividad producida, es una característica muy conservada en hongos del género *Aspergillus*, tanto en cepas silvestres como cepas de colección, aunque cada cepa presenta un nivel diferente de respuesta.

La producción y secreción de las pectinasas de *Aspergillus* MGM-180 está afectada pH del medio, siendo la actividad endopectinolítica la más perjudicada produciéndose en un rango muy estrecho de pH, mientras que la actividad de tipo exo se produce en todos los valores de pH analizados.

Aspergillus MGM-180, posee un control homeostático de pH muy eficiente, el cual es capaz de mantener el pH interno casi constante en un amplio rango de pH externo, el cual fue de 3.5 a 7.0. Sin embargo a valores de pH más ácidos la eficiencia de este control disminuye notablemente, causando una baja en el pH interno.

La alteración en el ambiente intracelular ocasionada por la baja en el pH interno, cuando *Aspergillus* MGM-180 fue cultivado a pH de 2.5, afectó la síntesis de un número importante de proteínas extracelulares, aumentando también la secreción de pectinasas.

El cambio del pH intracelular dio como resultado una modificación de los patrones de secreción, independientemente de que si las proteínas estuvieran glicosiladas, lo que sugiere

que aunque es posible que el pH intracelular pueda alterar la glicosilación, esta no incluye sobre la secreción de estas enzimas.

La presencia de la 2-desoxi-D-glucosa, produce un decremento en la actividad pectinolítica, tanto endo como exo, sin embargo esta no modifica la secreción de las enzimas. Por lo que es probable que la glicosilación de tipo O- sea importante para la actividad, pero no tiene relación con el efecto observado, de estrés por pH.

La tunicamicina modificó la actividad exopectinolítica extracelular cuando el pH del medio fue de 2.5 y 3.5, pero no a pH de 6.5, mientras que la intracelular permaneció constante. Sin embargo, con estos datos no nos es posible concluir el posible efecto de la tunicamicina sobre la secreción

REFERENCIAS

- Aguilar, G. Trejo, B.A. García, J.M. and Huitrón. C. (1991). Influence of pH on endo- and exo-pectinases production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.*, **37**:912-917.
- Al-Awqati, Q. (1986). Proton-translocating ATPases. *Ann.Rev. Cell. Biol.*, **2**:179-199.
- Booth, I.R. (1985). Regulation of Cytoplasmatic pH in Bacteria. *Microbiol Reviews*, **49**(4):359-378.
- Brok, T. D. y Madigan, M. T. (1993). El crecimiento y su control, *Microbiología*, 6^{ta}. ed. Edit. Prentice Hall, México DF. Cap. 9. pp. 349-350.
- Caddick, M. X., Brownlee, A.G. and Arst, H. N. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. genet.*, **203**:346-353.
- Cobley, J.G. and Cox, J.C. (1983). Energy Conservation in Acidophilic Bacteria. *Microbiol. Reviews*, **47**(4): 579-595.
- Chou, F.K., Trimble, R. B. And Maley, F. (1978). The Effect of Carbohydrate Depletion on the Properties of Yeast External Invertase. *J. Biol. Chem.*, **24**(25):8691-8693.
- Fogarty, W.M. and Ward, O.P. (1974). In *Progress indust. microbiol.*, **13**:59-119.
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. (1982). *Microb. Enzymes Biotechnol. Ed. Applied science publishers.* London and N.Y. Cap. 3. pp. 131-182.
- Fogarty, W.M. (1994). *Enzymes of Genus Aspergillus. Aspergillus, Biotechnology Handbooks Vol. 7.* Editado por Smith, J.E. Ed. Plenum Press, USA. N.Y. Cap. 7. pp 177-218.
- Furakawa, K. and Kobata, A. (1992). Protein glycosylation. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, **3**:554-559.
- Gancedo, J. M. (1988). Approaches to the study of catabolite repression in yeast. *FEMS Microbiol. Reviews*, **41**-44.
- Guerra, G. S. y Urribe, S. C. (1995). Las ATPasas de protones en los hongos., *Ciencia*, **46**:483-503
- Jenkins, N. and Curling, E.M.A. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**:354-364
- Krátáry, Z., Biely, P. and Bauer, S. (1975). Mechanism of 2-Deoxy-D-Glucose Inhibition of Cell-Wall Polysaccharide and Glycoprotein Biosyntheses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **54**:459-467.

- Kilara, A. (1982). Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review.; *Process. Biochem.*, 17(149):35-41.
- Kuo, S. C. and Lampen, J. O. (1972). Inhibition by 2-Deoxy-D-Glucose of synthesis of Glycoprotein Enzymes by Protoplasts of Saccharomycetes: Relation to Inhibition of Sugar Uptake and Metabolism. *J. of Bacteriol.*, 2:419-429.
- Kozakiewicz, Z. and Smith, D. (1994). *Physiology of Aspergillus Aspergillus*, Biotechnology Handbooks Vol. 7, Editado por Smith, J.E. Ed. Plenum Press, USA. N.Y. Cap. 2. pp 23-40.
- Kubicek, C.P., Panda, T., Schrefel-Kunar, G., Gruber, F., and Messner, R. (1987). O-linked but not N-linked glycosylation is necessary for the secretion of endoglucanases I and III by *Trichoderma reesi*. *Can.J.Microbiol.*, 33:698-703.
- kurowsky, W., and Dunleavy, J.A.; (1976). Cellular and enviromental factors affecting the syntesis of polygalacturonate lyase by *Bacillus subtilis*. *Eur. J. of Appl. Microbiol.*, 2:103-112.
- Lamar, R. T. (1992). The role of fungal lignin-degrading enzymes in xenobiotic degradation. *Curr. Opinion Biotech.*, 3:261-266.
- Laemmli. (1970). U.K; Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin-phenol reagent. *Journal. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- MacMillan, J. D. Phaff, H. J. and Vaughn, R. (1964). The pattern of action of a exopolysaccharuronic acid-trans-eliminase produced by *Clostridium multifementans*. *Biochem.*, 3:572-578.
- Maldonado, M.C. Navarro, A. and Callier, D.A.S (1986). Production of pectinases by *Aspergillus* sp. using differently pretread lemon peel as the carbon source. *Biotechnol. Lett.*, 8(7):501-504.
- Martin, B.L. (1993). Enzyme-Catalyzed covalent modification reactions: an overview. *Biochemistry LabFax*. Edited by Chambers, J.A.A. and Rickwood, D. Ed. Blackwell Scientific Publications.UK., pp 215-245.
- Merivuori, H. Sands, J. A. and Montencourt, B. S. (1985). Effects of tunicamycin on secretion and enzymatic activities of cellulases from *Trichoderma reesi*. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 23:60-66
- Mijares, C.A., Trejo-Aguilar, B.A., Aguilar, G. and Viniestra, G.G. (1997). Physiological comparasion between pectinase-producing mutans of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerd fermentation. *Enzyme and Microb. Technol.* en prensa.

- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**:426-428.
- Myrold, D.D and Nason, G.E. (1992). Effect of rain on soil microbial processes, *Environmental Microbiology*. Editado por Mitchell, R. Ed. Wiley-Liss. USA. pp 59-81.
- Nahas, E. Terenzi, H.F. and Rossi, A. (1982). Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (E.C.3.1.3.2) and alkaline phosphatase (E.C.3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. *J.Gen. Microbiol.*, **128**:2017-2021.
- Olson, E.R. (1993). Influence of pH on bacterial gene expression. *Molecular Microbiol.*, **8**(1): 5-14.
- Rios, S., Fernández-Monistrol, I. and Laborda, F. (1994). Effect of tunicamycin on α -galactosidase secretion by *Aspergillus nidulus* and importance on N-glycosilation. *FEMS Microbiol. Letters*, **120**: 169-176.
- Rombouts, F.M. and Pilnik, W. (1980). Economic microbiology. microbial enzymes and bioconversiones. Ed. Academic press. N.Y. vol. 5 pp. 227- 282.
- Rose, A. H. (1977). El medio ambiente, *Microbiología química*. Introducción a la fisiología microbiana. 2ª. ed. Ed. Alhambra. Madrid España. pp 139-140.
- Sánchez, A., Villanueva, J.R. and Villa, T.G. (1982). Effect of tunicamycin on Exo-L, 3-b-D-glucanase Synthesis and secretion by cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. General Microbiol.*, **128**: 3051-3056.
- Tilburn, J., Sovan, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Peñalva, M.A. and Arst, H.N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline- expressed genes by ambient pH. *EMBO*, **14**(4):779-790.
- Voett, D. y Voet, J.G. (1992). Glucoproteínas. *Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona España. pp 280-289, 612-619.
- Ward, M. (1991). *Aspergillus* and Other Filamentous Fungi as Genetic Systems, *Modern Microbial Genetics*. Ed. Wiley-Liss. Inc. USA. pp 455-466.
- Whitaker, J.R. (1984). Pectic substances, pectic enzymes and formation in fruit juices; *Microb. Technol.*, **6**:341-349.
- Wösten, H. A. B. Moukha, S. M. Siestsma, J. H. and Wessels, G. H. (1991). Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J. of General Microbiol.*, **137**:2017-2023.