

00562
14
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION DE ALGUNOS INDUCTORES DE
LAS PECTINASAS EXTRACELULARES PRODUCIDAS
POR *Aspergillus* sp FP180

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
QUE PRESENTA:
IBQ. BLANCA ROSA RODRIGUEZ PASTRANA



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

963326



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio y con el apoyo de CONACYT (proyecto IF-259) y DGAPA (IN209194)

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

Dr. Guillermo Aguilar Osorio.

Dr. Federico García Jimenez.

Dr. Jorge Calderón Jimenez. †

Por sus valiosos comentarios para la realización de este proyecto.

Gracias al jurado integrado por:

Dr. Eduardo Barzana Garcia,

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte,

Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

Dr. Federico García Jimenez,

Dr. Leobardo Serrano

Por su evaluación rápida del presente trabajo y por todos sus comentarios.

Al recuerdo de mi Madre, por su incansable lucha por la vida,

A mi familia, Fernando, Marcela, Pepe, María, Clemente y Lucía, por su confianza depositada en mí y que han logrado infundirme la fe necesaria, y a todos mis sobrinos, por su alegría compartida.

Agradecimientos

Con mi mayor gratitud al Dr. Guillermo Aguilar y a Blanca Trejo, por haberme apoyado incondicionalmente en todo cuanto necesité, sin dejar de mencionar su paciencia y apreciable amistad.

Agradezco al Dr. Federico Garcia Jimenez por su ayuda invaluable, su tiempo y espacio dedicado a este trabajo.

Como un pequeño homenaje póstumo al Dr. Jorge Calderón que ha dejado una huella inolvidable en este proyecto.

Con mi agradecimiento a la Dra. Farres, por el gran apoyo que me ha brindado.

Agradezco a mis compañeros de Laboratorio, Luis, Marty, Berenice, Tere, Leo, y Norma, por hacerme más grata mi estancia en el laboratorio.

También agradezco a mis compañeros de generación, especialmente a Lety, por su amistad, su ayuda desinteresada y calidez humana.

A mi entrañable amiga Carmen, por el cariño que nos ha unido siempre y cada día más, por compartir sus sueños y aspiraciones.

Agradezco a Arturo Navarro, Agustín Reyo, al Dr. Manuel Jimenez , a Marco Antonio Ortiz, Juan, Lety García y a todas las personas que de una u otra forma me brindaron su ayuda y su tiempo, haciendo posible la realización de esta tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades sobre pectina	1
Complejo enzimático pectinolítico	11
Género <i>Aspergillus</i> como modelo de producción de pectinasas	17
Generalidades sobre regulación de biosíntesis de enzimas	19
OBJETIVO	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Microorganismo.....	28
Medios y condiciones de cultivo.....	28
Inducción con esporas.....	29
Inducción con micelio.....	29
Actividades pectinolíticas.....	30
Crecimiento celular.....	30
Medición de grupos reductores.....	31
Electroforesis desnaturalizante y actividad "in situ".....	31
Esterificación del ácido galacturónico.....	32
Cromatografía en capa fina.....	33
Digestión de pectina.....	33
Digestión química.....	33
Digestión microbiológica.....	34
Digestión enzimática.....	34
Resonancia magnética nuclear e infrarrojo.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Utilización de esporas como sistema de inducción.....	36
Obtención de productos de hidrólisis y su evaluación como inductores.....	47
Utilización de micelio como otro sistema de inducción.....	56
Perfiles electroforéticos de las enzimas pectinolíticas producidas por <i>Aspergillus</i> sp FP180.....	63
Efecto de derivados metoxilados del ácido galacturónico en la producción de enzimas pectinolíticas.....	67
DISCUSION GENERAL	72
CONCLUSIONES	74
ANEXO	76
BIBLIOGRAFÍA	88

v

RESUMEN

En este trabajo, pretendemos identificar algunos inductores del sistema enzimático pectinolítico de *Aspergillus* sp FP180, determinar el efecto de diferentes azúcares constituyentes de la pectina como ramnosa, galactosa y arabinosa, sobre la producción de endo y exopectinasas, así como evaluar algunos productos de la degradación de la pectina o el ácido poligalacturónico como posibles inductores.

Se comparó la producción de enzimas pécticas con aquellas producidas con pectina (P) y con ácido poligalacturónico (APG). De igual manera se estudio el efecto de la unidad principal constituyente de estos polisacáridos, el ácido galacturónico (AG), además de combinaciones de APG, P o AG con ramnosa sobre la producción de actividades pectinolíticas.

Se utilizaron dos sistemas de inducción, a partir de conidias y a partir de micelio precrecido en glucosa.

Los resultados en ambos sistemas de inducción sugieren los productos esterificados que inducen enzimas pectinolíticas de tipo endo y que el APG, producto no esterificado; es un inductor de enzimas de tipo exo. A diferencia del segundo sistema de inducción, en el primero existe una degradación inicial de sustrato, durante las primeras 24 horas, sugiriendo que es producto de una actividad preformada.

Se demostró que las pectinasas producidas por *Aspergillus* sp FP180 son sensibles a la represión por AG a una concentración de 1%. Mientras que a concentraciones de 0.5% de AG estimulan la secreción de exopectinasas.

Se obtuvieron 7 derivados metoxilados del AG en el laboratorio, utilizados como única fuente de carbono en el sistema de inducción a partir de micelio. El derivado número 5, que de acuerdo a los análisis de RMN está esterificado en el carbono 6, induce tanto la exo como la endo, lo cual confirma el papel del grupo metoxilo en la producción de actividad endopectinolítica.

No hay producción de enzimas pectinolíticas cuando se encuentran en el medio de cultivo el glicerol o azúcares simples como galactosa, arabinosa, ramnosa o glucosa, indicándonos que no hay enzimas pectinolíticas constitutivas en *Aspergillus* sp FP180.

Así mismo, encontramos que la ramnosa reprime la síntesis de algunas pectinasas entre 50 y 70 kDa y que la pectina induce tanto la exo como la endopectinasa.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES SOBRE PECTINA.

En 1825 el químico francés Braconnot descubrió una sustancia, la cual parecía ser la responsable del gelado que se observa cuando ciertas mezclas de frutas son cocinadas con azúcar; le dió el nombre de pectina. Ésta es derivada de la palabra griega "pektos" que significa rígido o firme, para referirse a su función principal de formar geles (Serrano, 1985).

Las sustancias pécticas son un grupo de carbohidratos complejos extraídos a partir de vegetales, contienen grandes cantidades de ácido anhidrogalacturónico, como unidad principal. Éstas sustancias forman cerca de una tercera parte de la pared celular en peso seco de plantas dicotiledóneas y de algunas monocotiledóneas.

Según la nomenclatura de la American Chemical Society (Fogarty y Ward, 1974 Sakai, 1992), las sustancias pécticas son polisacáridos ácidos de propiedades coloidales constituidas por unidades de ácido galacturónico unidas por enlace α (1-4) cuyos grupos carboxilo pueden estar esterificados parcial o totalmente con grupos metilos o neutralizadas por una o más bases (Kertz, 1955) (Fig. 1).

La protopectina es el nombre dado a las formas insolubles de las sustancias pécticas. La pectina, material soluble, es el ácido péctico parcialmente esterificado con metanol que contiene algunos azúcares neutros tales como, galactosa, arabinosa o ramnosa entre otros. El tipo y cantidad de éstos, depende básicamente del origen de las sustancias pécticas. (Fig. 2 y 3).

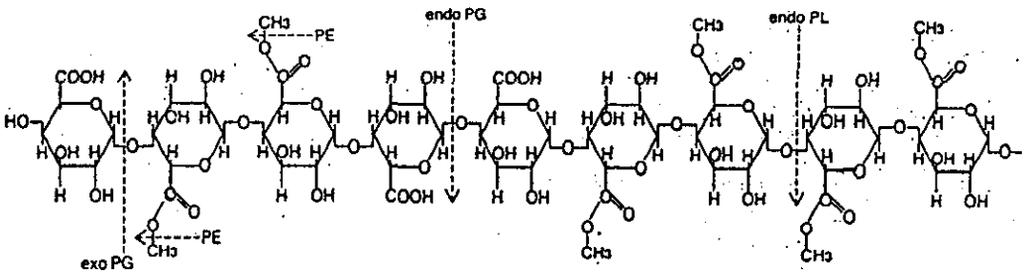


Fig 1. Estructura química de la pectina y nombre de algunas enzimas pectinolíticas que participan en la hidrólisis. EndoPG, endopectinasa; exoPG, expectinasa; endoPL, endopectinliasa.

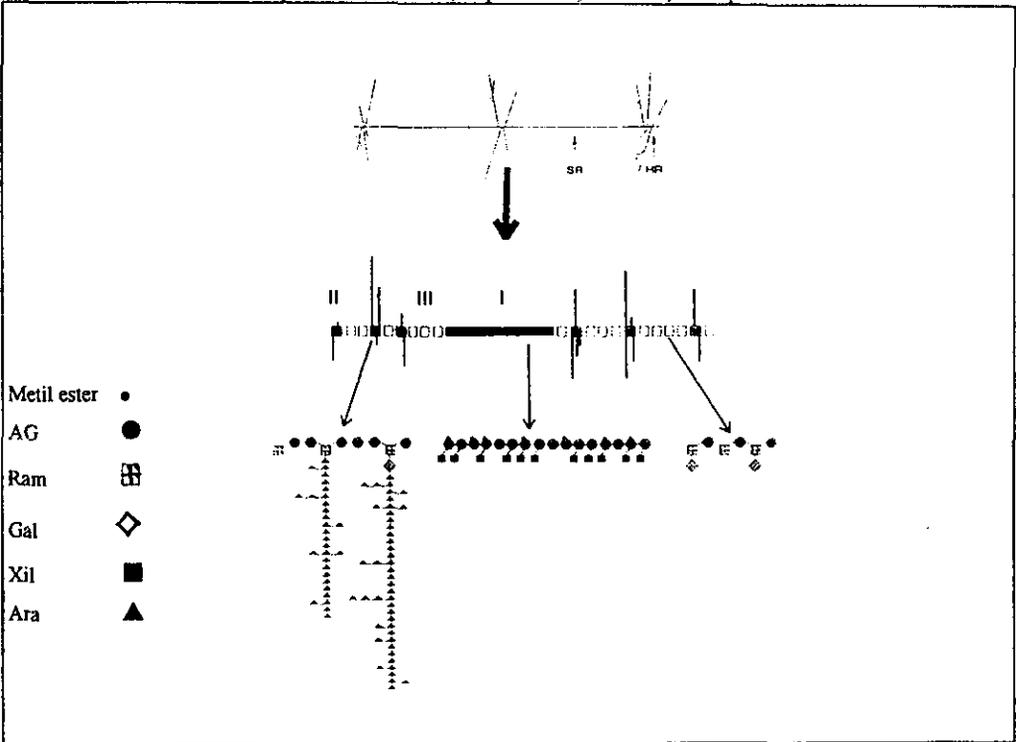


Fig 2. Estructura hipotética de pectina de manzana, SR, regiones suaves; HR, regiones duras; I.- subunidad I, compuesta por xilogalacturonanos; II.- subunidad II rica en arabinosa; III.- subunidad III, con oligómeros de ramnogalacturonanos. La distribución de grupos acetilo no está presente, pero existen evidencias que se encuentran en la subunidad III. (tomado de Schols y Voragen, 1996).

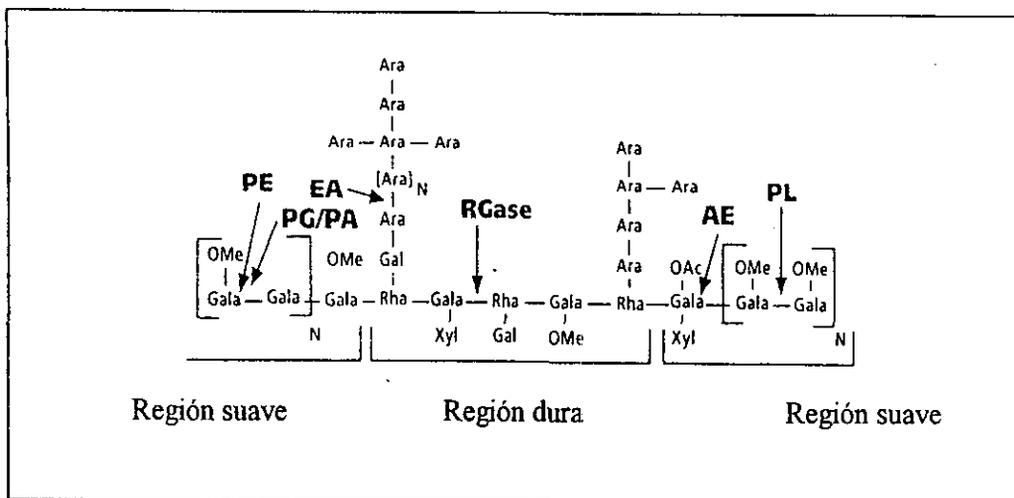


Fig 3. Representación esquemática de la estructura de las regiones suaves y duras de la pectina, incluyendo el punto de ataque de varias pectinasas. PE, pectinesterasa; PG, poligalacturonasa; PL, pectin-liaza; EA, endo-arabinasa; Rgase, ramnogalacturonasa; AE, pectin-tiliesterasa; PA, pectatoliasa. (tomado de Hennink, 1996).

Acido péctico, es el nombre aplicado a las sustancias pécticas solubles, compuestas de ácido galacturónico y esencialmente libre de grupos metil-éster. Las sales de ácido péctico son llamadas pectatos ácidos.

La mayor parte de las sustancias pécticas son simultáneamente carbohidratos reductores, alcoholes polihídricos, poliácidos y poliésteres. Ellos contienen grupos polares (carboxilos), fácilmente removibles y grupos no polares (metilos). (Walter, 1991).

Las concentraciones más altas de pectina en las plantas son observadas en la lámina media, con una disminución gradual cuando pasa a través de la pared primaria hacia la membrana plasmática.

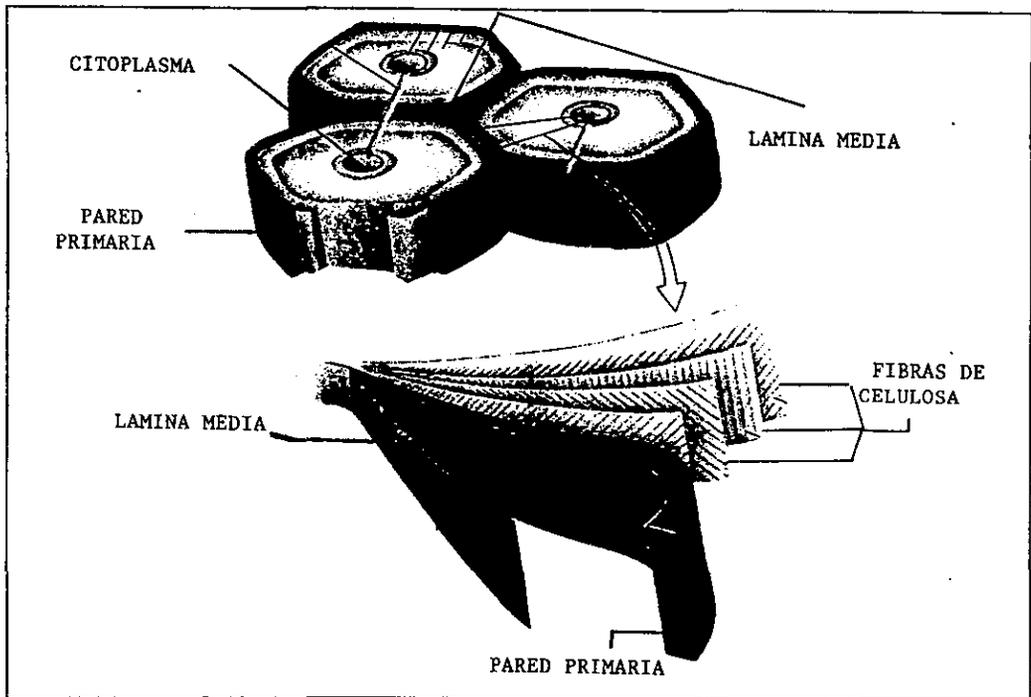


Fig 4. Estructura de la pared celular vegetal primaria con la serie de capas de celulosa y de la lámina media. (tomado de Darnell, 1990).

Las sustancias pécticas contribuyen a la adhesión las células vegetales y también a la fuerza mecánica de la pared celular.

La textura de vegetales y frutas es fuertemente influida por la cantidad y naturaleza de las sustancias pécticas presentes. Cuando la fruta no está madura, se presenta como protopectina, que es insoluble, la cual es transformada en pectina soluble durante la maduración e interviniendo también en la abscisión del fruto. (Van Buren, 1991).

La pared celular vegetal contiene aproximadamente 40% de polímeros, de los cuales,

las pectinas representan del 8 a 14% (W/W) (Walter, 1991).

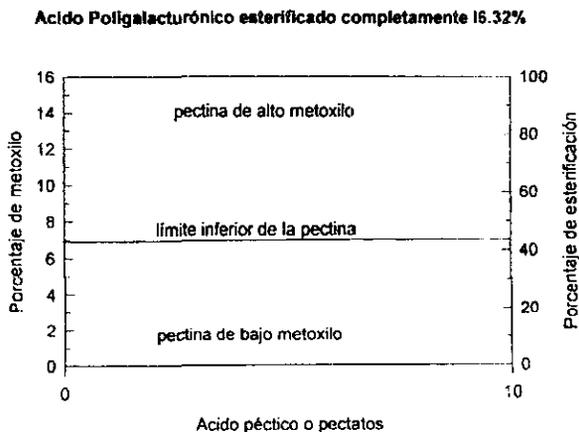
En estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), modelamiento computacional y difracción de rayos X sugieren que las moléculas de pectina en solución adoptan una configuración helicoidal, con 3 unidades de monosacárido por vuelta. La estructura regular helicoidal es interrumpida por residuos de ramnosa, afectando la capacidad de gelado (Oakenfull, 1991).

En estado sólido, la pectina se presenta como hojas paralelas con hélices adyacentes con simetría opuesta.

GRADO DE ESTERIFICACION DE LA PECTINA

El número y distribución de los grupos carboxilos libres o no esterificados dentro de la región de galacturonanos es variable según la especie, tejido y madurez de los vegetales.

La clasificación general basada en el grado de esterificación se presenta en el siguiente esquema:



Las pectinas de baja metoxilación son más estables al calor y a la humedad a diferencia de las pectinas de alto grado de metoxilo, las cuales tienen una tendencia a desesterificarse, principalmente a elevadas temperaturas (Pilgrim y col. 1991, Rinaudo 1996, Goldberg y col. 1996, Rolin, 1993).

De acuerdo a ello, las propiedades de los agregados, geles o precipitados de pectina son diferentes. Así pues, la pectina forma dos diferentes tipos de geles: a) Las pectinas de bajo metoxilo que necesitan de Ca^{+2} para gelificar y b) Las pectinas de alto metoxilo que necesitan un medio ácido y azúcar (Oakenfull, 1991, Rinaudo, 1996).

El uso comercial más importante de la pectina es en la fabricación de mermeladas y jaleas. También se utiliza en la industria farmacéutica como lubricante de algunos alimentos al pasar por la pared intestinal, ya que promueve el peristaltismo sin ocasionar irritación, en tratamientos de diarrea y disentería, quizás debido a que los productos de su degradación tienen propiedades bactericidas (Walter, 1991).

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE PECTINA

Una prueba histológica para la detección de pectina es mediante tinción con rojo de rutenio (oxicloruro de amonio rutenio), que resultan en un color rosa; cuando se trata de lignina y celulosa el color es gris. La presencia de mucilagos y gomas que contienen acidos urónicos interfieren en la reacción.

La pectina acuosa, calentada y en medio fuertemente alcalino, transmuta a amarillo a través de una serie de eventos químicos (beta eliminación, despolimerización,

enolación y oxidación) Estas reacciones son las bases de las pruebas para carbohidratos reductores.

Otra forma de detección de pectina es la precipitación, dada su propiedad de ser insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos. De igual manera, la formación de cromóforos, como ya se ha señalado anteriormente. También está la descarboxilación, indicando la presencia de ácidos urónicos, al formarse CO_2 , siendo éste método considerado ser cuantitativamente más exacto que métodos colorimétricos, pero más tedioso y complejo. También se puede medir el grado de esterificación por titulación, determinando la concentración del metanol y por reducción del cobre.

Otros métodos son: eléctricos, espectrofotométricos, espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear o determinando mecánicamente la firmeza del gel de pectina por su tendencia a colapsarse.

DESPOLIMERIZACIÓN DE PECTINA

La pectina es susceptible a la degradación en condiciones ácidas, neutras o alcalinas; así mismo, pueden obtenerse oligómeros de ácido poligalacturónico de diferentes grados de polimerización con métodos enzimáticos (Nothnagel y col. 1983. Ros y col. 1995). Se han reportado diferentes bioactividades de estos oligourónidos de acuerdo a su grado de polimerización, como inhibición de proteinasas, elicitores de fitoalexinas, inductores de la biosíntesis de fitohormonas, y estabilizadores de la turbidez de jugos, entre otras. (Ven-Meng y col. 1994, Naohara y Manabe, 1992, Melotto y col. 1996, Zabolina y col. 1996).

Después de las etapas de degradación de la pectina, la identificación y purificación de

los oligómeros, para realizar estudios sobre sus bioactividades, se puede llevar a cabo mediante diferentes tipos de cromatografía, ultrafiltración etc. (Dinnella y col. 1996).

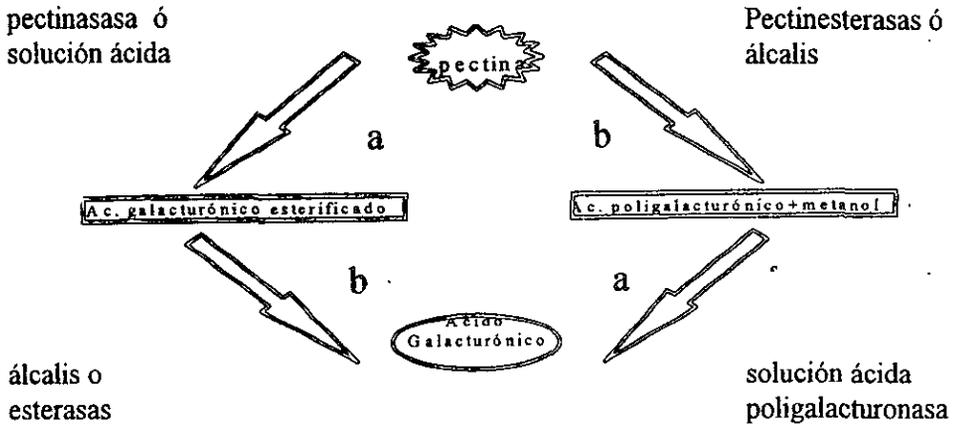
La hidrólisis química de las uniones glicosídicas, se denomina de doble desplazamiento, ya que genera grupos reductores finales con la misma configuración anomérica, mientras que la hidrólisis enzimática se ha llamado de desplazamiento simple, la cual invierte la configuración anomérica de los grupos reductores finales, con excepción de una digalacturonohidrolasa de *Selenomonas ruminantium* (Biely y col. 1996).

Renard y Thibault (1995) ha reportado evidencias sobre las moléculas que se producen con un tratamiento en condiciones alcalinas de pectina altamente metoxilada. En estas condiciones, se producen 2 reacciones competitivas, una de β -eliminación y otra de desmetoxilación por saponificación. Esta competencia es modulada por temperatura y pH. A mayor temperatura se favorece la reacción de β -eliminación, mientras que si el pH aumenta se favorece la desmetoxilación, teniendo en cuenta que a temperatura ambiente y a pH entre 9 y 11 pueden ocurrir ambas reacciones (Konno y col. 1980, Ven Meng y col. 1994).

Albersheim y col. (1960) mencionan que la susceptibilidad de la pectina a la degradación en amortiguadores neutros (pH 6.8) está determinada por la presencia de sus metil-ésteres con formación de compuestos insaturados.

La despolimerización de la pectina puede ocurrir a pH's neutros, o débilmente ácidos y temperaturas elevadas.-(Hotchkiss y Hicks, 1990, Simms y col. 1995, Rolin, 1993).

Estas reacciones son resumidas en el diagrama siguiente:



- a) ruptura o hidrólisis
- b) desmetilación o desesterificación.

Esquema modificado de UNIPECTINE, 1969.

También puede haber despolimerización de pectina con diazometano en presencia de pequeñas proporciones de amortiguador de fosfatos. Esto ocurre por β -eliminación. A la vez ocurre la metilación en condiciones anhidras, aunque la metilación puede ocurrir en otros grupos hidroxilos alcohólicos. (Inouie y col. 1987).

Denev y Kratchanov (1996) mencionan ciertas ventajas de la desesterificación con amonio, por su reacción rápida y controlada, además de que no hay necesidad de equipo especial comparado con la desesterificación con NaOH. También se evita la β eliminación que ocurre en la desesterificación-despolimerización alcalina con NaOH.

Las enzimas puras y bien caracterizadas son también una herramienta poderosa para romper con exactitud las uniones glucosídicas, pues actúan de acuerdo a la especificidad de éstas, ya sea liberando grupos metilo de los carboxilos, o hidrolizando, en ciertos casos con formación de un enlace insaturado entre el C4 y C5. Estas enzimas pécticas se distinguen por su preferencia al ácido péctico o pectina y varían según su punto de ataque, siendo exo si el ataque es en el extremo del polímero, o de tipo endo si la ruptura es aleatoria dentro de la cadena.

En 1952, Luh y Phaff reportaron la primera separación de ácidos oligogalacturónicos por cromatografía, y desde entonces varias técnicas cromatográficas se han utilizado en escala analítica (Hotckiss y col. 1991). Se ha utilizado desde cromatografía de capa fina (TLC) hasta las cromatografías de alta presión (HPLC), pasando por filtración en gel (HPGF), intercambio aniónico, fuerte y/o débil, intercambio catiónico con o sin detector de pulsos amperímetros (HPAEC-PAD), fase reversa de par-iónico, combinadas con las cromatografías de exclusión, con mayor o menor resolución y diferentes grados de polimerización, desde 2 hasta 50 unidades (Liu y Luh, 1978, Naohara y Manabe, 1992, Voragen y col 1982, Spiro y col. 1993, Hotckiss y coll.1991).

Para un análisis de composición de estos oligómeros (OLGA's) y su peso molecular, puede realizarse una resonancia magnética nuclear (RMN) o espectroscopía de masas con bombardeo de átomos (FAB-MS) (Tjan y col. 1974).

COMPLEJO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO

No es sorprendente que siendo las sustancias pécticas polisacáridos complejos que forman cerca de una tercera parte de la pared celular en peso seco de plantas, las enzimas capaces de degradar tales estructuras sean tan variadas y su mecanismo de acción diferente una de otra.

La clasificación de este complejo enzimático se presenta en la tabla 1. Habría que mencionar que se han encontrado enzimas que actúan sobre la región de ramnogalacturonanos, o sea, en la llamada región "dura"; dentro de estas enzimas se han reportado las ramnogalacturonasas A y B (Beldman y col. 1996).

Las enzimas pectinolíticas se encuentran normalmente en frutas y vegetales, pero también están presentes en bacterias, levaduras y hongos, aunque un solo organismo no es capaz de producir todas las enzimas simultáneamente. Encontramos algunos organismos como hongos del género *Aspergillus* que producen al menos 4 diferentes tipos de pectinasas con diferentes actividades, dos de ellas con importancia industrial (tabla 2).

Tabla 1.

CLASIFICACION DE ENZIMAS PECTINOLITICAS

1. Desesterificantes. Catalizan la desesterificación de los grupos metoxilo de la pectina para formar ácido péctico.

1.1 Pectinesterasa

2. Enzimas despolimerizantes.

2.1 Hidrolasas. Enzimas que hidrolizan las uniones glicosídicas.

2.1.1 Pectinasas. Por su preferencia al substrato de pectina

2.1.1.1 Endopectinasas. Por el tipo de ataque al azar.

2.1.1.2 Exopectinasas. Rompen las uniones glicosídicas de la pectina en el final no reductor de la cadena

2.1.2 Poligalacturonasas. Por su preferencia al substrato de ácido poligalacturónico.

2.1.2.1 Endopoligalacturonasas, por el tipo de ataque al azar.

2.1.2.1 Exopoligalacturonasas, rompe las uniones de la parte final no reductor del ácido péctico.

2.2 Liasas. Enzimas que rompen la unión alfa 1-4 por transeeliminación formando un doble enlace entre los carbonos 4-5, en el final no reductor de la cadena

2.2.1 Pectinliasas. Por su preferencia a la pectina.

2.2.1.1 endopectinliasa

2.2.1.2 exopectinliasa

2.2.2 Poligalacturonliasas. Por su preferencia al ácido péctico.

2.2.2.1 endopoligalacturonliasa

2.2.2.2 exopoligalacturonliasa.

3. Protopectinasas. Enzimas que solubilizan la protopectina, formando pectina soluble altamente polimerizada.

3.1 Protopectinasas B, C, F, L, y S

Adaptado de Sakai, 1992

FALTAN PAGINAS

De la:

13

A la:

14

Tabla 2 ALGUNAS FUENTES NATURALES DE PECTINASAS

Organismo OGL	PE	PG	PGL	PMG	PMGL	OG
Plantas superiores:						
Cítricos	+					
Tomate	+	+				
Manzana	+	+				
Hongos:						
<i>Aspergillus niger</i>	+	+			+	+
<i>Penicillium digitatum</i>	+				+	+
<i>Fusarium solani</i>				+		+
Levaduras:						
<i>Kluyveromices</i>			+			
Bacterias:						
<i>Bacillus</i> sp.				+		+
<i>Erwinia aroideae</i>		+		+	+	+
<i>Pseudomonas marginalis</i>	+	+		+		

PE, Pectinesterasa; PG, poligalacturonasa; PGL, poligalacturonato-liasa; PMG, polimetilgalacturonasa; PMGL, polimetilgalacturonato-liasa; OG, oligogalacturonasa, OGL, oligogalacturonato-liasa. (Adaptado de Fogarty y Kelly, 1983).

Existen además marcadas diferencias entre pectinasas microbianas con respecto a las enzimas de plantas. La pectinesterasa fungal es generalmente más resistente a agentes químicos. Su pI y pH óptimos están en el rango ácido, en contraste al pH alcalino de las enzimas de las plantas, dándole una ventaja a las enzimas fúngicas en el ámbito industrial (Sajjaanantakul y Pitifier, 1991).

La producción de enzimas pécticas se ha llevado a cabo generalmente en sistemas de fermentación sumergida, cultivo alimentado o cultivos en estado sólido utilizando el hongo del género *Aspergillus*, como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. wentii* (Nyiri, 1968, Beckhorn y col. 1965, Solis-Pereira y col. 1993, Aguilar y col. 1993, Hsu y Vaughn, 1969, Cooper y Wood, 1973).

APLICACIONES DE LAS PECTINASAS

La principal aplicación industrial de las pectinasas, impacta en la tecnología de procesamiento de frutas y vegetales, ya sea aumentando la producción de jugos, o en la reducción de viscosidad de concentrados, pues las propiedades coloidales de la pectina impiden la sedimentación de partículas en el jugo.

En presencia de enzimas pécticas las moléculas de pectina son hidrolizadas y los productos formados no retienen las propiedades coloidales de la pectina, lo que facilita la rápida sedimentación de las partículas responsables de la opalescencia, que pueden ser fácilmente separadas por centrifugación, decantación o filtración.

Cabe mencionar que hay casos en que la opalescencia en los jugos es comercialmente deseable como el jugo y puré de tomate: aquí la presencia de pectinasas es indeseable. Por ello, es importante precalentar los jugos para destruir las pectinasas naturalmente presentes y así garantizar la opalescencia del jugo.

También son usadas en la preservación de maderas, en la industria textil para el tratamiento de las fibras de lino o cáñamo y juegan un papel muy importante en

la fitopatogénesis.

GÉNERO *Aspergillus* COMO MODELO DE PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

Desde hace 100 años se han utilizado industrialmente a los microorganismos como productores de enzimas. Los hongos del género *Aspergillus* han tenido una posición predominante al respecto. Este género pertenece a la subdivisión deuteromicetos (Fungi imperfecti) de hongos verdaderos (división Eumicota). Los deuteromycetes se caracterizan por la ausencia de un estado sexual en su ciclo de vida.

Aspergillus se caracteriza morfológicamente por la presencia de un conidióforo denominado aspergilo, que consta de una hifa conidiogénica constituida por un "pie" y un estípite vesiculado en la parte superior. Alrededor de la vesícula se distribuyen una o dos capas de células especializadas que se forman de manera sincrónica y una capa de esporas asexuales uninucleadas denominadas conidios. Algunas especies de *Aspergillus* tienen un estado asexual (anamórfico) y uno sexual o perfecto (teleomórfico).

Todas las especies de *Aspergillus* tienen un estilo de vida saprófito, pues son capaces de utilizar un rango muy amplio de materiales como fuente de nutrición y por ende poseen la capacidad de producir un sinnúmero de enzimas. Estas enzimas por lo general son secretadas al medio, lo que significa que tales microorganismos deben tener rutas bioquímicas para la asimilación de diferentes

fuentes de carbono, de tal forma que solo se sintetizan las enzimas necesarias para el crecimiento en las condiciones prevaecientes.

Además, ello podría explicar la existencia de numerosas isoenzimas con propiedades distintas, como la preferencia por un sustrato a un pH óptimo que se presenta en *A. niger* (Kuster-Van Someren, 1992).

Este género de *Aspergillus* se ha vuelto un organismo modelo para estudios diversos, entre otras cosas, por su disponibilidad de colecciones de cepas mutantes bien definidas y para estudios genéticos. (Timberlake, 1990). Sus características de crecimiento permiten que *Aspergillus* sea manejable, flexible y versátil en un laboratorio. Su fácil preservación y su reconocimiento como organismo GRAS por la FDA lo hacen ser el microorganismo preferido por bioquímicos y genetistas. (Oxenboll, 1994).

Aspergillus ofrece grandes posibilidades para su explotación biotecnológica con nuevas aplicaciones tecnológicas y la posibilidad de hallar y producir enzimas nuevas.

En el presente trabajo se utilizó la cepa *Aspergillus* sp FP180, la cual forma parte de la colección microbiana del laboratorio de fisiología de hongos filamentosos.

Aspergillus sp FP180 es una cepa de color blanco, que crece a 37°C y es productora de pectinasas. Las principales actividades producidas por ésta cepa son la exopectinólítica, endopectinólítica y liasa.

GENERALIDADES SOBRE REGULACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE ENZIMAS.

En términos generales, las enzimas extracelulares pueden ser inducibles, parcialmente inducibles o constitutivas. Muchas de éstas hidrolizan moléculas poliméricas que son lo bastante grandes como para entrar a la célula, por lo que presumiblemente existe un nivel basal de enzima que degradará su substrato, generando compuestos de bajo peso molecular que puedan entrar a la célula y efectuar la inducción (Wisseman, 1977 Van der Veen, 1990).

La inducción puede definirse como el aumento específico en la concentración de una enzima como respuesta a la presencia de una sustancia química determinada denominada inductor. La expresión de las enzimas está afectada por el medio ambiente pues influye en la, o las enzimas que deben ser formadas, así como en la concentración de las mismas (Sánchez y Farrés, 1987).

El modelo clásico de Jacob y Monod explica la inducción/represión de la formación de enzimas en términos de una interacción de un represor específico con una región del ADN y por consiguiente se asume que activa a nivel del operador del ADN. Sin embargo, el control de la producción de enzimas también se puede ejercer a otros niveles, desde la transcripción del primer mensajero, hasta la liberación del péptido del ribosoma.

Comúnmente, el inductor es un sustrato del sistema enzimático, aunque en algunos casos puede ser el producto de la reacción. Con frecuencia, existen

análogos químicos relacionados con el inductor que estimulan también la formación de enzimas (inductores gratuitos). Cuando el inductor está ausente es posible detectar alguna actividad de las enzimas inducibles, llamada nivel basal (no inducible), donde la rapidez de síntesis de la enzima es constante. Se ha visto que en diversos sistemas microbianos la mayor parte de enzimas inducibles (usualmente hidrolasas) son formadas de novo (Wisseman, 1997).

Existen sistemas de control como respuesta de operones a proteínas reguladoras que pueden designarse según ejerzan un control positivo o negativo de la inducción o represión, utilizando las interacciones apropiadas entre las proteínas reguladoras y la pequeña molécula inductora o correpresora.

Los genes que regulan con una función negativa (represor) son comúnmente menos encontrados en hongos (Davis y Hynes, 1991, Johnston, 1987). Sin embargo, se ha mostrado que las propiedades generales de los mecanismos de regulación en varios genes de levadura, como el modelo de regulación de la galactosa en *Saccharomyces cerevisiae*, incluye un control positivo, mediado por una proteína que activa la transcripción y también existe un control negativo que opera a nivel postranscripcional o postraducciona, por una proteína que reprime indirectamente la transcripción inactivando una proteína activadora. Tales aspectos son similares en varios genes fungales, así como en eucariotes superiores. (Johnston, 1997).

El uso de mecanismos regulatorios positivos, es probablemente una consecuencia del gran tamaño del genoma eucariótico, además de ser más eficiente y específico que el mecanismo negativo. (Johnston, 1997).

REPRESION POR CARBONO EN HONGOS

Usualmente varios microorganismos apagan un gran número de genes en presencia de glucosa, como respuesta al ahorro de energía, afectando la síntesis de enzimas usadas para metabolizar otras fuentes de carbono.

Es reconocido en bacterias que la represión es activada por fosforilación de la glucosa, ésto causa una caída en los niveles de AMPc, la cual inactiva la proteína CAP, un activador de los genes de represión catabólica. Se ha observado que la represión por glucosa en hongos no es mediada por la disminución de niveles de AMPc (Ronne, 1995).

Los genes *creA* de *Aspergillus nidulans* fueron identificados hace varios años y han sido implicados en la represión por glucosa, indicando que el *creA* está involucrado en un control negativo directo (Ronne, 1995, Davis y Hynes 1991, Ruijter y Visser, 1997). Aunque la represión puede ser ejercida por varias fuentes de carbono, la glucosa es probablemente la más represiva junto con sacarosa, xilosa y acetato, mientras que la galactosa y el glicerol son intermedios, y la lactosa, arabinosa y etanol, son débilmente o no represoras (Ruijter y Visser 1997).

Además del tipo de fuente de carbono, también la concentración es relevante. Esto es válido para la represión mediada por CREA, pero podrían existir otros mecanismos de represión como lo señalan Ruijter y Visser (1997).

ANTECEDENTES DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PÉCTICAS.

Ciertas sustancias relacionadas estructuralmente al inductor natural en un sistema pueden ser mejores inductores. Por ejemplo, la β -glucosidasa es inducida por celobiosa, el sustrato normal, sin embargo, el metil- β glucósido es mejor inductor. Tal inducción es llamada inducción gratuita. La producción de enzimas inducibles, está estrechamente ligada al sustrato utilizado como inductor; tal es el caso de la arabinasa, inducida por L-arabinosa; xilanas por D-xilosa y galactanasa o β -galactosidasa por D-galactosa (Cooper y Wood, 1973).

Se ha hipotetizado por mucho tiempo que los hongos pueden contener bajos niveles de celulasas constitutivas, a cuales atacan la celulosa. Este ataque permite la formación de un verdadero inductor de biosíntesis de celulasas o sea algunos productos intermedios de la degradación de los polímeros como el disacárido celobiosa (Kubicek col. 1993). Caso similar ocurre con los productos de degradación de la pectina, como el ácido digalacturónico, que podría ser el inductor para pectín liasa en *Erwinia carotovora* (Tsuyumu, 1977). Para *A. niger*, el complejo de arabinasas es inducido por L-arabitol (Van der Veen, 1990).

En 1962 Mendels y col. encontraron que el disacárido soforosa (β 1-2 glucobiosa) fué capaz de inducir celobiohidrolasa I y II, y la endo-glucanasa en *Trichoderma*. Si bien, la soforosa es convertida muy rápidamente por una β -

glucosidasa ligada a membrana, una pequeña cantidad entra a la célula por un sistema de transporte activo. (Van der Veen, 1990).

Fundamentalmente, la producción enzimática dependerá del microorganismo utilizado, naturaleza y concentración del sustrato inductor, la eficiencia del proceso de producción y del tipo de proceso que se utilice. La presencia de tales enzimas puede encontrarse en la superficie micelial o sobre la conidia. (Nyiri, 1981, Solis-Pereira y col. 1993, Aguilar y Huitrón, 1986) como es el caso de *Verticillium albo-atrum* y *Fusarium oxysporum* que producen endopectinlasiya utilizando ácido galacturónico (AG) como sustrato (Cooper y Wood, 1973), o como *Aeromonas liquefaciens* que produce constitutivamente poligalacturonlasiya sobre ácido poligalacturónico en cultivo continuo y está sujeta a represión catabólica (Hsu y Vaughn, 1969), por su parte la levadura *Kluyveromyces marxianus* contiene una endopoligalacturonasa constitutiva y no sujeta a represión por carbono ni nitrógeno, y tampoco se encontraron otras enzimas pectinolíticas aparte de la endopoligalacturonasa. Schwan y col. 1996 y Keen y Horton, 1966 reportaron la síntesis de endopoligalacturonasas por *Pyrenochaeta terrestris* en cultivos en lote, la cual se reprime cuando medios de cultivo que contienen pectina son suplementadas con glucosa u otras hexosas en concentraciones mayores de 0.05M, pero se estimula a concentraciones de 0.005M.

Por otra parte, Solis-Pereira y col. 1993 compararon la síntesis de pectinasas por *A. niger*, tanto en cultivo sumergido, como en cultivo en estado sólido, donde la estimación de productividad favorece al cultivo en estado sólido con respecto al sumergido. Además de que en el cultivo en estado sólido

aparentemente no hay represión por carbono, ya que la producción de actividad endo y exo, no fue reducida cuando glucosa, sacarosa o AG fueron agregadas al medio a concentraciones mayores de 10%. Chitadron y col. 1996 reportaron que la fermentación en sustrato sólido fue utilizada para la producción de pectinasas de *Rhizopus* sp mostrando gran eficiencia para la reutilización de desechos agroindustriales.

La síntesis de poligalacturonasas de *F. oxysporum* muestra un efecto inhibitorio mediado por glucosa (Patil y Dimond, 1968). Asimismo, se menciona que la poligalacturonasa de *A. niger* está sujeta a represión catabólica a niveles de transcripción y traducción (Shinmyo y col. 1978, Tahara y col. 1975).

Se han realizado estudios con *Acrocyndrium* donde valúan la síntesis de endopoligalacturonasa, exopoligalacturonasa y pectinesterasa inducidas con el mismo sustrato, donde se sugiere un mecanismo regulatorio coordinado en la síntesis de tales enzimas, diferente al modelo de represor-operador de Jacob y Monod en bacterias (Kimura y Mizushima, 1974).

También se ha reportado que *Candida boidinii* produce enzimas pectinolíticas inducidas por la presencia de pectina como fuente única de carbono (Stratilová y col., 1996) y que las *Erwinias*, *carotovora*, *chrysantheniy* y *aroidae*, secretan una parte de poligalacturonato-liasa al medio de cultivo y otra parte permanece asociada a la célula (Moran, 1968).

Rombouts y Pilnik 1980 reportan que *Xantomonas* sp. produce pectinesterasa en forma inducible y poligalacturonato liasa en forma constitutiva.

Riou y col. 1991 han monitoreado la producción de un amplio rango de actividades enzimáticas, entre ellas la pectinolítica del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, demostrando que las enzimas pécticas son constitutivas.

Estas diferentes actividades enzimáticas proveen a este hongo patógeno la capacidad de atacar los diferentes polisacaridos que componen la pared celular vegetal.

Los fenómenos regulatorios de la producción de pectinasas ha sido muy estudiados en bacterias, en donde hay evidencias claras que los productos de reacción de pectato liasa y exo-poli-a D- galacturonosidasa intervienen en la inducción sobre D-galacturonanos, los cuales son convertidos intracelularmente a los inductores verdaderos (Collmer y Bateman, 1982).

Hugouvieux y col. (1996), reportan análisis de mutantes que muestran bloqueo en varias etapas de la vía pectinolítica, lo que ha permitido la identificación de los verdaderos inductores intracelulares: KDG, DK1 y DKII (2 ceto-3 desoxigluconato, 5 ceto 4 desoxiuronato y 2-5 diceto-3-desoxigluconato, respectivamente) Además, varias condiciones ambientales afectan la producción de pectinasas y aún no son asociadas con alguna proteína regulatoria. También se ha probado sintetizar análogos de KDG como inductores de enzimas pectinolíticas en *Erwinia* (Alessi y col. 1996).

Leone, (1990), estudió la regulación de enzimas pécticas en *Botrytis cinerea*, donde la actividad total de poligalacturonasa fué influenciada por el tipo y concentración del sustrato y por la concentración conidial inicial. La síntesis de poligalacturonasa II es constitutiva. Esta enzima se encuentra en conidias no germinadas y es reprimida por ácido galacturónico a una concentración mayor

de 10 mM implicando una represión por retroalimentación, mientras que la poligalacturonasa I no sufre represión catabólica.

Se ha reportado que en *Fusarium roseum* se presenta un fenómeno de inducción diferencial relacionado con el pH, describiéndose que a pH de 3.5 en medios que contienen pectina como fuente de carbono, se inducen las endopoligalacturonasas y pectin esterasa. Esto no ocurre a pH de 6.5 (Perley y Page, 1971). Así mismo, en *C. boydii* la mayor actividad de poligalacturonasa fué dependiente del pH del medio de cultivo, usando pectina como sustrato. La mayor actividad fué obtenida a pH 3.51 disminuyendo a un 70% y 20% a pH 5.49 y 7.01 respectivamente.

Trejo-Aguilar y col. (1996) reportan que el pH afecta el patrón de secreción de pectinasas en *Aspergillus* sp FP180 y *A. niger* N-402 a 30 y 37°C. Así mismo, Delgado y col. (1992) muestran que la actividad pectinolítica en *Aspergillus* solo se produce a valores de pH inferiores a 4.0.

Biely y col. (1996)b reportan que *Aureobasidium pullulans*, conocida como hiperproductora de endo-1,4 β xilanasas es productora también de enzimas pécticas, las cuales fueron inducidas, en células crecidas previamente en glucosa, por ácido galacturónico y sus oligómeros, siendo el grado de polimerización de estos fragmentos los que tienen influencia en el nivel de enzimas inducidas. Así mismo, sugiere que los residuos metoxilados del ácido galacturónico podrían tener un papel importante en la producción de enzimas pectinolíticas.

OBJETIVO

Considerando la importancia del complejo enzimático pectinolítico producido por hongos, se plantea en éste trabajo obtener mayor información sobre el tipo de inductores verdaderos de exo y endopectinasas de *Aspergillus* sp FP180.

Objetivos particulares.

Determinar el efecto de algunos azúcares simples constituyentes de la pectina, del monómero ácido galacturónico y de los polisacáridos, APG y pectina sobre la producción de actividades pectinolíticas en *Aspergillus* sp FP180.

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de AG sobre cultivos en lote de *Aspergillus* FP180, a fin de evaluar el efecto de inducción o represión de éste sistema enzimático pectinolítico.

Obtener mezclas enriquecidas de oligómeros a partir de pectina y APG, debido a que no existen variedades de oligómeros disponibles comercialmente y su posterior evaluación del efecto sobre la síntesis de enzimas pécticas.

Obtención de derivados metoxilados del AG para evaluar su efecto en la producción de actividades pectinolíticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMO

El microorganismo utilizado en este trabajo fue un hongo blanco del género *Aspergillus* que produce pectinasas extracelulares a 37°C denominado *Aspergillus* sp FP180, el cual fue propagado y conservado en tubos con agar-papa-dextrosa. Para inocular los medios en las fermentaciones, se cosecharon esporas, raspando la superficie del medio, extrayendo con agua destilada estéril. La concentración de esporas se determinó usando una cámara de Newbawer.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

El medio basal utilizado fue igual al previamente descrito por Aguilar y col. 1981. Como fuente de carbono se utilizaron: pectina cítrica, ácido poligalacturónico (APG), ácido galacturónico (AG), ramnosa, arabinosa, galactosa (Sigma Chemical Co., USA), glucosa o glicerol, (J.T. Baker, S.A. de C.V. México) a diferente concentración según se indica en cada figura. En algunos experimentos el medio fue suplementado con extracto de levadura (EL) a una concentración de 0.3%.(P/V). Todos los reactivos fueron grado analítico. La fuente de carbono y el extracto de levadura fueron esterilizados separadamente del medio basal. La esterilización fue llevada a cabo a 121°C y

15 psi por 20 min. El pH inicial de todos los experimentos fue de 3.4-3.6 a una temperatura de 37 °C y agitación recíproca constante de 100 golpes/min.

INDUCCIÓN CON ESPORAS

El tamaño del inóculo fue de 1×10^6 esporas/ml de concentración final. El volumen de medio fue de 200 ml, utilizando matraces Erlenmeyer de un volumen de 500 ml, con agitación constante de 100 golpes/min en un agitador recíproca de 1 pulg. de desplazamiento.

Se tomaron muestras de aproximadamente 10 ml a diferentes tiempos para cuantificarles las actividades pectinolíticas correspondientes y el peso seco.

INDUCCIÓN CON MICELIO

Se utilizó micelio no inducido, pre-crecido en matraces de cultivo con capacidad de 2,500 ml conteniendo un litro de medio basal más glucosa 1% y extracto de levadura 0.3% a 37°C y 100 golpes/min durante 15 h. El micelio obtenido fue lavado exhaustivamente en condiciones asépticas con solución isotónica de NaCl (0.85%) y transferido a medios nuevos con las correspondientes fuentes de carbono (0.5% final), en matraces Erlenmeyer de capacidad de 250 ml., con un volumen de medio de 50 ml e incubándose durante 45 horas. En las mismas condiciones y concentración inicial de inóculo en todos los ensayos. Se tomaron muestras a diferentes tiempos en volumen necesario para cuantificarles posteriormente las actividades pectinolíticas correspondientes y el peso seco.

ACTIVIDADES PECTINOLÍTICAS

La actividad exopectinolítica presente en el medio 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 (AG) bajo 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 IY). 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 y col. 1991).

CRECIMIENTO CELULAR

El crecimiento celular fue determinado como peso seco, para lo cual se tomaron muestras de 10 ml cada 24 horas y se filtraron a través de una membrana milipore de 5.0 μm , previamente pesada. La biomasa retenida en la membrana fue secada en una estufa a 90°C hasta obtener un peso constante.

MEDICIÓN DE GRUPOS REDUCTORES

Fueron determinados directamente en filtrados libres de células, usando el método de DNS (Miller, 1959). Los productos de degradación de la pectina fueron expresados como ácido galacturónico. Cuando otras fuentes de carbono fueron usadas, su concentración en el medio de cultivo fue determinada como grupos reductores y expresada con el estándar apropiado.

Todos los experimentos realizados son el promedio de por lo menos 2 o 3 repeticiones de los ensayos, teniendo una variación máxima de 10%

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% y bis-acrilamida al 2.7% (Bio-Rad laboratories). Las muestras fueron colocadas en un baño a ebullición por 60 segundos, en amortiguador de muestra 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 se corrió con 150 µg de proteína de cada muestra, a una corriente de 40 mA y por un tiempo de 0.5 a 1 h a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm Migly Small SE-245 (Hoefe- Sci. Ins. U.S.A.). Después de este tiempo los geles fueron sumergidos en solución de tinción, que contenía azul de Coomasie 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 con el sustrato acoplado al gel de acrilamida de acuerdo a lo descrito por Cruickshank and Wade, 1980. Como sustratos se usaron, pectina o APG a una concentración final del 0.1% según se indique en el texto. Después de la electroforesis, los geles fueron incubados por 14 h en ácido cítrico 0.1M, o amortiguador de acetatos 0.17M. a pH 4.2. Al término de este tiempo, los geles de acrilamida-sustrato fueron retirados de la solución y teñidos con una solución de rojo de rutenio al 0.05% (Sigma Co. USA) y enjuagados posteriormente con agua destilada.

ESTERIFICACIÓN DEL ÁCIDO GALACTURÓNICO

Se realizó colocando en cada ensayo 155 ml de ácido clorhídrico al 0.2 N en metanol absoluto a 0°C, fueron agregados 5 g. de ácido galacturónico monohidratado (Sigma Co. USA.) Las mezclas de reacción fueron mantenidas por 66 horas a 0°C, neutralizadas cada una con diferentes volúmenes de hidróxido de potasio 1 N en metanol (25, 35, 40, 45, 50, 60 y 70 ml) y el precipitado (material no esterificado) fue eliminado por filtración. El metanol fue destilado bajo presión reducida hasta llegar a un volumen de 10 ml aproximadamente. Este volumen fue agregado a 90 ml de éter. El producto resultante fue cristalizado con una mezcla de dioxano metanol (2:1) (Jansen y Jang, 1946).

Estos 7 productos fueron analizados por cromatografía en capa fina, con varias mezclas de solventes, RMN y/o infrarrojo y usados como única fuente de carbono en las fermentaciones subsecuentes con micelio no inducido.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina se llevo a cabo sobre placas de sílica gel 60 de 0.25 mm (Kieselgel 60, Merck, México) utilizando varios solventes para oligogalacturónidos saturados e insaturados, metilados y no metilados y revelados con una solución de H_2SO_4 al 10% en metanol calentando la placa durante 5 minutos en una estufa a $100^\circ C$.

Los solventes utilizados para oligogalacturónidos saturados fueron: acetato de etilo, ácido acético, agua (2:1:2 v/v) o n-butanol, ac. acético, agua (50:12:25 v/v). Para metiloligogalacturónidos saturados e insaturados se usó: n-propanol, agua, acetato de etilo (7:2:1) o butanol saturado con agua. Para oligogalacturónidos esterificados: propanol y agua (7:2), o n-butanol, ácido fórmico, agua (2:3:1) según sea el caso. Se tomaron como estándar al ácido galacturónico y a la pectina. así como los R_f de referencias bibliográficas de mono, di, tri, tetra, pepta y hexagalacturónicos. (Kester y col. 1990).

DIGESTIÓN DE PECTINA

Se realizaron digestiones químicas, enzimática y microbiológica de la pectina:

Digestión química.

A una solución de pectina de 10% de metoxilo, se le ajustó el pH, a 2.5, 3.5, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, con H_2SO_4 o NaOH según el caso. La hidrólisis se llevó a cabo a $121^\circ C$ durante 15 minutos. La pectina residual no hidrolizada se eliminó centrifugando a 300 rpm por 5 minutos, después de precipitación con $ZnSO_4$ (9%) y NaOH (0.5N). Los productos de degradación se analizaron por cromatografía en capa fina y por grupos reductores.

Estas mezclas de productos de la digestión, se utilizaron como única fuente de

carbono en ensayos de inducción.

Digestión enzimática.

Se utilizaron pectinas de diferentes grado de esterificación (7.5, 8 y 10%) y ácido poligalacturónico al 1%, en un volumen de 50 ml. Se colocaron en un baño a temperatura de 40°C durante 10 a 15 minutos para homogenizar la temperatura inicial. Posteriormente se realizó la hidrólisis, ya sea con la enzima pectinasa de *Rhizopus* sp. (EC 3.2.1.15) (Sigma Chemical Co.) o un concentrado de pectinasas del propio *Aspergillus* sp FP180. Se tomaron muestras a tiempos 0, 20 y 40 minutos y posteriormente cada hora durante 8 horas. Cada muestra fue colocada en hielo y se precipitó la pectina o ácido poligalacturónico residual según sea el caso, como se describió anteriormente. Se cuantificaron los grupos reductores totales y se realizó una cromatografía en capa fina.

Estas mezclas con productos de digestión enzimática, con o sin pectina residual, se utilizaron como única fuente de carbono en ensayos de inducción, en las condiciones iniciales descritas anteriormente.

Digestión microbiológica.

Se realizaron 3 digestiones de la pectina con la cepa de *Aspergillus* sp FP180, inoculando con esporas (2×10^6 esporas/ml de medio) con medio mínimo y pectina como única fuente de carbono. Al término de 8, 12 o 24 h respectivamente se tomó el extracto libre de células de cada uno de los cultivos, reformulando este extracto para fermentaciones posteriores, y

empleado como única fuente de carbono. Paralelamente se utilizaron muestras con pectina residual precipitada.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E INFRARROJO

Se realizó en el Instituto de Química, UNAM, un espectro de r.m.n. H^1 y C^{13} , de algunos productos de la esterificación de ácido galacturónico, los cuales fueron medidos en solución de D_2O a 220 Mhz. (García, 1997, comunicación personal).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

UTILIZACIÓN DE ESPORAS COMO SISTEMA DE INDUCCIÓN

Se evaluó el crecimiento de *Aspergillus* sp FP180 y su producción de enzimas pectinolíticas sobre pectina (P), ácido poligalacturónico (APG) y ácido galacturónico (AG). Así mismo se determinó la acumulación de productos de degradación de los polisacáridos mencionados (Fig 5).

Como puede ser observado en esa figura *Aspergillus* sp FP 180 tuvo un escaso crecimiento cuando se utilizó APG y AG a una concentración final de 1% como fuente de carbono, mientras que en pectina creció 6 veces más, siendo su máximo crecimiento a las 72 h.

En presencia de pectina se observó una acumulación máxima de productos de su degradación a las 24 h los cuales desaparecen posteriormente (Fig. 5). En el caso del APG, se acumularon los productos de degradación a partir de 24 h hasta llegar a 6.76 mg/ml a las 96 h. Por otro lado, cuando el AG es la única fuente de carbono, se consumió aproximadamente un 11% en las primeras 48 h manteniéndose sin cambio el resto de la fermentación.

Es necesario hacer notar que el AG, no es consumido en grandes proporciones como se podría esperar. Mientras que con APG como sustrato, *Aspergillus* sp FP180 genera productos de hidrólisis; probablemente monómeros entre otros, los cuales se producen en mayor medida que los que se consumen, puesto que hay una acumulación neta.

La actividad exopectinolítica, cuando el APG es la única fuente de carbono, llegó a un máximo a las 72 h casi 5 veces mayor que cuando la pectina fue la única fuente de carbono. Por lo tanto, se observó un mayor rendimiento de

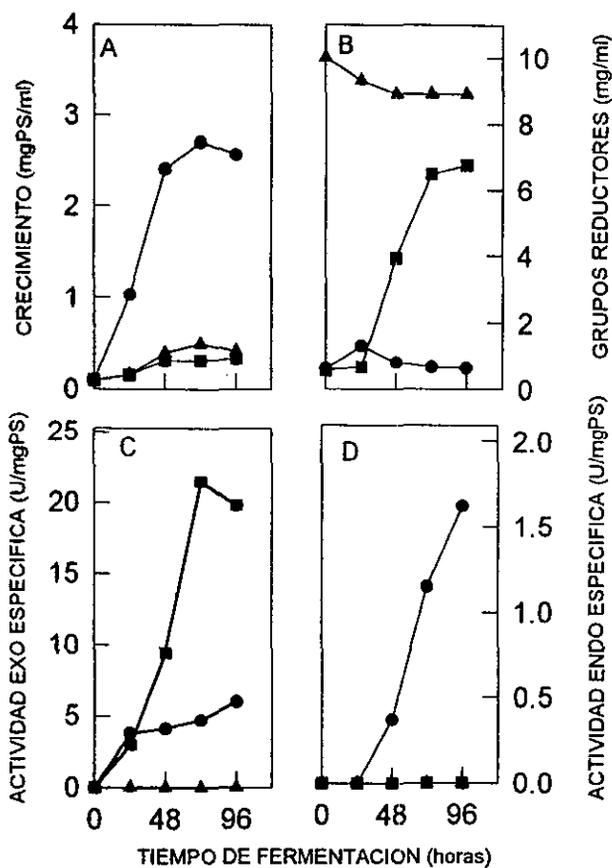


Fig 5. Fermentación de *Aspergillus* sp FP180 en un medio basal suplementado con diferentes fuentes de carbono, a una concentración final de 1%. A) Crecimiento, B) Grupos reductores C) Actividad exo específica D) Actividad endo específica. Pectina (●) APG (■), y AG (▲).

producción de enzimas de tipo exo en este polisacárido no metoxilado, probablemente por la liberación paulatina de oligómeros. En cambio, no se registró actividad exo cuando el substrato es AG, debido probablemente a la alta concentración de este monómero en el medio (Fig. 5C).

La actividad endo por *Aspergillus* sp FP180 solo se induce cuando está presente la pectina como única fuente de carbono (Fig. 5D).

Se realizó un monitoreo más detallado de la acumulación de productos de degradación de la pectina y se observó que tal degradación se lleva a cabo entre las 18 y 24 h de fermentación (Fig. 6), probablemente debido a la presencia de pectinasas conidiales y de micelio. Se ha reportado que en *Aspergillus* sp. (Aguilar y Huitrón, 1993) las conidias no germinadas presentan pectinasas constitutivas de tipo exo sugiriendo su participación como generadoras de los inductores verdaderos de las pectinasas extracelulares. De igual manera, se ha descrito que en *Trichoderma reesei* existen β -glucanasas en conidia y micelio, siendo éstas enzimas responsables de iniciar "in vitro" la degradación inicial de celulosa, que resultan en la formación de productos que inducen a otros componentes del sistema celulolítico. También se ha reportado que la degradación de pectina por *B. cinerea* es iniciada por la acción de pectinasas localizadas en la conidia (Leone y Vanden Hevel, 1987).

Para determinar el efecto de la concentración del AG sobre la producción de la actividad exo, se evaluó el crecimiento de *Aspergillus* en diferentes concentraciones de AG.

Como se observa en la figura 7, el crecimiento de *Aspergillus* sp FP180 a las 48 h, cuando el AG se utilizó a una concentración de 0.5%, fue

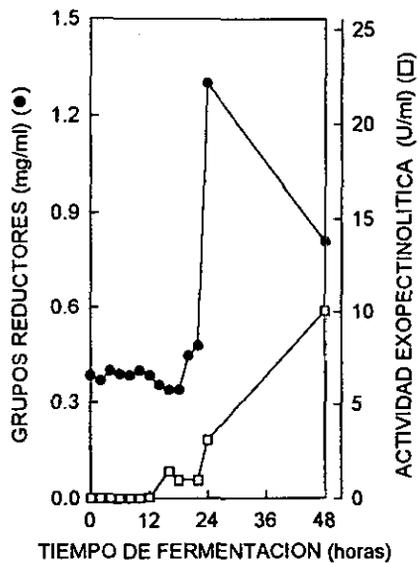


Fig 6. Perfil de productos de degradación, en las primeras horas de fermentación y actividad exopectinolítica en cultivo de Aspergillus FP180 sobre pectina.

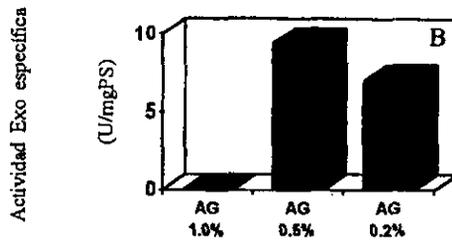
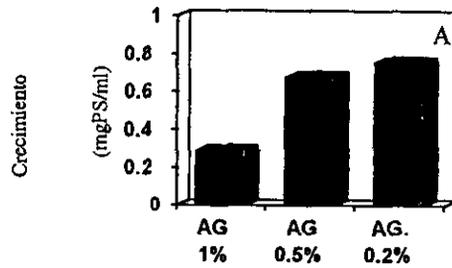


Fig 7. Efecto de diferentes concentraciones de AG en la producción de actividad exo producidas por *Aspergillus* sp FP180. A) crecimiento a las 48 h y B) actividad exo específica.

aproximadamente el doble que el obtenido cuando este sustrato se usó a una concentración de 1%. (Fig. 7A). A su vez, cuando estuvo presente el AG al 0.2%, el crecimiento fue similar al obtenido con una concentración de 0.5%. A las 48 h de cultivo la actividad exo fue de 10 y 7 U/mgPS con las concentraciones de 0.5% y 0.2% respectivamente.

No se produjo actividad exo (Fig. 7B), ni endo cuando el AG se encuentra a una concentración de 1%. Esto indica que a esa concentración la síntesis de exopectinasas fue reprimida, mientras que concentraciones de 0.5% o menos, inducen la síntesis de enzimas exopectinolíticas.

Esta disminución de la concentración favoreció la producción de actividad exo, lo cual soporta la idea que con una concentración baja de monómeros u oligómeros intermediarios no metoxilados a partir de APG como única fuente de carbono, se obtiene una alta actividad exopectinolítica.

A pesar de que también se indujo las enzimas de tipo exo en presencia de AG al 0.2%, su crecimiento se vió afectado desde las 24 h por falta de fuente de carbono. Este problema podría eliminarse si el cultivo se hace bajo condiciones de cultivo alimentado, como lo han señalado Aguilar y Huitrón (1986).

No se detectó actividad endopectinolítica en ninguna concentración de AG, indicando que ese monosacárido, principal componente de las sustancias pécticas, no induce esta clase de enzimas.

El consumo de sustrato, presente a una concentración de 1% fue aproximadamente un 11%, mientras que al utilizar una concentración de 0.5%, el AG fue consumido casi en su totalidad a las 72 h; cuando la concentración fue de 0.2% es consumido casi totalmente a las 24 h.

Dado que con algunas fuentes de carbono tanto el crecimiento como el consumo fueron pobres, se decidió adicionar extracto de levadura (EL) al medio de cultivo a una concentración de 0.3% (Fig. 8) con el fin de evaluar la producción de enzimas pécticas en condiciones favorables para el crecimiento de este microorganismo.

En todos los casos en los que se adicionó el EL, o bien el EL sólo, el crecimiento del microorganismo fue estimulado. Cuando se adiciona el EL al AG o al APG, el crecimiento se incrementa aproximadamente unas 4 veces (Fig. 8A).

Cuando se utilizó EL como única fuente de carbono, el crecimiento inicial de *Aspergillus* sp FP180 fue ligeramente más lento que para la pectina tomada como control; pero al final de la fermentación (96 h) se alcanzó la misma cantidad de peso seco que el control.

Cuando la pectina se encontró combinada con EL (P/EL), el crecimiento de *Aspergillus* sp FP180 es aumentado un 60% (medido a las 96 h) en comparación a la pectina sola.

A diferencia del medio que contenía solo AG al 1%, el cual se consumió un 11%, la mezcla de este con el EL, es consumido un 75%. Por otro lado, con el APG/EL como sustrato los grupos reductores se acumulan más pronto que en APG solo, para después consumirse casi completamente (Fig. 8B).

En las primeras 48 h, la actividad exo ya sea con APG o con APG/EL, se indujo paralelamente. Por otra parte, a partir de las 48 h en el medio que contiene APG/EL se registró una disminución de actividad muy considerable, lo que corresponde con el aumento de pH a partir de las 24 h donde llega al

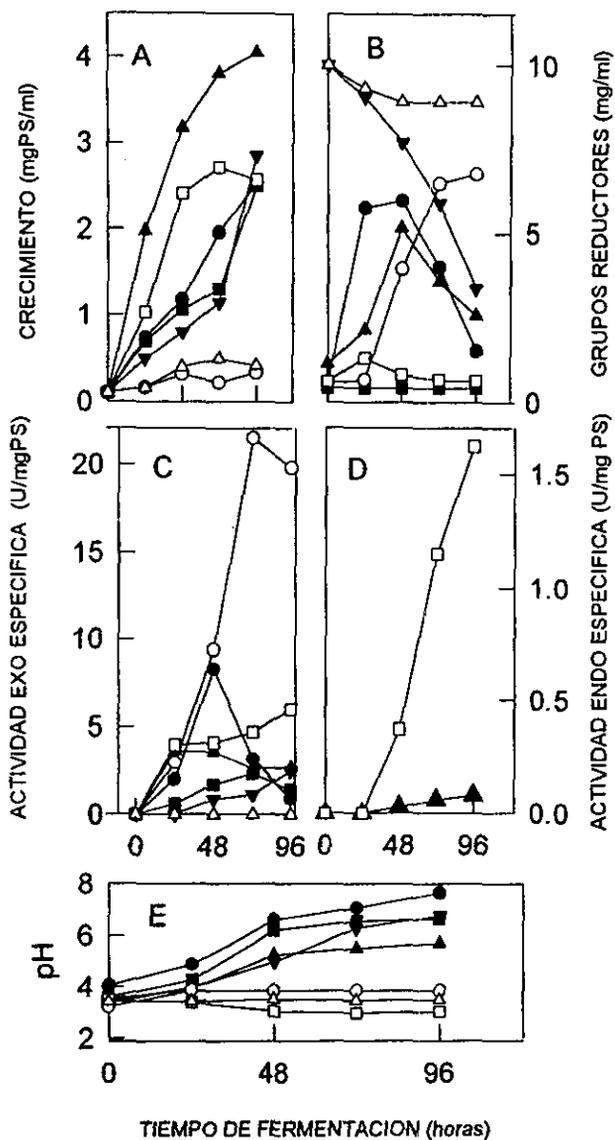


Fig 8. Efecto de la adición de extracto de levadura a los cultivos de *Aspergillus* sp FP180, creciendo sobre pectina, APG y AG al 1.0%
 A) Peso seco, B) Grupos reductores C) Actividad exo específica,
 D) Actividad endo específica, E) Perfil de pH
 APG/EL (●), E.L (■), Pectina (□), APG (○), Pectina/EL (▲), AG/EL (▼).

finalizar la fermentación a 7.65. Esto podría indicar un efecto negativo del pH sobre la producción de actividad exo, similar al observado con la pectina adicionada con extracto de levadura. Estos efectos del pH sobre la síntesis de exo pectinasas han sido previamente descritos por Aguilar y col. 1991 y Delgado, 1997.

Cuando estuvieron presentes los polisacáridos con o sin EL, la actividad exo fue similar en las primeras horas de fermentación, en donde el pH no varió considerablemente. Después de las 48 h existió un aumento de pH y una disminución de actividad en el substrato que contiene EL, lo que nos hace suponer que el EL no influyó en la producción de pectinasas, pero si promovió el crecimiento del microorganismo.

La actividad endo, solo se produjo cuando esté presente pectina como única fuente de carbono; sin embargo, en presencia de EL (P/EL) se vió reducida casi un 90%, reflejando su alta sensibilidad al pH del medio. Ésto lo han reportado Aguilar y col. 1991 y Delgado y col. 1993 donde la actividad pectinolítica en *Aspergillus* sp. no se produce a valores de pH superiores a 4.

Después de concluir que el AG, principal constituyente de las sustancias pécticas, influyó en la inducción de pectinasas, fue interesante evaluar también a la ramnosa, azúcar que forma parte de la región dura de las sustancias pécticas en una proporción considerable, además de que modifica su estructura.

Así entonces, se creció a *Aspergillus* sp FP180 con ramnosa al 1% como única fuente de carbono, la cual no fue asimilada y por tanto no hubo crecimiento ni actividad alguna (Fig. 9). Cuando estuvo combinada con pectina (P/R), ambas a

una concentración de 0.5%, la ramnosa es consumida completamente a las 72 h de manera similar al consumo de AG al 0.5%.

Por otro lado, cuando la combinación fue de AG/R, el crecimiento de *Aspergillus* sp FP180 es suprimido completamente; luego entonces, no se registró ninguna de las 2 actividades analizadas. Esto podría deberse a la concentración de 1%, la cual es posible que limitaría el transporte de estos compuestos.

La actividad exo, es reducida aproximadamente un 60% cuando se encontró pectina más ramnosa (P/R) en comparación a la que se obtuvo en pectina sola, sugiriendo una represión por carbono, ya que la actividad empezó después de las 24 horas. Esto hace suponer que fue preferida la ramnosa a la pectina en las primeras horas.

La actividad endo se presentó solo cuando existe pectina en el medio; sin embargo, cuando estuvo presente la combinación de P/R, la actividad es disminuida un 90%.

El crecimiento del microorganismo cuando el APG con o sin ramnosa se encuentra como única fuente de carbono, fue muy pobre por lo que no se registró actividad alguna.

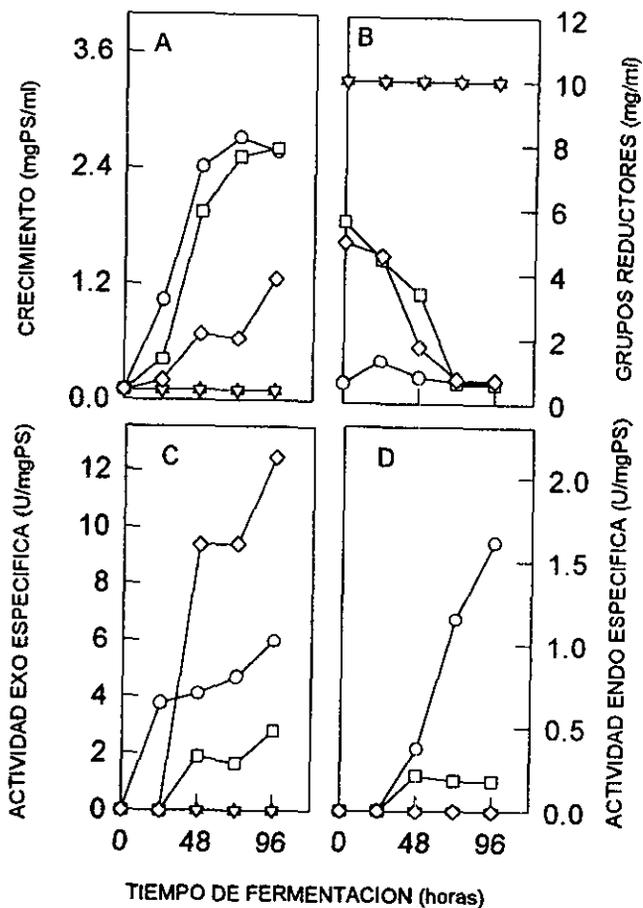


Fig 9. Efecto de la ramnosa sobre la producción de enzimas pectinolíticas en *Aspergillus* sp FP180 crecido en P, AG solos o combinados con ramnosa.

A) Peso seco, B) Grupos reductores, C) Actividad exo específica, D) Actividad endo específica

Pectina 1% (O), pectina 0.5%/ramnosa 0.5% (□), ramnosa 1% (Δ), AG 0.5% (◇), AG 0.5%/ramnosa 0.5% (▽).

OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS Y SU EVALUACIÓN COMO INDUCTORES

Como se ha mencionado, los productos de hidrólisis de la pectina, dada su complejidad, podrían ser muy variados, ya sea por su grado de polimerización, beta eliminación o hidrólisis, por la cantidad de grupos metoxilo y su distribución a lo largo de la cadena, por los azúcares constituyentes, ramificaciones o combinación de estas características, las cuales hacen difícil la obtención de oligómeros bien caracterizados y en cantidades suficientes para ser utilizados como inductores de pectinasas.

Ya que no existen en el mercado comercial variedades de estos oligómeros, se plantearon 3 estrategias para obtener mezclas de productos de hidrólisis de bajo peso molecular para probarlos posteriormente como posibles inductores.

Así entonces, se realizaron hidrólisis de los polisacáridos por métodos químicos, en condiciones ácidas y alcalinas, métodos enzimáticos, donde se utilizaron pectinasas de *Rhizopus* (Chemical Sigma Co.) y un concentrado enzimático de *Aspergillus* sp FP180; y métodos microbiológicos, utilizando al mismo microorganismo como productor de oligómeros. Estos productos se obtuvieron a partir de filtrados libres de células de cultivos de *Aspergillus* sp FP180 sobre pectina en tiempos cortos, pues, como ya se ha señalado, existe una acumulación de productos de hidrólisis en las primeras 24 h de fermentación, los cuales podrían actuar como inductores de pectinasas. En este caso, se tomaron los tiempos de 8, 12 y 24 h de crecimiento de *Aspergillus* sp

FP180.

Se mencionará primero la digestión de la pectina por vía química, realizada en un amplio rango de condiciones, tanto ácidas como alcalinas.

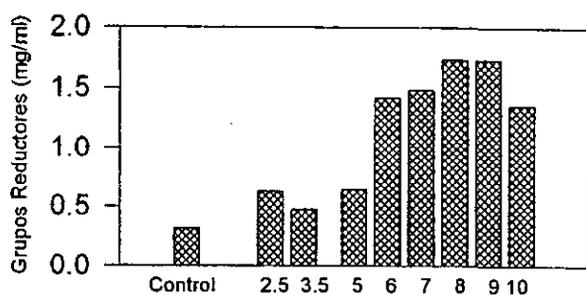
Se observó el perfil de degradación mostrado en la fig. 10, teniendo como control a la pectina no hidrolizada. Como se puede observar, a partir de la digestión a pH 6 y en todo el intervalo alcalino hubo mayor liberación de grupos reductores, comparándolos con los hidrolizados ácidos, teniendo el máximo valor a pH 8 y 9.

El mecanismo de hidrólisis de la pectina está modulado por reacciones competitivas entre pH y temperatura (Renard y Thibault, 1996). A valores de pH alcalinos la hidrólisis se llevó a cabo, principalmente por beta eliminación y desmetoxilación. Así entonces, las digestiones alcalinas obtenidas serían mezclas de oligómeros insaturados y/o desmetoxilados, con pectina residual que no fue hidrolizada.

Cada una de las mezclas provenientes de las digestiones químicas a pH 6, 7, 8, 9 y 10 (Q6, Q7, Q8, Q9, Q10, respectivamente) se utilizó como única fuente de carbono para probarlos en ensayos de inducción a partir de conidias de *Aspergillus* sp FP180 en mismas condiciones iniciales descritas en material y métodos. Estas mezclas fueron analizadas por cromatografía en capa fina.

El crecimiento del microorganismo, cuando fueron utilizadas las mezclas Q6 a la Q10, fue aproximadamente la mitad del control, excepto la mezcla Q8, la cual aún tuvo un crecimiento menor. (Fig. 11 A).

En la fig. 11B se muestra que hubo un aumento de grupos reductores cuando se utilizó como única fuente de carbono, Q8, Q9 y Q10. Mientras que los



perfil de pH

Fig. 10 Grupos reductores liberados a partir de la pectina por digestión química, en condiciones ácidas y alcalinas a una temperatura de 120°C durante 15 minutos. El control es pectina al 1% sin hidrolizar.

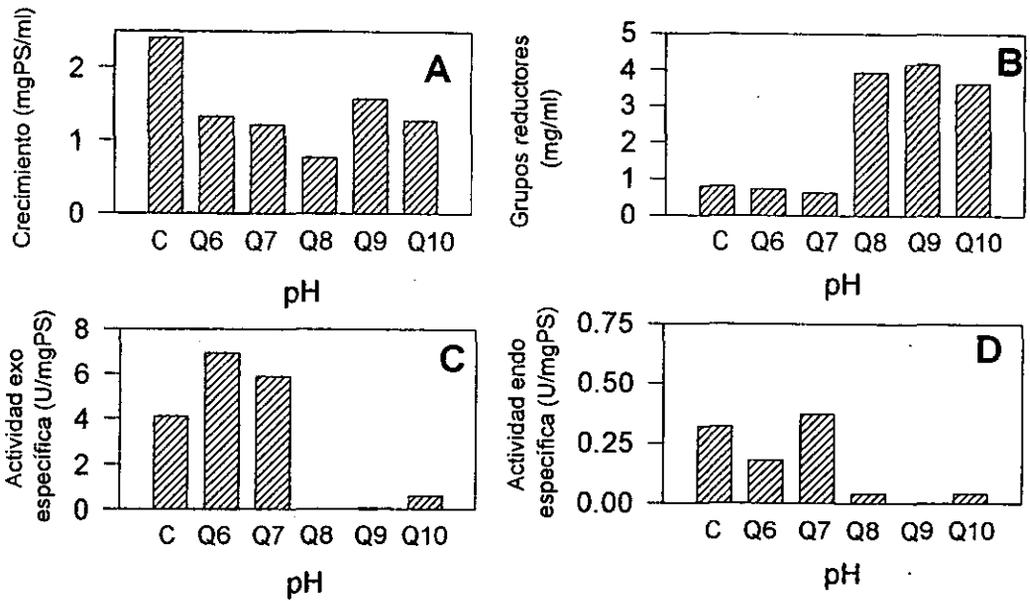


Fig 11. Efecto de productos de hidrólisis de la pectina por vía química como fuentes de carbono sobre cultivos de *Aspergillus* sp FP180. A) Crecimiento, B) Grupos reductores, C) Actividad exo específica, D) Actividad endo específica, (C) Control.

hidrolizados Q6 y Q7 alcanzaron menos de 1 mg/ml, al igual que la pectina tomada como control. Se puede observar que la mezcla de productos iniciales de la fermentación, obtenidos en Q8, Q9 y Q10, fue hidrolizada aún más en el transcurso de los ensayos de inducción. Esto pudiera afectar la producción de actividades pectinolíticas, pues la concentración mayor de grupos reductores podría reprimir la actividad exo (Fig. 11).

Al evaluar los productos de la digestión Q6 y Q7, donde existen menos grupos reductores, se estimuló la actividad exo un 45% y 55% respectivamente, con respecto al control, lo que apoyaría lo anterior (Fig. 11C).

La actividad pectinolítica de tipo endo (Fig. 11D) fue insignificante cuando los hidrolizados Q8, Q9 y Q10 fueron tomados como única fuente de carbono; en cambio, cuando estuvo presente la mezcla de Q7, fue ligeramente mayor al control, mientras que la mezcla de Q6 fue la mitad, comparada con el control.

Las cromatografías en capa fina de las mezclas Q6 y Q7, nos indican que contienen productos principalmente metoxilados resultantes de la despolimerización de la pectina, podrían inducir la actividad endo, como se aprecia en la fig.11D. Mientras que los oligómeros de Q8, Q9 y Q10 fueron desmetoxilados, los cuales afectarían probablemente la actividad endo (Fig. 11D).

Ya que la pectina residual y/o los oligómeros de las mezclas obtenidas por vía química podrían ser hidrolizadas de nuevo en el transcurso de las primeras horas de fermentación e influir en la inducción de pectinasas, se observó paralelamente el efecto de los oligómeros sin la influencia del polisacárido residual no hidrolizado que fue eliminado por precipitación antes de probarlos

en ensayos de inducción. Las mezclas precipitadas Q6P, Q7P y Q8P corresponden a las obtenidas a pH de 6, 7 y 8 (Fig. 12).

El crecimiento del microorganismo, se mantuvo similar entre los hidrolizados, pero siempre menores al control. (Fig. 12A). Se observó una considerable disminución de grupos reductores cuando la mezcla de la digestión alcalina estuvo sin pectina residual (Q8P); los demás no mostraron cambio alguno (Fig. 12).

La actividad exo producida cuando se utilizó como sustrato la mezcla Q8P fue similar al control, contrastando cuando este sustrato tuvo la pectina residual (Q8); así entonces podemos sugerir que la cantidad de grupos reductores presentes en el medio afectó la producción de actividad exopectinolítica. En cambio la actividad exo se mantuvo sin cambio aparente cuando se utiliza la mezcla Q6P y Q7P.

Cuando *Aspergillus* sp FP180 fue crecido con la mezcla Q8P, no se detectó actividad endo, mientras que para la mezcla Q6P la actividad endo fue el doble con respecto al control.

Con la mezcla Q7P aumentó la producción de actividad endo en un 25% con respecto al control. Esto podría ser resultado de la inducción directa de los oligómeros solos. No hubo diferencias significativas comparando los resultados de Q7P a los obtenidos con Q7.

Con los datos hasta aquí expuestos, podemos considerar que los oligómeros metoxilados favorecieron la producción de pectinasas de tipo endo mientras que los productos no metoxilados, estimularon la producción de actividad exo.

Así mismo, la concentración de grupos reductores afectó la producción de

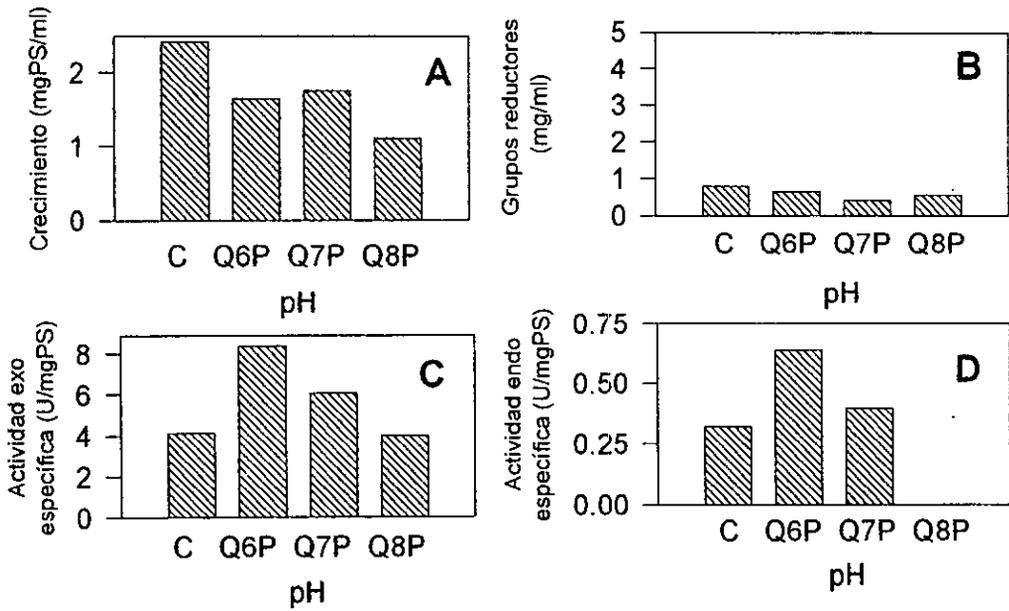


Fig 12. Efecto de productos de hidrólisis de pectina por vía química sin pectina residual como fuentes de carbono sobre cultivos de *Aspergillus* sp FP180. A) Crecimiento, B) Grupos reductores C) Actividad exo específica, D) Actividad endo específica.

actividad exo, como se puede observar en las Fig. 11 y 12.

Por otro lado, siguiendo nuestro primer planteamiento, se realizó la digestión por vía enzimática. Primero se efectuaron digestiones del APG y de pectinas de 7.5, 8.6 y 10% de metoxilo (52, 56 y 61% de esterificación, respectivamente), con pectinasas de *Rhizopus* (Chemical Sigma Co.) y con el extracto enzimático de la misma cepa, *Aspergillus* sp FP180. Inmediatamente se utilizaron estas mezclas de oligómeros en ensayos de inducción.

Los productos de estas digestiones fueron analizados cualitativamente por cromatografía en capa fina, tomando como estándar al AG. Se observó que los productos de hidrólisis tuvieron valores de Rf de 0.35 a 0.83 que corresponderían de acuerdo a valores reportados por Kester y col 1980 a un grado de polimerización entre 6 y 2.

Los experimentos anteriores apuntan a que los derivados metoxilados favorecen la síntesis de pectinasas, particularmente la endo y una baja concentración de oligómeros de las sustancias pécticas favorecen la producción de actividades de tipo exo; es por ello que se continuó con el planteamiento descrito anteriormente.

Finalmente, se realizó la propuesta para obtener mezclas de oligómeros por vía microbiológica. Así entonces, se utilizaron como única fuente de carbono los filtrados de células que previamente se obtuvieron de 3 diferentes cultivos de *Aspergillus* sp FP180 en pectina. Cada uno éstos fué hidrolizadas "in vivo" durante 8, 12 o 24 h (M8, M12, M24 respectivamente). Los filtrados libres de células fueron usados como fuente de carbono, reformulándolos en medio mínimo, a una misma concentración de grupos reductores y a las mismas

condiciones mencionadas en todas las fermentaciones.

El crecimiento de *Aspergillus* sp FP180 en los ensayos de inducción no mostró prácticamente cambio alguno con respecto a la pectina como control.

Las actividades específicas exo y endo cuando se utilizó cada uno de estos filtrados (M8, M12 y M24) no representaron variaciones significativas en la estimulación de cualquiera de las actividades, si se comparan con el control.

Hay que recordar que el tiempo en que el microorganismo acumuló grupos reductores fué un lapso muy corto, entre las primeras 18 y 24 h, para ser consumidos posteriormente; muy probablemente la producción de oligómeros, por esta vía, fué limitada, interviniendo todo ello en el análisis de resultados sobre la producción de pectinasas.

Paralelamente se llevó a cabo la eliminación de la pectina residual de los filtrados M8, M12 y M24 correspondiendo a M8P, M12P y M24P respectivamente. Estos se probaron en ensayos de inducción.

Con estas mezclas, utilizadas como única fuente de carbono, aunque es ligeramente afectado el crecimiento (12%), se presentó actividad pectinolítica de tipo endo y exo, sin cambios significativos comparándolos con el control. Estos datos nos reflejan el papel de los productos de hidrólisis metoxilados como probables inductores de pectinasas de tipo endo.

De acuerdo a lo anterior, fué claro que este microorganismo responde ante las diferentes condiciones del sustrato inicial, así como su concentración y tipo y grado de polimerización.

Existió un efecto muy marcado de la concentración de grupos reductores y productos no metoxilados sobre la producción de exopectinasas extracelulares.

Observamos que existió sensibilidad al pH del medio en la producción de endopectinasas; todo indica que los productos metoxilados juegan un importante papel sobre la producción de las endopectinasas.

Lo mismo ocurre con las conidias no germinadas, sobre los productos probados como probables inductores al inicio de nuestros ensayos de inducción, sin por lo pronto definir los nuevos productos que afectaron en el análisis de resultados.

Este panorama general nos llevó a buscar más información sobre el comportamiento de *Aspergillus* sp FP180 en un sistema menos complejo y completar nuestros hallazgos sobre la producción de actividades pectinolíticas.

UTILIZACIÓN DE MICELIO COMO OTRO SISTEMA DE INDUCCIÓN

Debido a la presencia de actividad pectinolítica de tipo exo en las conidias, utilizamos el micelio como otra alternativa de inducción.

Se seleccionó la fase exponencial entre otras fases de crecimiento analizadas, al término de 15 h de cultivo se presentaron una mayor producción de actividad pectinolítica.

Se iniciaron los experimentos de inducción, precreciendo *Aspergillus* sp FP180 en glucosa durante 15 h a las mismas condiciones descritas en material y métodos. Al final de este tiempo el micelio se lavó exhaustivamente y las células fueron transferidas a medio basal, con los substratos que se estudiarían como probables inductores de pectinasas.

Se analizó el efecto de 2 concentraciones diferentes (0.5 y 1%, concentración final) de pectina, APG y de AG, en la producción de actividad pectinolítica.

(Fig. 13 y 14).

Cabe indicar que también se realizaron ensayos sin fuente de carbono, de nitrógeno o en ausencia de ambos, con o sin cicloheximida. En ningún caso se detectó actividad pectinolítica. Así mismo se hizo el control con pectina más cicloheximida, como fuente de carbono, sin detectarse actividad alguna. Esto confirma que efectivamente no hubo acumulación de actividad en el crecimiento previo en glucosa, de manera que la actividad obtenida en estos experimentos se podría considerar como síntesis "de novo".

Cuando los sustratos estuvieron a una concentración inicial de 1%, el crecimiento de *Aspergillus* sp FP180 a las 48 h fue similar con el AG o con el APG utilizados como única fuente de carbono (Fig.13A).

El AG se consumió un 50% mientras que con el APG se acumularon grupos reductores a las 24 h para ser consumidos casi totalmente a las 48 h de cultivo (Fig. 13B).

El micelio no inducido, cultivado en APG mostró un adelanto en la acumulación de grupos reductores, pues a las 24 h se acumularon 4 mg/ml que se consumen rápidamente. En este tiempo se produce la máxima actividad exopectinolítica y a partir de ese momento se obtuvo una ligera producción de actividad endo (0.1 U/mg PS) comparada con 1.3 U/mg PS obtenida para pectina como sustrato al mismo tiempo (Fig. 13).

Cuando el AG se encontró como única fuente de carbono, no se registró actividad exo ni actividad endo, sugiriendo también, que existe represión de estas actividades a concentración de 1%.

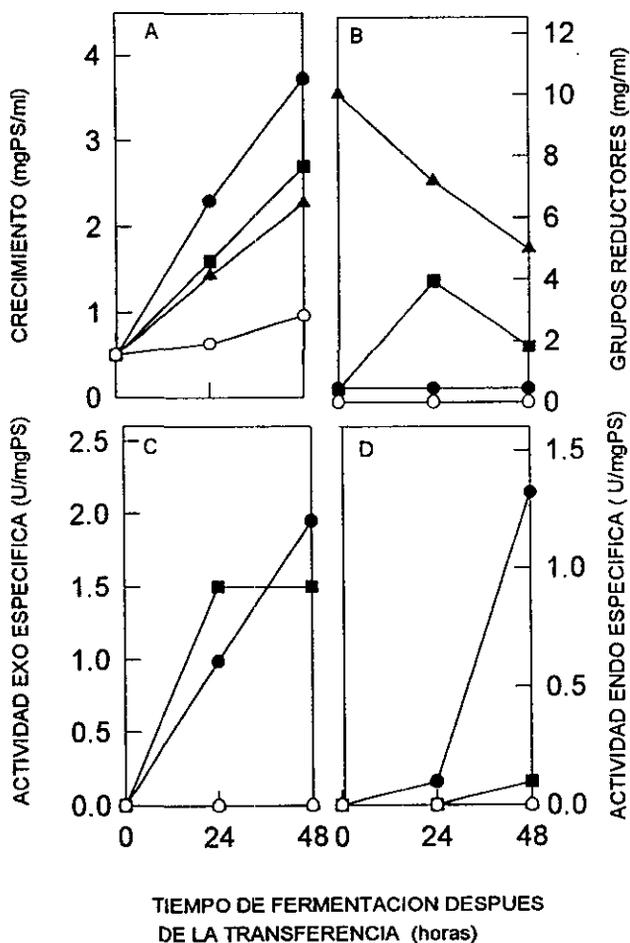


Fig 13. Fermentación de *Aspergillus* sp FP180 sobre AG, APG y pectina (concentración final de 1%), después de precrecer el micelio en glucosa A)Peso seco B)Grupos reductores C)Actividad exo específica D) Actividad endo esp. Pectina (●), APG (■), AG (▲), pectina más cicloheximida (concentración final 125 ug/ml) (○)

Cuando se utiliza pectina como única fuente de carbono, la producción de actividad endo llegó aproximadamente a 1.3 U/mgPS a las 48 h, aproximadamente 3 veces más que cuando se utilizaron conidias en la fermentación.

Es necesario destacar que la actividad endo cuando el APG es el sustrato utilizado como inductor, fue muy baja en comparación con la producida con la pectina, siendo de un 8% aproximadamente del valor de la actividad endo de la pectina (Fig. 13 D).

Utilizando AG a concentración de 1% como posible inductor de pectinasas, se observó que, al igual que en el sistema de inducción con esporas, la actividad pectinolítica en micelio es reprimida por alta concentración. Sin embargo, en este sistema hubo consumo de 50% de AG con un crecimiento a las 48 h de aproximadamente de 2.5 mg/ml, el cual fue mayor al presentado en el sistema de inducción anterior (Fig. 13).

Al probar a la pectina, APG o AG a una concentración de 0.5%, como única fuente de carbono, el crecimiento fue similar en los 3 sustratos utilizados, llegando todos ellos a 2 mg/ml de peso seco a las 48 h (Fig. 14A), el cual fue menor al obtenido con una concentración de 1%.

La actividad endo no se produce en ninguna de las dos concentraciones, sin embargo, la actividad exo si se produce cuando el AG está a una concentración final de 0.5% con un valor de 0.99 U/mg PS, el cual es comparativamente menor que el producido sobre pectina o APG (Fig. 14C).

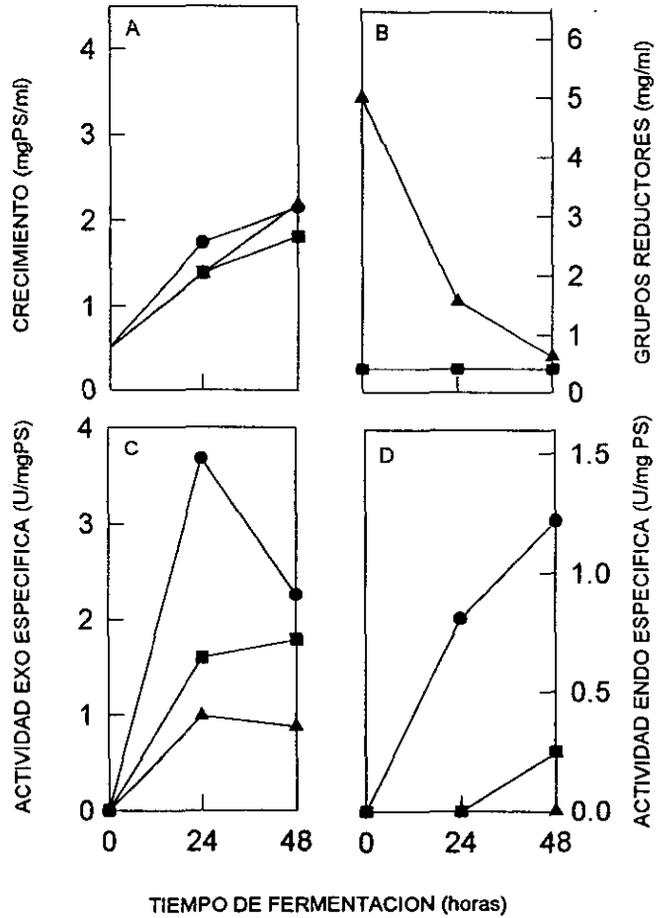


Fig 14. Fermentación de *Aspergillus* sp FP180 sobre AG, APG y pectina (concentración final de 0.5%). A) peso seco B) grupos reductores C) actividad exo específica y D) actividad endo específica. Pectina (●), APG (■) y AG (▲).

Por otro lado, no hubo acumulación de productos de hidrólisis en APG ni pectina cuando cualquiera de ellos estuvo a una concentración de 0.5% (Fig. 14B).

La producción de actividad endo inducida por el APG fue muy pequeña en comparación con la producida en pectina; así mismo, en los zimogramas realizados se observó una zona clara de actividad en el rango 45-50 kDa en el carril que contenía el filtrado obtenido cuando estaba presente el APG como sustrato (Fig. 17 carril d), que refleja la presencia de endopoligalacturonasas inducidas por este sustrato.

EFFECTO DE AZÚCARES SIMPLES Y GLICEROL EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.

Para integrar un poco más estos resultados, se evaluó el efecto de los siguientes azúcares: galactosa, arabinosa, ramnosa, glucosa y glicerol (0.5% concentración final) en el cultivo del micelio de *Aspergillus* sp FP180. Se analizaron los filtrados libres de células de cada 24 h en donde la cinética de crecimiento se muestra en la Fig. 15.

El crecimiento celular fue similar en todos los azúcares, con excepción de la glucosa, donde mostró un aumento del doble con respecto a los demás, y mayor en un 50% al obtenido con la pectina, tomada como control. Sin embargo, no se registró actividad ni exo ni endo. Así mismo, en los zimogramas realizados no hubo zonas claras que indicaran producción de alguna de estas actividades. Por otra parte, en los geles de proteínas se observaron algunas bandas, pero no en el rango de 42-54 kDa, masa molecular en donde se encuentran algunas pectinasas. (Fig. 17).

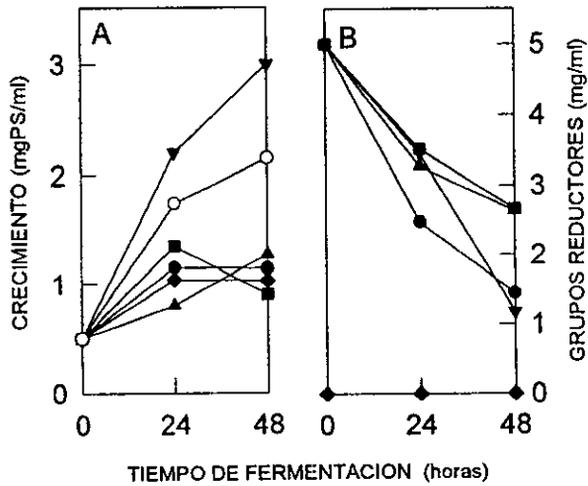


Fig 15. Efecto de diferentes azucares simples y glicerol sobre el crecimiento de *Aspergillus* sp FP180. A) Crecimiento B) Grupos reductores. Ramnosa (●), arabinosa (■), galactosa (▲), glucosa (▼), glicerol (◆), pectina (○).

Paralelamente se analizó el efecto de combinaciones de AG, APG o pectina con o sin ramnosa, adicionada en el tiempo inicial. En la figura 16A observamos que la ramnosa afectó ligeramente el crecimiento del microorganismo cuando este azúcar se encuentra con AG, mientras que con la ramnosa combinada con pectina se reduce un 50% el crecimiento del microorganismo. No se detectó acumulación de productos de hidrólisis de los polisacáridos probados, pero sí un consumo de los monómeros utilizados. La actividad de tipo exo, tanto en APG como el AG presentó una reducción de actividad cuando estuvo presente la ramnosa (Fig. 16C), ó cuando se adicionó ramnosa a la pectina (Fig. 16 D).

En el caso de la producción de actividad endo, se observó que la ramnosa reduce ligeramente esta actividad cuando se agrega a la pectina en el tiempo inicial del ensayo (Fig. 16D). Así mismo, la actividad de tipo endo fue reprimida cuando se adicionó ramnosa al APG, como lo muestra la fig. 16D. Tampoco hubo estimulación de actividad endo cuando se encontró AG sólo o combinado con ramnosa.

PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE LAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PRODUCIDAS POR *Aspergillus* sp FP180.

La electroforesis desnaturalizante realizada de los filtrados libres de células, obtenidas cuando el microorganismo fué cultivado en presencia de la pectina como fuente de carbono, revelan unas bandas, en un rango de aproximadamente 45-66 kDa que en el correspondiente zimograma mostraron una zona clara de hidrólisis que representan por lo menos 3 tipos diferentes de enzimas con actividad pectinolítica (Fig. 17 líneas 1 y a). Mientras que en

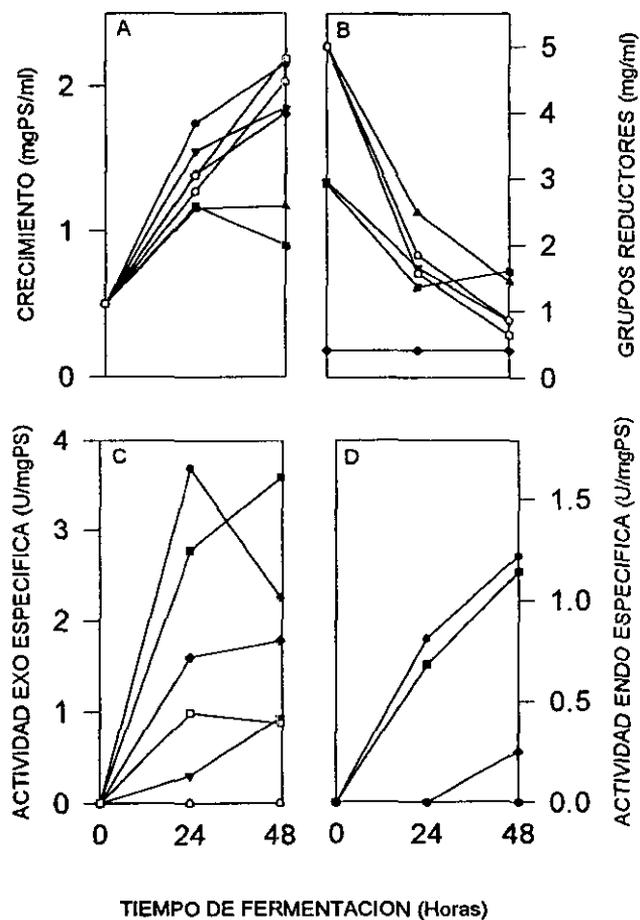


Fig 16. Efecto de la combinación de ramnosa con pectina, AG o APG en cultivos de *Aspergillus* sp FP 180.

A) crecimiento B) grupos reductores C) actividad exo específica Pectina (●), P/R (■), Ramnosa (▲), APG/R (▼), APG (◆), AG/R (○), AG (□).

presencia de pectina más ramnosa (P/R) se presentó una reducción en la intensidad de bandas proteicas. En el zimograma correspondiente, la zona de hidrólisis también se redujo (Fig. 17 línea 2 y b) sugiriendo una represión por carbono. Esto da lugar a una zona de hidrólisis que corresponde a una banda que migró en una masa molecular de aproximadamente 48 kDa, mientras que las de masa molecular de alrededor de 66 kDa se reprimen por ramnosa. Esto indicó que la pectina induce varias pectinasas, de las cuales, las de masa molecular de alrededor de 66 kDa son reprimidas por ramnosa.

Con el filtrado libre de células obtenidas cuando el microorganismo fue cultivado en presencia de APG, se observó una gama más amplia de bandas de proteínas en el rango de 40-66 kDa, mientras que en el zimograma apareció una zona tenue de hidrólisis que corresponde a una masa molecular de aproximadamente 48 kDa (línea 4 y d). Igualmente se observó una reducción de bandas de proteínas cuando el filtrado tenía la combinación de APG/R y en el zimograma correspondiente no apareció ninguna zona clara de hidrólisis (Fig. 17 línea 5).

Con la muestra del filtrado que contenía AG como única fuente de carbono se observó un perfil proteico similar al mostrado con APG pero las bandas fueron más tenues. También en el zimograma apareció una leve zona de hidrólisis similar al obtenido con APG como sustrato. (Fig. 17 línea 6 y c).

Así mismo hubo una reducción de bandas de proteínas cuando se encuentra la combinación de AG/R (línea 7).

En los patrones electroforéticos de las proteínas extracelulares obtenidas de cultivos del microorganismo con ramnosa, arabinosa o galactosa como fuente de carbono, el número de bandas proteicas detectadas en el gel de

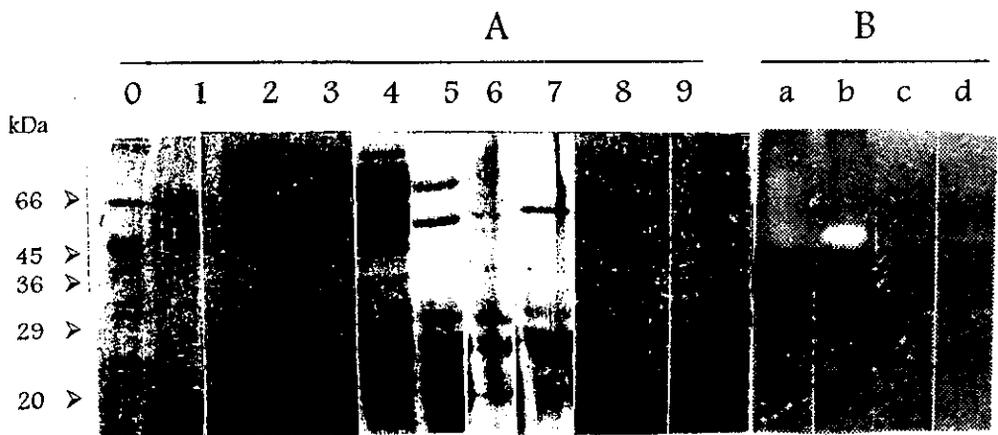


Fig 17 (A) Electroforesis desnaturalizante y (B) actividad pectinolítica "in situ" sobre pectina de filtrados de micelio no inducido de *Aspergillus* sp FP 180, crecidos con diferentes fuentes de carbono. Línea 0 marcadores de peso molecular; línea 1 y a, pectina; líneas 2 y b; pectina más ramnosa; línea 3, ramnosa; líneas 4 y c, ácido poligalacturónico; línea 5, ácido poligalacturónico más ramnosa, línea 6 y d ácido galacturónico; línea 7, ácido galacturónico mas ramnosa; línea 8 arabinosa; línea 9, galactosa.

poliacrilamida fue reducido en comparación con las obtenidas de los polisacáridos o el AG, mientras que en el zimograma correspondiente, no se encontró ninguna zona de hidrólisis que representen actividad pectinolítica (Fig. 17 líneas 3, 8, 9).

EFFECTO DE DERIVADOS METOXILADOS DEL AG EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.

En virtud de que algunos resultados apuntan a que los grupos metoxilo de los oligómeros pécticos juegan un papel importante en la actividad endopectinolítica, se consideró importante probar ácido metilgalacturónico. Como éste no se vende comercialmente, fue necesario llevar a cabo su síntesis química para producir 7 derivados metoxilados del AG, los cuales se tomaron como única fuente de carbono para ensayos de inducción.

Todos ellos se analizaron previamente en cromatografía en capa fina, mostrando un corrimiento mayor con respecto al AG, sugiriendo un cambio químico, además de que a los derivados 2, 5 y 7 se les realizó resonancia nuclear magnética (RNM) y/o infrarrojo, cuyos diagramas representan más de un producto, entre ellos algunos isómeros y probables lactonas. (Anexo A). En el espectro del infrarrojo del análogo 1, se observó un pico el cual podría ser equivalente a grupos metoxilo en el carbono 6 (1743.8 cm^{-1}).

Se utilizaron cada uno de estos derivados como única fuente de carbono (Fig. 18) en cultivos de micelio no inducido de *Aspergillus* sp FP180. El crecimiento es reducido aproximadamente un 50 a 60% con respecto al control, excepto el derivado 6 el cual fue imposible medir por peso seco por las características

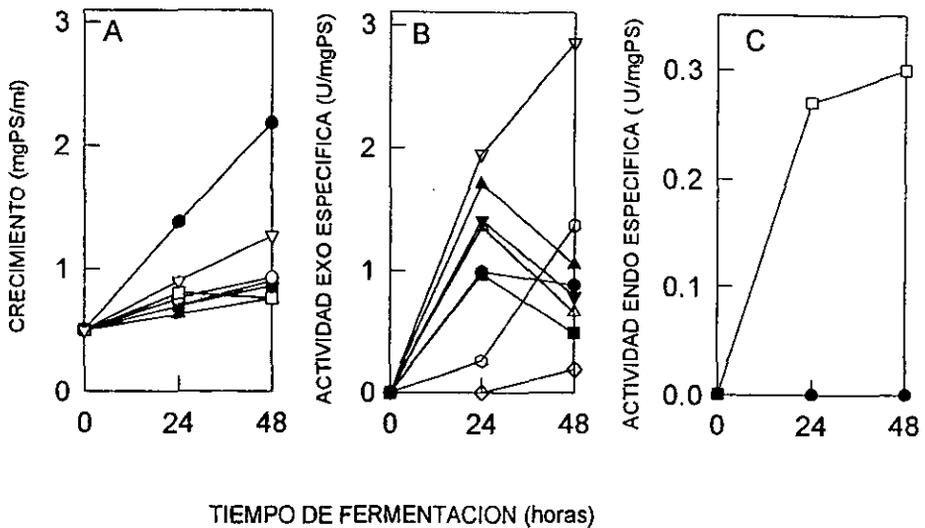


Fig 18. Efecto de diferentes derivados del AG sobre la producción de actividades pectinolíticas en *Aspergillus* sp FP180.
 A) Peso seco B) Actividad exo específica, C) Actividad endo específica.
 AG (●) Derivado 1 (■) Derivado 2 (▲) Derivado 3 (▼) Derivado 4 (○)
 Derivado 5 (□) Derivado 6 (△) Derivado 7 (▽)

En los derivados 1-6 no se cuantificaron grupos reductores, ya que posiblemente la metilación se efectuó en el carbono anomérico del AG o a que exista otra conformación química de estos derivados. Mientras que con el diagrama de RMN-C del derivado 2 no presenta alguna señal que sugiera un grupo anomérico, sin poder precisar realmente el cambio químico producido bajo las condiciones de reacción realizados.

Con el derivado 7 los grupos reductores iniciales fueron casi 3 mg/ml y este valor casi no varió en el transcurso de la fermentación, a pesar de que se observó mayor crecimiento, comparándolo con los otros derivados. (Fig. 18B).

Con el derivado 6 como fuente de carbono la actividad exo fue aproximadamente 0.2 U/mgPS, mientras que las actividades de los derivados 1, 3 y 4, tomando el 100% a la actividad del control, alcanzaron un 55, 89 y 75% respectivamente del control; en tanto, los derivados 2, 5 y 7 presentaron una actividad exo de 119, 325 y 155% respectivamente del control (Fig. 18B).

La actividad endo solo se indujo cuando el derivado 5 estuvo presente en el medio como única fuente de carbono, alcanzando su máximo valor a las 45 h siendo este un 25% del registrado con pectina, en ese mismo tiempo de fermentación (Fig. 18C).

En la electroforesis desnaturalizante (Fig. 19) se pudo apreciar que los derivados, principalmente el num. 5, presentaron una banda en el rango de aproximadamente 50 kDa, correspondiendo quizás a la producción de actividad endo.

Por otro lado, las cromatografías en capa fina, confirmaron la existencia de productos monoméricos metoxilados, no con el grado de purificación y caracterización deseada, pero que proporcionan alguna respuesta a los objetivos planteados.

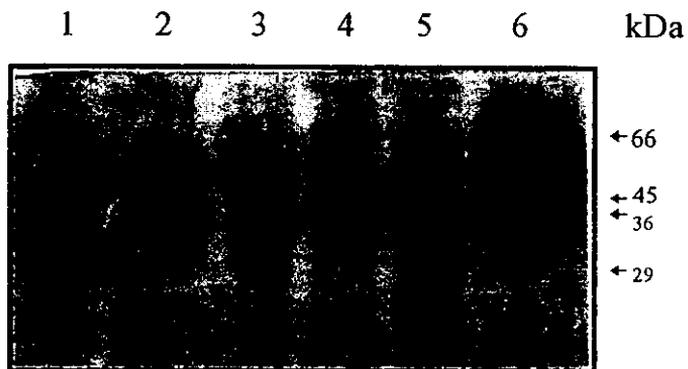


Fig. 19. Electroforesis desnaturizante de filtrados enzimáticos de micelio no inducido de *Aspergillus* sp FP180, crecido con diferentes derivados de ácido galacturónico como única fuente de carbono por 45h a 37°C. Línea 1-6, filtrados de cada uno de los 6 derivados metoxilados del ácido galacturónico.

Se puede especular que los derivados metoxilados, y aún, el mismo enlace glicosídico, sean responsables de respuestas diferentes por parte del microorganismo, al sustrato probado como inductor de enzimas pectinolíticas.

DISCUSION GENERAL.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encontró que el AG y los oligómeros productos de la hidrólisis del APG indujeron exopectinasas.

La concentración de estos substratos influyó en la actividad exo, ya que a una concentración de 0.5% o menor del AG, es inducida la síntesis de enzimas de tipo exo, mientras que a concentraciones mayores de 0.5%, estas enzimas fueron reprimidas. Estos resultados fueron consistentes tanto en micelio como en ensayos a partir de conidias, dando evidencias de la inducción de exopoligalacturonasas por AG u oligómeros desmetoxilados a bajas concentraciones.

La inducción de endopectinasas, por el contrario, parecieran ser favorecida por los oligómeros metoxilados y por el AG metoxilado, obtenido químicamente en nuestro laboratorio. Por otro lado, se ha reportado que hay relación directa entre el grado de metoxilación de la pectina y una mayor producción de enzimas de tipo endo, lo cual apoyaría nuestra hipótesis del papel que juega el grupo metoxilo en la inducción de endopectinasa, la cual presentó una masa molecular aproximada de 48 kDa medida por electroforesis

Por otro lado, encontramos que el pH tuvo un efecto sobre la producción de pectinasas, siendo la endopectinasa la más afectada.

Es posible que la actividad responsable de la degradación inicial de la pectina sea una actividad preformada, que probablemente esté presente en las conidias y en micelio inducido que podría ser responsable de proporcionar los inductores necesarios para la producción de las actividades pectinolíticas extracelulares en *Aspergillus* sp FP180.

Se observó que la ramnosa, azúcar constituyente de la pectina, reprimió la

síntesis de pectinasas entre 50 y 70 kDa, como lo muestra la figura 17, ya que con la mezcla de ramnosa más el inductor, la actividad pectinolítica fue menor que cuando se encontró solo el inductor. En los geles de poliacrilamida se observó una disminución de bandas proteicas cuando se encuentra la mezcla de ramnosa con el inductor en los cultivos de *Aspergillus* sp FP180.

La producción de actividad pectinolítica no fue inducida por los otros azúcares constituyentes de la pectina, ni por glucosa o glicerol, que fueron evaluados en ensayos de inducción con micelio, por lo que se concluye que no hay pectinasas constitutivas en *Aspergillus* sp FP180.

La producción de endo y exopectinasa por este microorganismo depende de un balance estrechamente relacionado de la concentración, el grado de polimerización y el nivel de metoxilación del sustrato inductor.

En relación con los 7 derivados metoxilados obtenidos en nuestro laboratorio, el derivado 5 utilizado como fuente de carbono en cultivos de *Aspergillus* sp FP180 induce tanto la exo como la endo. De acuerdo a los resultados del diagrama de RMN-C se puede suponer que representa una mezcla de varios isómeros, entre ellos algún compuesto con un grupo metoxilado. Al observarse una banda con una masa molecular entre 43-48 kDa en el patrón electroforético de los derivados metoxilados, se podría suponer que corresponde probablemente a la actividad endopectinolítica. (Fig. 19).

CONCLUSIONES

El AG y oligómeros no metoxilados indujeron enzimas exopoligalacturonasas.

Esta inducción fue sensible a la concentración de AG. Una concentración de menos de 0.5% estimuló la secreción de exopoligalacturonasas, mientras que una concentración mayor de 0.5% son reprimidas.

No se encontraron enzimas constitutivas en *Aspergillus* sp FP180, dado que azúcares probados como fuentes de carbono no resultaron en actividad alguna.

Existió un efecto negativo del pH alcalino del medio sobre la producción de pectinasas extracelulares en este microorganismo, siendo la mas perjudicada la actividad de tipo endo.

La producción de actividad pectinolítica endo fue favorecida por los sustratos pécticos metoxilados. La producción de pectinasas de tipo exo, parece estar relacionada a la presencia de productos no metoxilados.

Los azúcares simples como la arabinosa, galactosa y ramnosa no indujeron enzimas pectinolíticas.

La ramnosa reprimió enzimas pectinolíticas de una masa molecular mayor de 50 kDa.

Los sistemas de inducción utilizados, tanto esporas como micelio, nos dieron

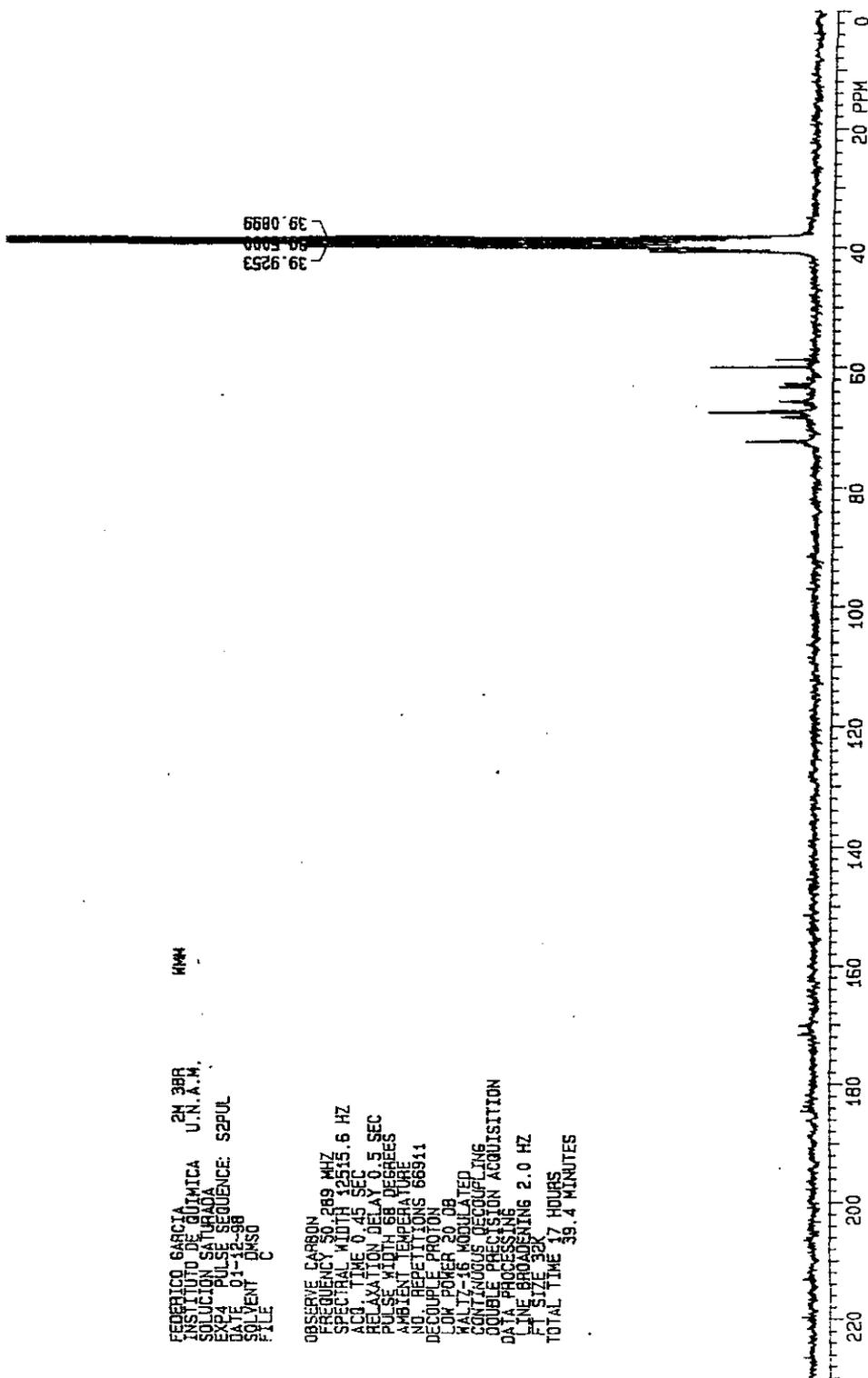
una respuesta igualmente satisfactoria relacionada con el papel inductor de sustratos metoxilados sobre las endopeptinas y la inducción de exopoligalacturonasas por AG u oligómeros desmetoxilados a bajas concentraciones. Además se observó un efecto represor de la ramnosa. Existió una clara diferencia en el sistema de inducción a partir de esporas, donde ocurrió una modificación del sustrato durante las primeras 24 horas con respecto al sistema de inducción a partir de esporas.

ANALOGO 2

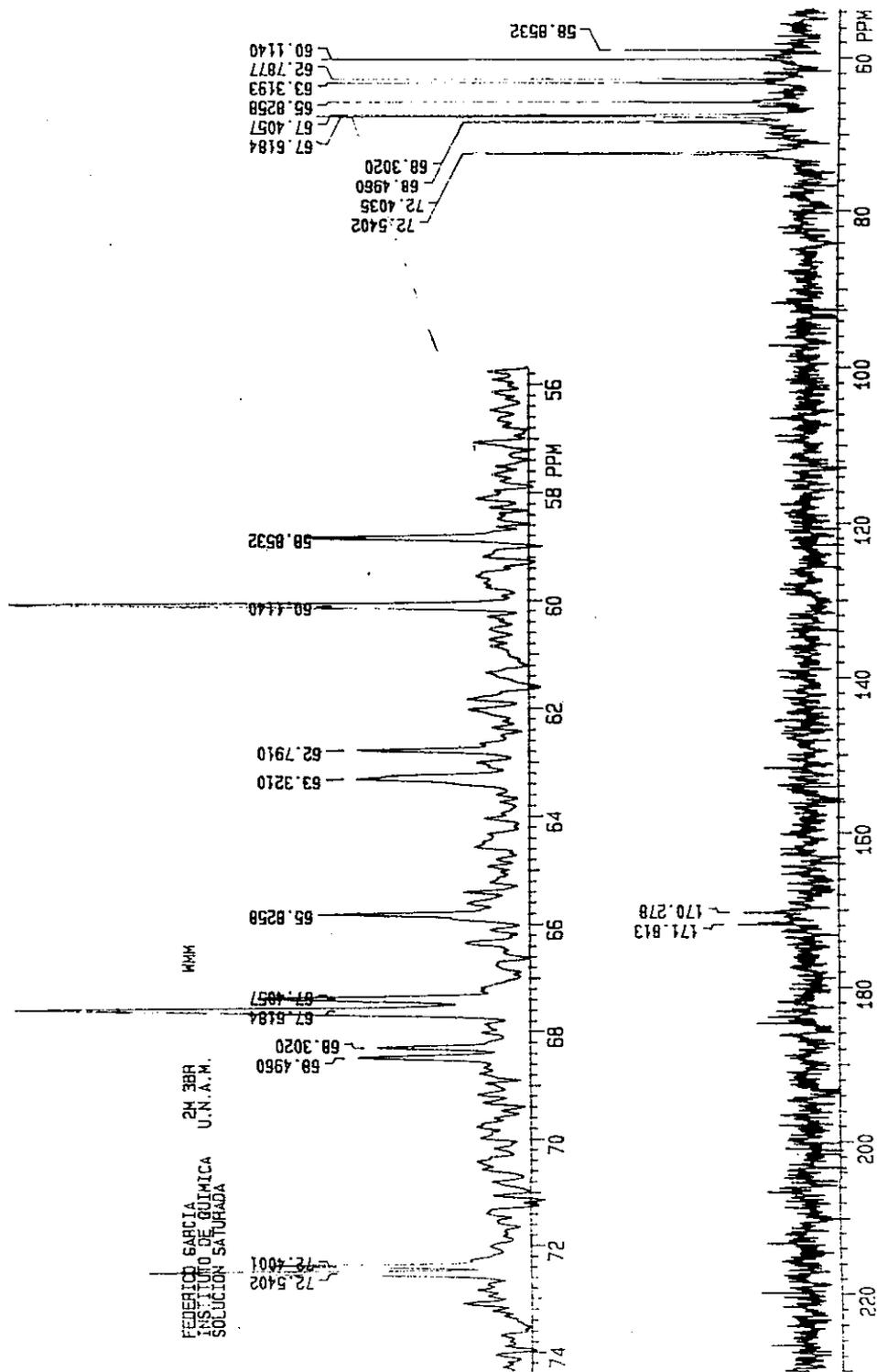
FEDERICO GARCIA 2H 3BR
INSTITUTO DE QUIMICA U.N.A.M.
SOLUCION SATURADA
EXP4 PULSE SEQUENCE: S2PUL
DATE 01-12-88
SOLVENT DMSO
FILE C

MMH

OBSERVE CARBON
FREQUENCY 50.289 MHZ
SPECTRAL WIDTH 12515.6 HZ
ACQ. TIME 0.45 SEC
RELAXATION DELAY 0.5 SEC
PULSE WIDTH 68 DEGREES
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 66811
DECUPLE PROTON
LOW POWER 20 DB
WALTZ-16 MODULATED
CONTINUOUS DECOUPLING
DOUBLE PRESSURE
DATA PROCESSING
LINE PROCESSING
LINE BROADENING 2.0 HZ
LINE SIZE 327
TOTAL TIME 37 HOURS
39.4 MINUTES



ANALOGO 2



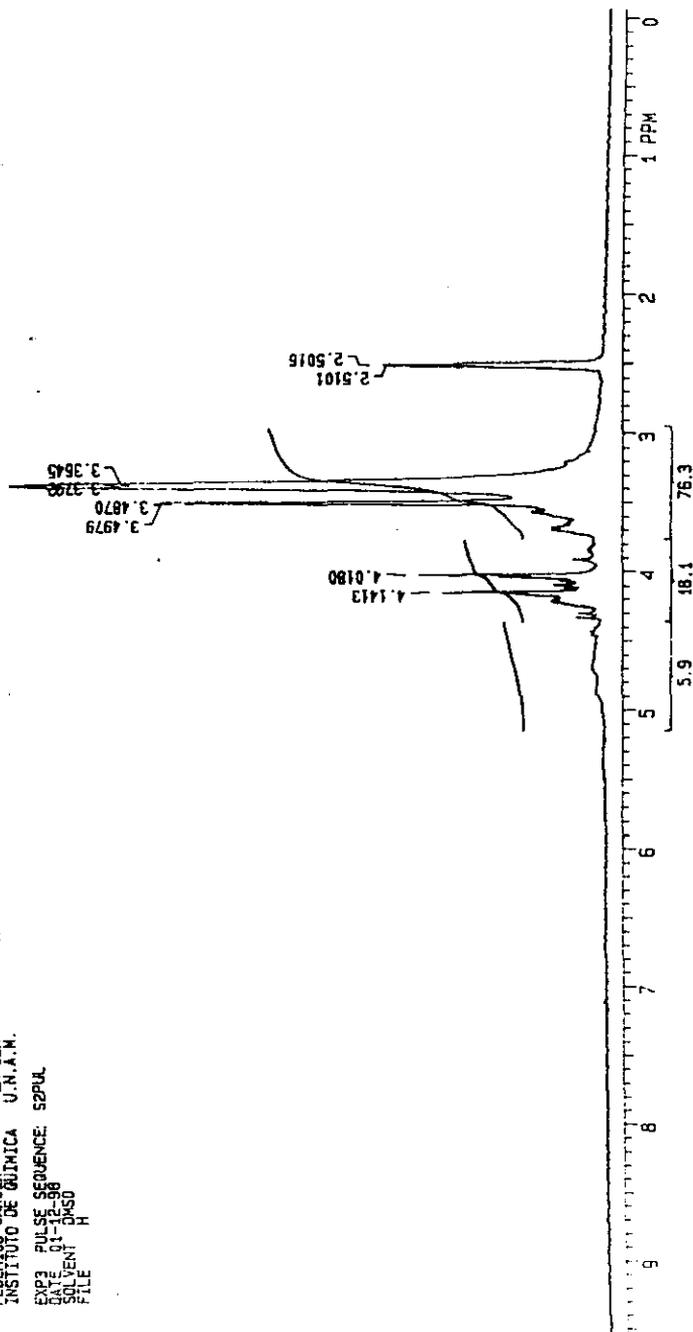
FEDERICO GARCIA
INSTITUTO DE QUIMICA
SOLUCION SATURADA
2M 3BR
U.N.A.M.

MMK

ANALOGO 2

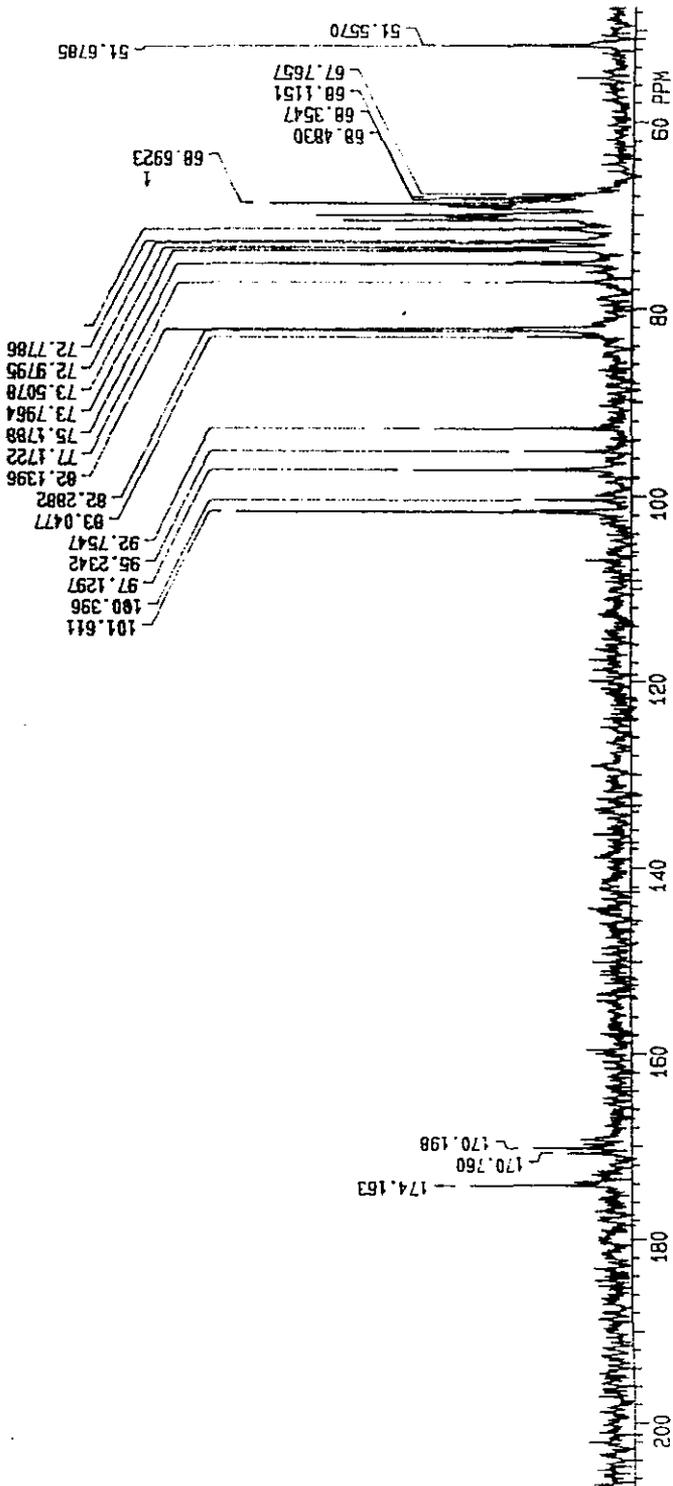
FEDERICO GARCIA 2H 300F
INSTITUTO DE QUIMICA U.N.A.M.
EX02 PULSE SEQUENCE: 52PUL
DATE 01-25-88
SOLVENT DMF0
FILE H

MMH



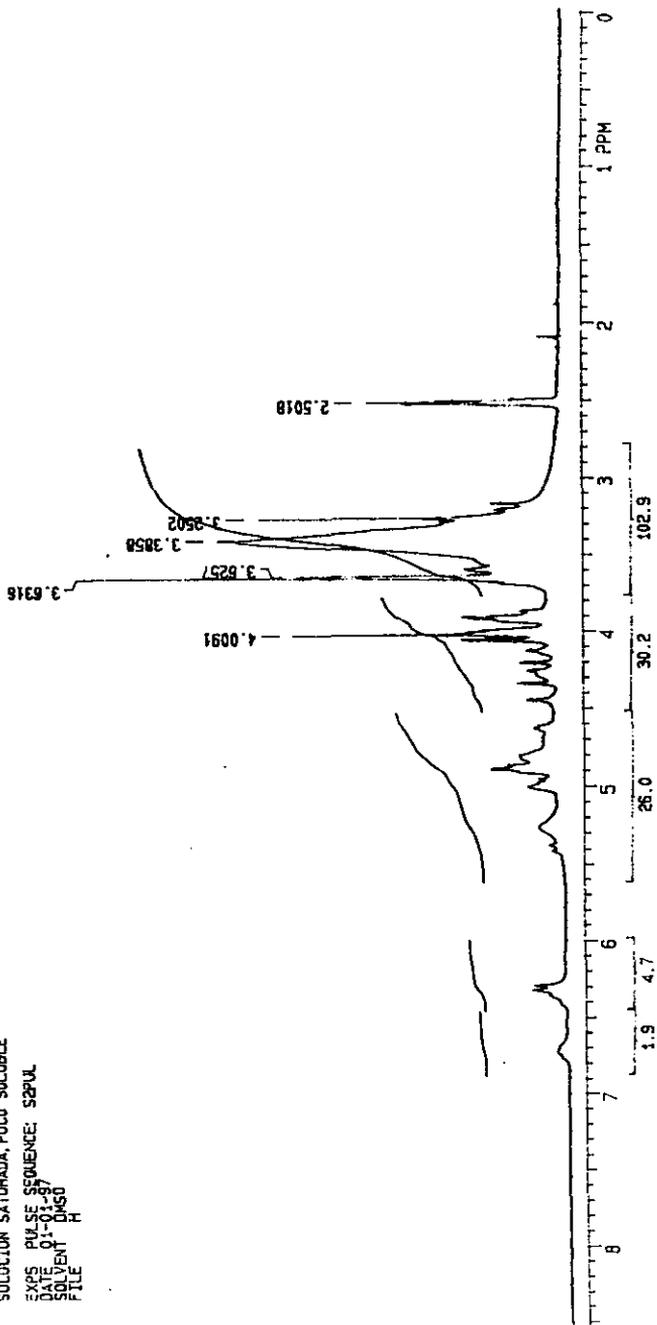
ANALOGO 5

FEDERICO GARCIAJ 54 BR
WILBER MATOS MEDINA
INSTITUTO DE QUIMICA UNAM
SOLUCION SATURADA, POCO SOLUBLE



ANALOGO 5

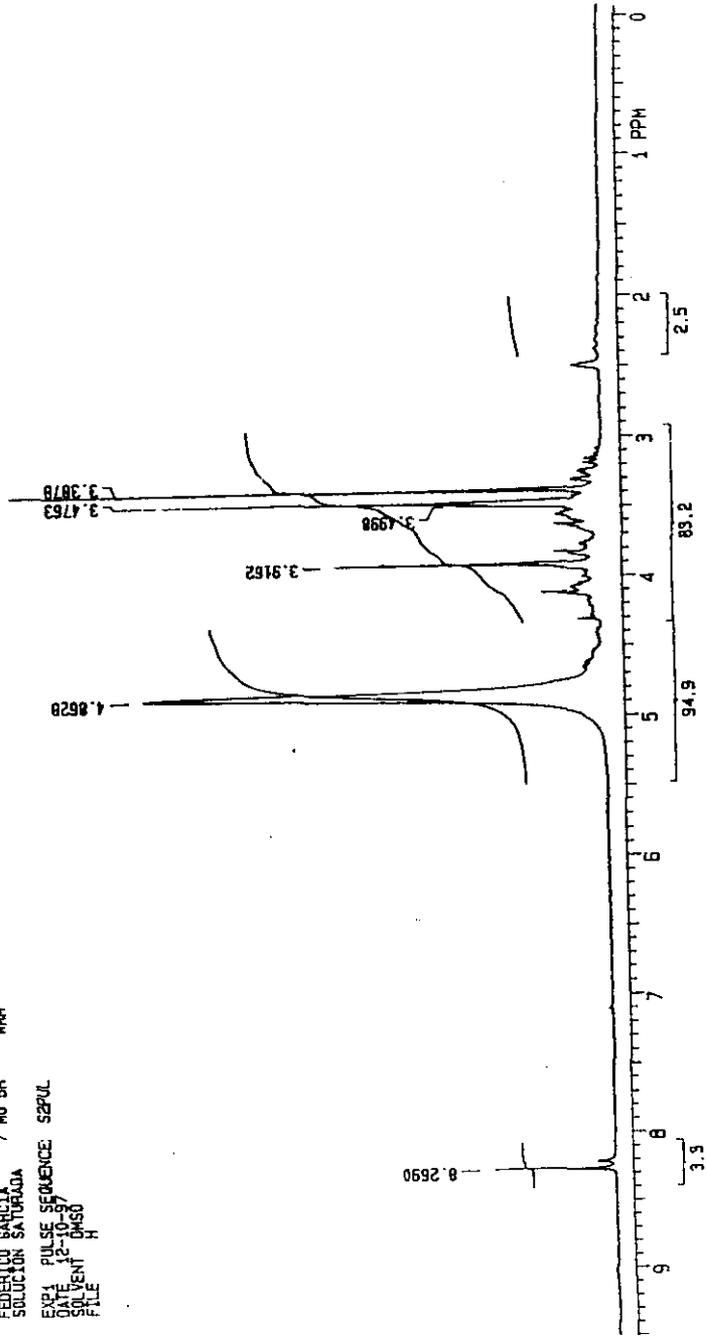
FEDERICO GARCIA
54 BR
ALBERCA 102 QUITACA UNAM
SOLUCION SATURADA, POCO SOLUBLE
EXPS PULSE SEQUENCE: S2P1A
DATE 01-01-87
SOLVENT DMSO
FILE H



*Derivados de
pectinas*

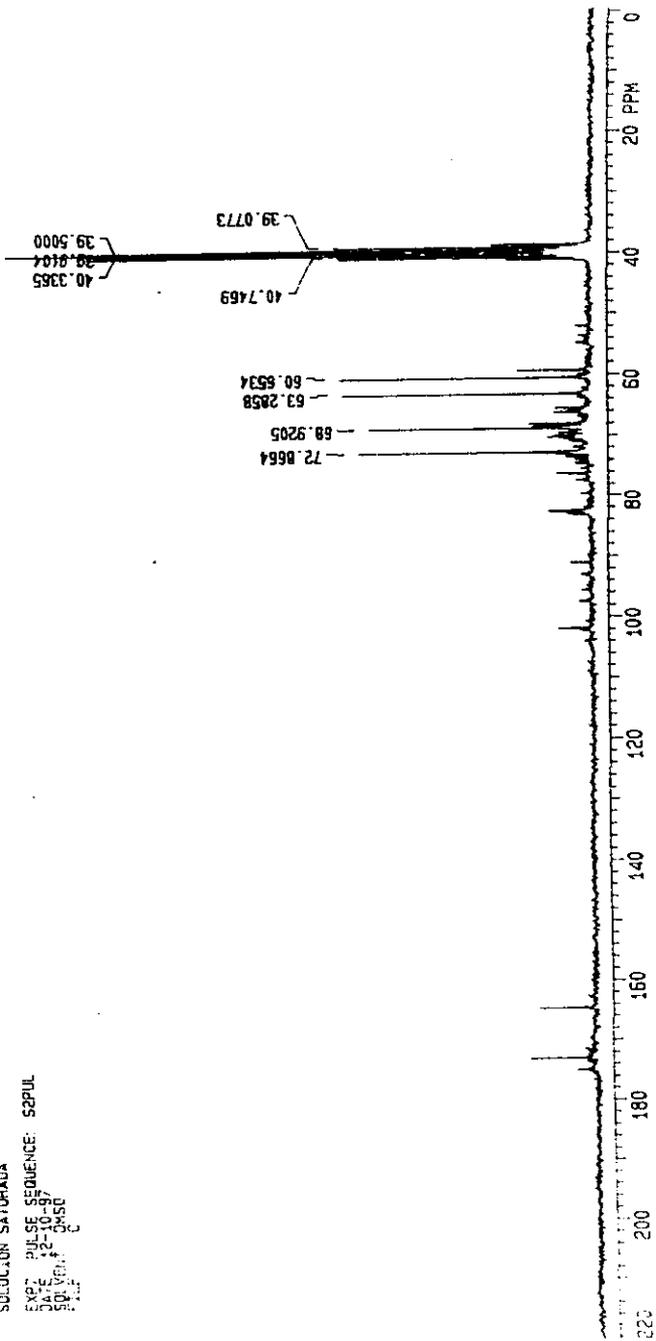
ANALOGO 7

FEDERICO GARCIA 7 MO BR MMH
SOLUCION SATURADA
EXP1 PULSE SEQUENCE: S2PUL
DATE 12-10-97
SOLVENT DMSO
FILE



ANALOGO 7

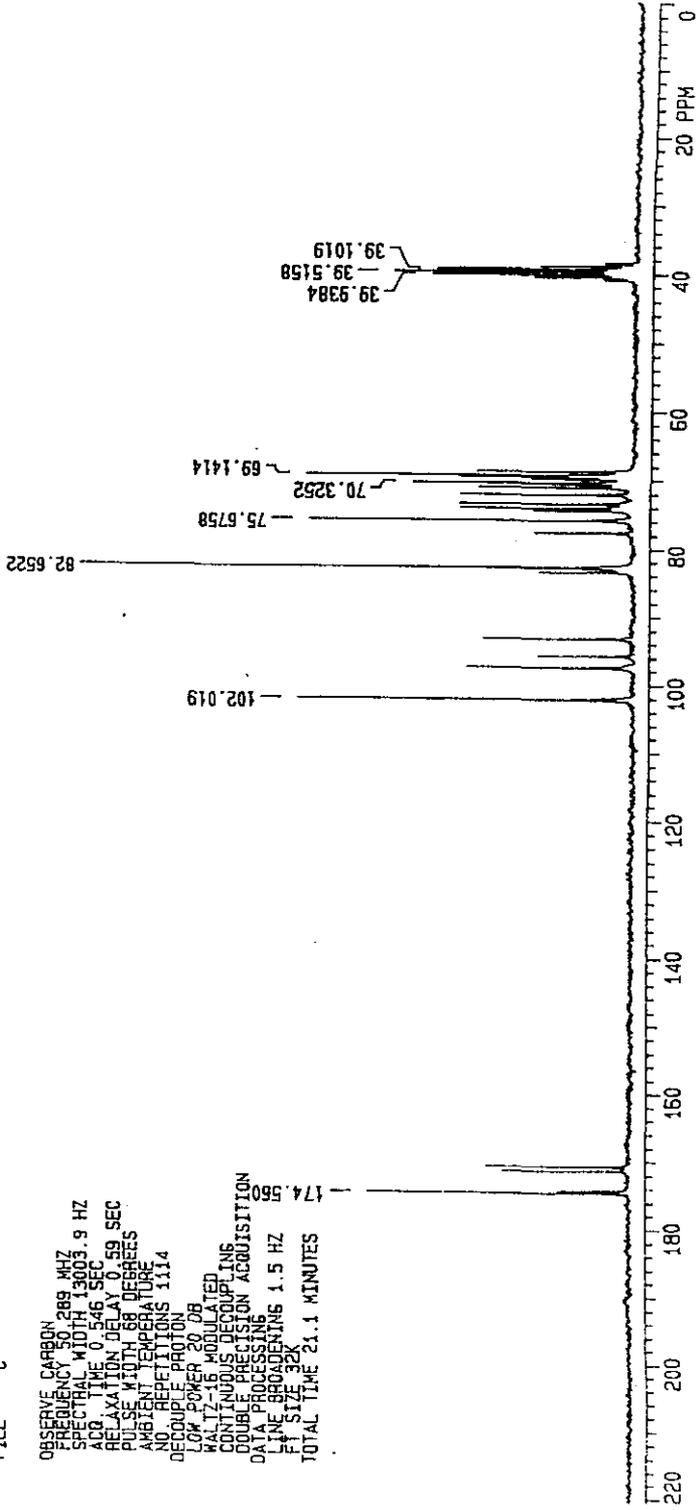
FEDERICO GARCIA
SOLUCION SATURADA
7 MO BR MMH
EXPT: PULSE SEQUENCE: 52PUL
DATE: 12-10-87
SOLVENT: CDCl3
T: 25



ACIDO GALACTURONICO

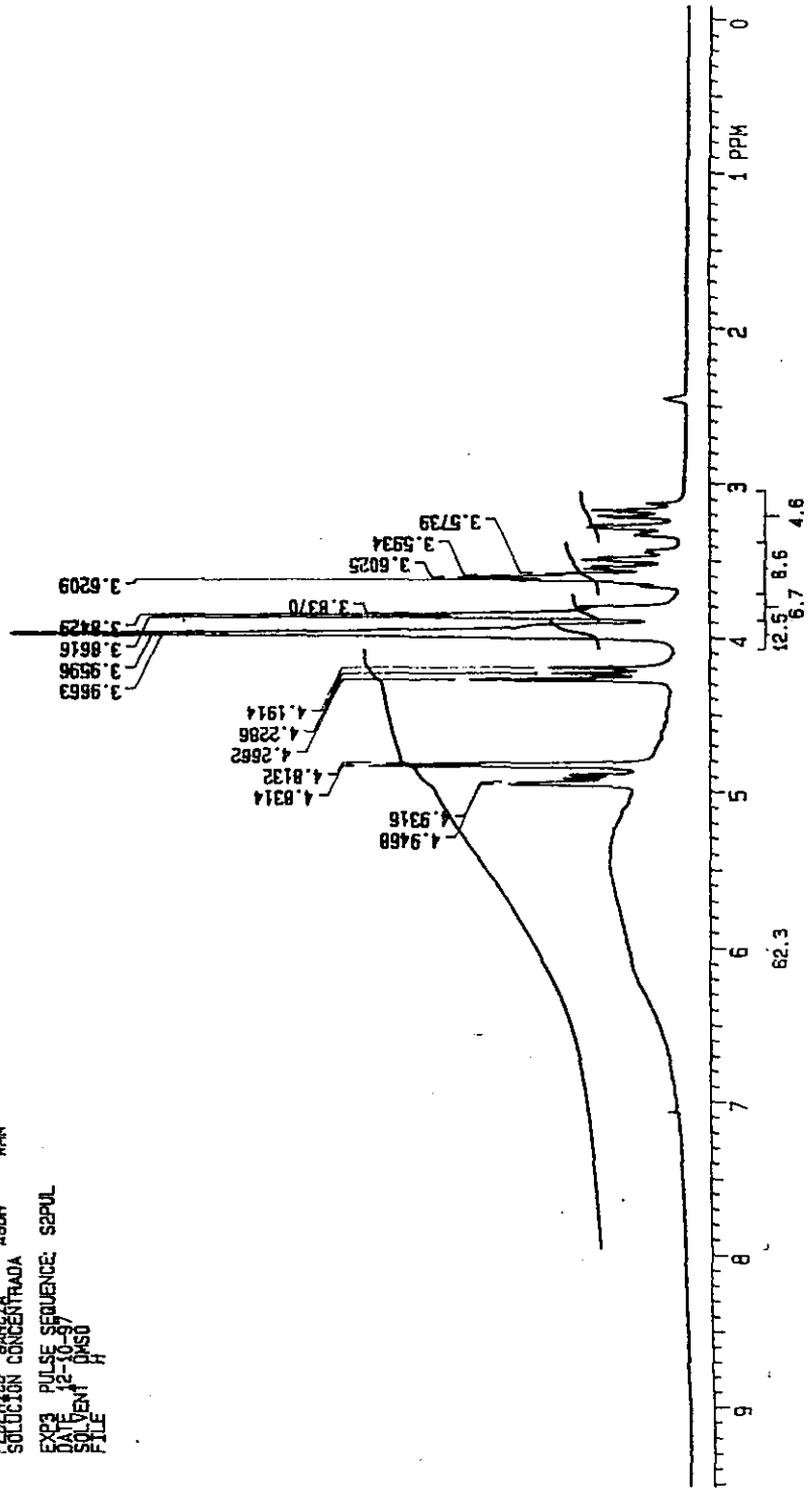
FEDERICO GARCIA ABBR MHM
 EXP4 PULSE SEQUENCE: S2PUL
 DATE 12-10-97
 SOLVENT DMSO
 FILE C

OBSERVE CARBON
 FREQUENCY 50.289 MHZ
 SPECTRAL WIDTH 13003.9 HZ
 ACQ. TIME 0.546 SEC
 RELAXATION DELAY 0.59 SEC
 PULSE WIDTH 88 DEGREES
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPETITIONS 1114
 DECOUPLE PROTON
 LOW POWER 20 DB
 WALTZ-16 MODULATED
 CONTINUOUS DECOUPLING
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 1.5 HZ
 F1 SIZE 32K
 TOTAL TIME 21.1 MINUTES

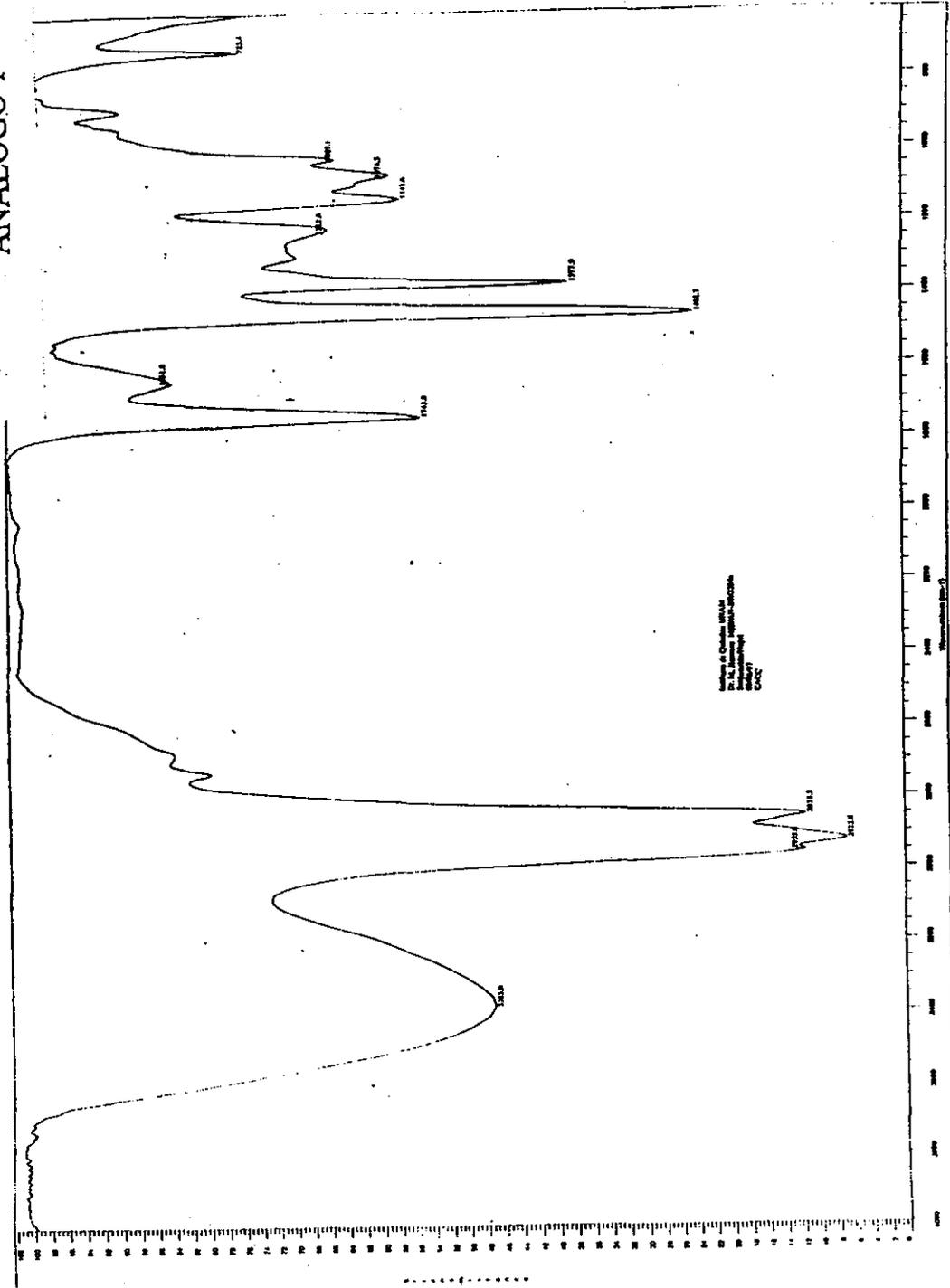


ACIDO GALACTURONICO

FEDERICO SIBETA ASBR MMK
SOLUCION CONCENTRADA
EXP2 PULSE SEQUENCE: SEPUL
DATE: 12-03-77
SOLVENT: DMSO
FILE: DMSO



ANALOGO 1



INSTRUMENTAL ANALYSIS
DIVISION
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION
WASHINGTON, D.C.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar G. y Huitrón C. (1986). Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 8:541-545.

Aguilar G. y Huitrón C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microb. Technol.* 9:690-696.

Aguilar G. y Huitrón C. (1990). Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp CH-Y1043 on different carbon sources. *Biotechnol. Lett.* 12:655-660.

Aguilar G. Blanca A. Trejo, Garcia J:M y Huitrón C. (1991). Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* 37: 912-917.

Aguilar G. y Huitrón C. (1993). Conidial and mycelial-bound exo-pectinase of *Aspergillus* sp. *FEMS Microbiology Letters* 108: 127-132.

Albersheim P., Neukom H., Deuel H. (1960). Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. *Archives of Biochemistry and biophysics* 90: 46-51

Alessi F., Condemine G., Doutheau A., Robert-Baudouvy J. y Anker D. (1996). Synthesis of new methyl esters of 3-deoxy-D- erythro-2-hexulose acid (KDG) analogs, inducers of the expression of pectinase genes in bacteria *Erwinia chrysanthemi*. En *Progreses in Biotechnology 14 Pectina ad Pertinaces*. Visser J. y Voragen A.G.J. Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 845-852.

Beckhorn, E.J., Labbee M.D. y Underk offe, L.A. J.(1965). *Agr. Food Chem.* 13: 30-36

Beldman G., Mutter M., Searle-van Leeuwen M.J.F. Van den Broek L.A.

Schols H.A. y Voragen A.G.J. (1996). New enzymes active towards pectic structures. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases* Visser A.G.J. J. y Voragen. Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 231-245

Berk R., Ounn-Coleman N., Ward M. (1992). Industrial Enzymes from *Aspergillus* Species. En *Aspergillus Biology and Industrial Applications*. Eds. Bennet J.W., Klich M.A. Butterworth-Heinemann. Boston. pp. 155-159

Biely P., Benen J., Kester H.C.M. Heinrichová K. y Visser J. (1996)a. Stereochemistry of hydrolysis of glycosidic linkage by three *Aspergillus* polygalacturonases. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases* Visser J. y Voragen Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 705-714

Biely P., Heinrichová K., y Kruziková M. (1996)b. Induction and Inducers of the Pectolytic System in *Aureobasidium pullulans*. *Current Microbiology*. 33:6-10

Collmer A. y Bateman D.F. (1982). Regulation of extracellular pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi*: evidence that reaction products of pectate lyase and exo-poly α -D-galacturonosidase mediate induction on D-galacturonan. *Physiological Plant Pathology*. 21:127-139.

Cooper R.M. y Wood R.K. (1973). Induction of synthesis of extracellular cell-wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. *Nature* 246. pp 309-311

Chitradon L., Mahakhan P., Poonpairoj P., Kitpreechavanich V. y Lotong N. (1996). Production of pectinases from *Rhizopus* sp. in solid substrates. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. Voragen A.G.J. Eds. Elsevier Amsterdam pp 853-860

Cruickshank R.H. y Wade G. C. (1980). Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gel. *Analytical Biochemistry*. 107:177-181

Darnell J.E. (1986). En: *Molecular Cell Biology*. Harvey Lodish. David Baltimore. New York: Scientific American. pp.942-945.

Davis M. y Hynes M. (1991). Regulatory circuits in *Aspergillus nidulans* chap. 7. En *More Gene Manipulations in Fungi*. Benett J.W. Eds. Academic Press. pp. 151-181.

Delgado, L., Trejo B., Huitrón C. y Aguilar G. (1992). Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Appl Microbiol Biotechnol* **39**:515-519.

Denev P. y Kratchanov Chr. (1996). Influence of some cations on the reaction of apple pectin with ammonia in homogeneous media. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. Voragen A.G.J. Eds. Elsevier Amsterdam pp. 527-534

Dinnella C., Stagni A., Lanzarim F., Alfani M., Cantarella y Gallifuoco A. (1996). Pectin degradation in UF-membrane reactors with commercial pectinase. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. y Voragen A.G. Eds. Elsevier Amsterdam pp. 439-449.

Donner L.W., Irwin P.L. y Kurantz M.J. (1988). Preparative chromatography of oligogalacturonic acids. *Journal of chromatography*. **449**:229-239.

Donner L.W., Irwin P.L. y Kurantz M.J. (1988). High-performance thin-layer chromatographic resolution of oligogalacturonic acids. *Carbohydr. Res.*, **172**:292-296.

Fishman M.L., Cooke P., Hotchkiss A. y Damert W. (1993). Progressive dissociation of pectin. *Carbohydr. Res.*, **248**:303-316.

Fogarty W. y Ward O.P. (1974). Pectinases and pectic polysaccharides En *Progress in industrial microbiology*- **13**: 59-119

Fogarty W. y Kelly C.T.(1983). Pectic enzymes. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. En Applied Science Publishers, London and New York pp. 131-182.

Goldberg R., Morvan C., Jauneau A. y Jarvis M.C. (1996). Methyl-esterification, de-esterification and gelation pectins in the primary cell wall. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases* Visser. J., y Voragen A.G. Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 151-172.

Hennink, H. Stam H. van Oort M.G. (1996). Production, characterization and application of rhamnogalacturonase.. En: *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J., y Voragen A.G. Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 485-

Hicks K.B. y Hotchkiss A.T. Jr. (1988). High performance liquid chromatography of plant-derived oligosaccharides on a new cation-exchange resin stationary phase: HPX-22H. *Journal of Chromatography*. **44**:382-386.

Hotchkiss A.T., Hicks K.B., Doner L.W. y Irwin P.L. (1991). Isolation of oligogalacturonic acids in gram quantities by preparative h.p.l.c. *Carbohydr. Res.* **215**: 81-90

Hotchkiss A.T. y Hicks K.B. (1993). Analysis of pectate lyase-generated oligogalacturonic acids by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Carbohydr. Res.*, **247**:1-7

Hotchkiss A.T. y Hicks K.B. (1990). Analysis of Oligogalacturonic Acids with 50 or Fewer residues by high-performance Anion-Exchange Chromatography and Pulsed Amperometric Detection. *Analytical biochemistry* **184**:200-206

Hsu. E. J. y Vaughn R.H. (1969). Production and catabolite repression of the constitutive polygalacturonic acid trans-eliminase of *Aeromonas liquefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **98**.1:172-281

Hugouvieux C.P.N., Reverchon S., Nasser W., Condemine G. y Robert-Baudouy J. (1996). Regulation of pectinase biosynthesis in *Erwinia chrysanthemi*. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. Voragen Eds. Elsevier Amsterdam pp. 311-346.

Inoue, Y., Yamamoto A. y Nagasawa K. (1987). Depolymerization of pectin with diazomethane in the presence of a small proportion of phosphate buffer. *Carbohydr. Res.* **161**: 75-90.

Jansen E. F., y Jang R. (1946). Esterification of galacturonic Acid and pyurionides with methanol-hydrogen chloride. *J. Amer. chem. Soc.* **68**: 1475-1477

Johnston M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. pp. 458-476.

Keen N.T. y Horton J.C. (1966). Induction and repression of

endopolygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Canadian Journal of Microbiology* 12:443-451

Kertzs Y. (1955). *Methods in Enzymol.* 1: 158-166

Kester H.C.M. y Visser J. (1990) Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem* 12:150-160-

Kimura H y Mizushima S. (1974). Induction of pectinases in *Acrocylindrium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 20: 33-45

Konno H., Yamasaki Y. y Ozawa J. (1980). Fractionation of Polysaccharides and Acidic Oligosaccharides Formed on Partial Acid Hydrolysis of pectin. *Agric. Biol. Chem.* 44(9)2195-2197.

Kubicek C., Messner R., Gruber F., Mach R. y Kubicek-Pranz M.E. (1993). The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microb. Technol.*, 15:90-99

Kuster-Van Someren M.A.R. (1992) PhD Thesis, Research Institute for Plant Protection (IPO), Wageningen The Netherlands.

Leone, G. (1990). Ph.D. Thesis, Research Institute for Plant Protection (IPO), Wageningen The Netherlands.

Laemmli U.K. (1968). Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (london). 227:680-685.

Liu Y. y Luh B.S.(1978). Preparation and thin-layer chromatography of oligagalacturonic acids. *Journal of Chromatography.* 151:39-49.

Luh B.S y Phaff H.J. (1952). *Arch. Biochem. Biophys.* 36:231-232.

Maldonado M. C., Strasser de Saad A.M. y Callier D.A., (1989). Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus Niger* sp. *Sciences des aliments.* 9:101-110.

Mandels M, Parrish FW, y Reese ET. (1962). Sophorose as an inducer of

cellulase in *Trichoderma viride*. *J. Bacteriol.* **83**:400-408.

Melotto E., Greve C. y Labavitch J.M. (1996). Biologically Active Pectin Oligomers in Ripening tomato fruits. En *Progress in Biotechnology 14 Pectin and Pectinases*. Visser J. y Voragen A.G.J. Eds. Elsevier Science Amsterdam pp. 207-219.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**:426-428.

Moran F., Nasuno s. y Starr, M.P. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* pp.123-298

Naohara J. Manabe M. (1992). Separation of oligogalacturonic acids by high-performance gel filtration chromatography on silica gel with diol radical. *Journal of Chromatography.* **603**: 139-143.

Nothnagel E., McNeil M., Albersheim P. y Dell A. (1983). Host-Pathogen interactions. Xxii. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant Physiol.* **71**: 916-926

Nyiri L. (1981). Manufacture of pectinase. *Process Biochemistry.* August 27-30

Oakenfull D.G. (1991). The chemistry of high-methoxyl pectins. En *The Chemistry and Technology of Pectin*. Reginald H. Walter, Ed. Academic Press. California. pp. 87-92

Oxenboll K. (1994). *Aspergillus* enzymes and industrial uses. En *Fems symposium No. 69. The Genus Aspergillus from Taxonomy and Genetics to Industrial Applications*. Keith A. Powell, Peberdy Ed. Plenum Press, New York pp. 147-155.

Patil S. y Dimond A.E. (1968). Repression of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* by sugars and its effect on symptom reduction in infected tomato plants. *Phytopatology.* **38**: 676-682.

Perley A.F., y Page O.T. (1971). *Can. J. of Microbiol.* **27**:415-420

Pilgrim G.W., Walter R.H. y Oakenfull D.G. (1991). Jams, jellies and

preserves. En *The Chemistry and Technology of Pectin*. Reginald H. Walter, Ed. Academic Press. California. pp.24-49.

Pilnik W. (1981). Enzymes in the beverage industry. En: *Enzymes and Food Processing*. Applied Science Publishers. LTD. cap 6 pp. 105-128

Renard C.M.G.C. y Thibault J.F. (1995). Pectins in mild alkaline conditions: beta elimination and kinetics of demethylation. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. Voragen A.G. Eds. Elsevier Amsterdam pp. 603-608.

Rinaudo M. (1996). Physicochemical properties of pectins in solution and gel states. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. y Voragen A.G., Eds. Elsevier Amsterdam pp. 21-33.

Riou C., Freyssinet. G. y Fevre M. (1991). Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental microbiology*. pp. 1478-1484.

Rolin C. (1993). chapter 10 En: *Industrial Gums*. third edition. Whistler R. y Be Miller Eds. Academic press. San Diego. pp. 257-291.

Rambouts F.M. y Pilnik W. (1980). Pectin enzymes En: *Economic Microbiology, Microbial Enzymes and Bioconversions* (Rose, A.H. Ed). Academic Press. New York. 227-282.

Ronne H. (1995). Glucose repression in fungi. *TIG*. (2) ,1, pp. 12-17.

Ros J.M. Coll L., Moliner y J. Laencina. (1995). Oligouronides production in membrane reactor by enzymatic degradation of pectins from citrus peel. A Preliminary study. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. y Voragen A.G. Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 983-990.

Ruijter, G.J.G. y Visser J. (1997). Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. lett.* 151:103-114.

Sajjaanantakul T. y Pitififer. L.A. (1991). Pectinesterase. En "The chemistry and technology of pectin". pp.135-157.

Sakai T. (1992). Degradation of pectins. en *Microbial Degradation of Natural products*. Günther Winkelmann Eds. pp.58-80.

Sánchez, S y Farrés A. (1987). Regulación de enzimas microbianas. En: *Tecnología enzimática*. Munguía A.L y Quintero R.R. UNAM. pp. 37-46.

Schechtman M.G. United States Government regulations affecting *Aspergilli* and their products. pp. 271-287.

Schols H.A. y Voragen A.G. (1996). Complex pectins: Structure elucidation using enzymes. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. y Voragen A.G. Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 3-20.

Schwan R.F., Cooper R.M. y Wheals A.E. (1996). Endo.-polygalacturonase of yeast *Kluyveromyces marxianus* is constitutive, highly active on native pectin and is the main extracellular protein. En *Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases*. Visser J. y Voragen A.G. Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 861-868.

Serrano F. (1985). Produccion de pectina cítrica química, clasificación y propiedades, *Industria alimentaria*. México. Vol. 7 No. 5.

Shinmyo A., Davis I.K., Nomoto F., Tahara T., y Enatsu T. (1978). Catabolite repression of hydrolases in *Aspergillus niger*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5:59-68.

Simms P.J. Hotchkiss A.T, Irwin L. y Kicks K.B. (1995). High-performance liquid chromatographic separation of oligogalacturonic acids on a cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin) bonded-phase column. *Carbohydr. Res.* 278:1-9

Smith J.E. Ed.(1994). *Aspergillus* Biotechnology Handbooks 7. Plenum Press. New York and London. pp.187-191.

Smith J.E., Berry D.R. y Kristiansen B. E Eds. (1983). The filamentous fungi Vol. 4 *Fungal Technology* Eds., Edward Arnold London. pp. 328-332.

Solis-Pereira S., Favela-Torres E., Viniegra-González G. y Gutiérrez-Rojas M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by

Aspergillus niger in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 36-41

Spiro M.D. Kates K.A., Koller A.L. O'Neill M.A., Albersheim P. y Darvill A.G. (1993). Purification and characterization of biologically active 1,4 linked α D. oligogalacturonides after partial digestion of polygalacturonic acid with endopolygalacturonase. *Carbohyd. Res.* **247**:9-20

Stratilová E., Breierová E. y Vadkertiova R. (1996). *Candida boidinii* a new found producer of pectic enzymes complex. En Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases Visser J. y Voragen A.G. Eds. Elsevier Amsterdam pp. 899-906

Tahara T., Kotani H., Shinmyo A. y Enatsu T. (1975). Inhibition of accumulation of polygalacturonase forming activity during catabolite repression in *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* (**53**), no. 6 pp. 409-412.

Teleman A., Hausalo T., Tenkanen M. y Vuorinen T. (1996). Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid-substituted xylooligosaccharides by NMR spectroscopy. *Carbohyd. Res.* **280**: 197-208

Tjan, S., Voragen A.G.J. y Pilnik W. (1974). Analysis of some partly and Fully esterified oligogalactopyranuronic acids by PMR: Spectrometry at 220 Mhz. *Carbohyd. Res.* **34**:15-23

Trejo-Aguilar B.A., Visser J. y Aguilar O. G. (1996). Pectinase secretion by *Aspergillus FP. 180* and *Aspergillus niger N-402* growing under stress induced by the pH of culture medium. en Progress in Industrial Biotechnology 14 Pectins and Pectinases Visser J. y Voragen A.G., eds. Elsevier Amsterdam pp. 915-920

Tsuyumu, S. (1977). *Nature.* **269**:237-238.

UNIPECTINE. (1969) Technical Information 26, avenue de l'opéra, paris. Ed. Maquette Farago. pp. 1-25.

Van Buren J.P. (1991). Function of pectin in plant tissue structure and firmness En: the Chemistry and Technology of Pectin. Reginald H. Walter. Ed.

Academic Press. California. pp. 1-18.

Van der Veen P. (1990) PhD. thesis, Research Institute for Plant Protection (IPO), Wageningen The Netherlands.

Veng-Meng Lo, Hahn Michael G. y van Halbeek H. (1994). Preparation, purification, and structural characterization of linear oligogalacturonides. An FAB-mass spectrometric and NMR spectroscopic study. *Carbohyd. Res.* **255**:271-284

Voragen. A.G.J., Schols H.A., De Vries J.A. y Pilnik W. (1982). High-performance liquid chromatographic analysis of uronic acids and oligogalacturonic acids. *Journal of Chromatography*, **244**: 327-336.

Walter R.H. (1991). Analytical and Graphical methods for pectin. En *The Chemistry and Technology of Pectin*. Reginald H. Walter. Eds. Academic california. Press. pp. 189-225.

Ward Owen. y Moo-Young M. (1989). Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides Vol. 8 Issue 4

Wissemann A. (1979). En: *Basic life. Sciences* Vol. 6 Ed. Parke Plenum. London. pp. 1-25.

Zabotina O., Ibragimova N., Ayupova D., Gurjanov O., Lozovaya V., Beldman B. y Voragen A. (1996). Bioactive fragments from pea pectin En: *Progress in Industrial Biotechnology 14 pectins and pectinases* Visser J. y Voragen A.G., eds. Elsevier Amsterdam pp. 693-701.