

12
2ef



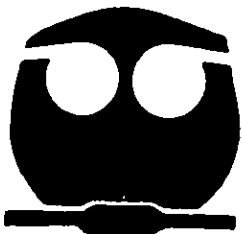
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INFLUENCIA DE 2-DESOXIGLUCOSA Y TWEEN-80
EN LA EXCRECION DE LA
ENDO-POLIGALACTURONASA DE
Kluyveromyces marxianus.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
OCTAVIO DUBLAN GARCIA



MEXICO, D. F.



1998.

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

265682



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Aguilar Caballero Raúl
Vocal Prof. Iturbe Chinas Francisca
Secretario Prof. Cruz Guerrero Alma Elizabeth
1er. Suplente Prof. Leal Lara Hermilo
2do. Suplente Prof. Farres González Saravia Amelia Ma. de Gpe.

Sitio donde se desarrolló el tema:

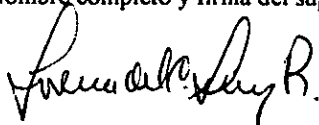
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA**

Nombre completo y firma del asesor del tema



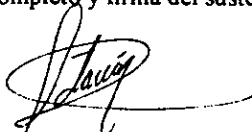
M. en B. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Nombre completo y firma del supervisor técnico



M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Nombre completo y firma del sustentante.



Octavio Dublán García

PARA TU JUEGO MÁS IMPORTANTE...

*Toma el balón hijo, te nombro Quarter Back de tu equipo en le juego de la vida.
Soy tu coach y te lo doy tal como es.
Solo hay un calendario de juegos: dura toda la vida y es un solo juego.*

*Es un largo partido, sin tiempos fuera ni situaciones.
Tú juegas el partido entero toda la vida.
Tendrás un gran backfield y mandarás señales; pero esos tres compañeros, atrás de
la línea, también tienen gran prestigio, se llaman:
Fe, Esperanza y Caridad.*

*Jugarás detrás de una línea verdaderamente poderosa.
De un extremo al otro de ella se hallan:
Honestidad, Lealtad, Devoción al deber, Respeto a ti mismo, Estudio, Limpieza y
Buena Conducta.*

*Los postes del gol, son las perlas puertas del cielo.
Dios es el réferi y único árbitro.
Él hace todas las reglas y no hay apelación contra ellas.*

*Hay diez reglas básicas. Tú las conoces como los Diez Mandamientos y las aplicas
estrictamente de acuerdo a tu propia religión.
Existe una regla fundamental: "Lo que tú quisieras que otro hicieran por ti, hazlo
tú por ellos".*

*En este juego, si llegas a perder el balón, pierdes también el juego.
¡Aquí está el balón! ¡Es tu alma inmortal! ¡Estréchala contra ti!
AHORA HIJO: SAL AL CAMPO Y VEAMOS QUE PUEDES HACER CON ELLA.*

Vincent Lombardi

AGRADECIMIENTOS:

A mis queridos padres Ma. de la Paz García M. y Sergio I. Dublán O. por su gran cariño, paciencia y confianza que siempre me han tenido.

A mis asesores M. en B. Alma C., M. en C. Lorena G. y M. en C. Mariano G. por su confianza, amistad y su gran apoyo.

A la UNAM, por darme la oportunidad de desarrollarme intelectualmente.

A la UAM-I, porque me sirvió de escalafón para alcanzar esta meta.

DEDICATORIAS:

A mis hermanas Lorena, Karen, Erika y Alicia por ser parte de mi vida y de esta historia que aún no termina.

A Héctor M., Ma Elena G., Xochilt G. y Liliana A.

"El hombre más rico del mundo no es aquel que conserva el primer peso que ganó, sino el que conserva el primer amigo que tuvo"

Martha Mason.

A Hugo, Misael, Baciliza, Tere y Pina.

"Amigos son aquellos seres extraños, que siempre están contigo para apoyarte no importando el momento"

Ed. Cunningham.

A mis compañeros de "la escolita": Adriana L., Alejandra S., Andrés T., Carlos B., Cristina R., Claudia C., Dulce M., Edgar S., Estela E., Gina H., Graciela C., Perla M., Rocio G., Yadira P. ...

"La amistad es como la fosforescencia, resplandece cuando el mundo se ha oscurecido en torno"

Demian M.

A Pepe Barreiro y Cristina Cruz.

"La amistad es como la guitarra o el violín, su música cesa de vez en cuando pero sus cuerdas están allí para siempre"

J. Masters Bacher.

A mis compañeros del laboratorio Gaby M., Hugo, J. Luis O., Judith J., Julieta D., Julio, Paty R., Roberto A. ...

"La belleza de una legión extranjera no está solo en sus palacetes, en sus hermosos jardines o en sus grandes calles, sino también en su gente que te hace sentir parte de ella"

L. D.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Enzimas.	4
3.2. Levaduras.	5
3.3. Enzimas pécticas.	6
3.4. Producción y caracterización de la endo-poligalacturonasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	9
3.5. Efecto de la 2-desoxiglucosa en levaduras.	12
3.6. Efecto de Tween-80 en levaduras.	15
4. OBJETIVO.	18
5. PLAN DE TRABAJO.	19
6. METODOLOGÍA.	20
6.1. Producción de la endo-poligalacturonasa.	20
6.2. Actividad enzimática de la endo-poligalacturonasa.	21
6.3. Determinación de proteína.	22
6.4. Concentración de proteína.	23
6.5. Análisis de endo-poligalacturonasa.	23
6.6. Determinación de actividad de endo-poligalacturonasa en geles electroforesis.	28
6.7. Determinación de peso molecular.	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	33
7.1. Efecto de la 2-desoxiglucosa y Tween-80 en la producción de la endo-poligalacturonasa	33
7.2. Análisis electroforético de la endo-poligalacturonasa	37
7.2.1. Electroforesis no desnaturalizante	37
7.2.2. Obtención del peso molecular de la endo-poligalacturonasa excretada por <i>Kluyveromyces marxianus</i> en los diferentes medios por electroforesis no desnaturalizante.	38
7.2.3. Electroforesis desnaturalizante.	46

7.2.4. Obtención del peso molecular de la endo-poligalacturonasa excretada por <i>Kluyveromyces marxianus</i> en los diferentes medios por electroforesis desnaturalizante.	48
7.3 Determinación de actividad en geles de electroforesis no desnaturalizante.	51
7.4 Determinación de actividad en geles de electroforesis desnaturalizante.	55
8. CONCLUSIONES	61
9. BIBLIOGRAFÍA	62
10. ANEXO	66

1. RESUMEN

Se evaluó la influencia de la 2-desoxiglucosa y Tween-80 sobre la endopoligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, comparándose con la excretada en un medio control que solo contenía glucosa. Por medio de electroforesis desnaturalizante, se observó una diferencia en las enzimas excretadas en presencia de estos compuestos, ya que con Tween-80 se obtuvieron cinco subunidades, en 2-desoxiglucosa se obtuvieron dos subunidades mientras que la producida en el medio control cuatro.

Mediante la determinación de actividad enzimática utilizando ácido poligalacturónico como substrato en gel de poliacrilamida, se logró saber cuales subunidades presentaban actividad pectinolítica tanto de la enzima producida en el medio control como de las excretadas en los medios con Tween-80 y 2-desoxiglucosa.

2 INTRODUCCIÓN

Las enzimas pectinolíticas son de gran importancia en la industria alimentaria por los efectos que tiene sobre la textura de los alimentos, ya que muestran actividad macerativa hacia los tejidos de los vegetales, además se utiliza en el proceso de vinos y jugos de frutas y vegetales, pues causa la hidrólisis parcial o total de las pectinas suspendidas con lo cual disminuye la turbiedad y viscosidad de éstas, mejorando así su apariencia.

En la actualidad a nivel industrial se utilizan las pectinasas producidas por hongos ya que se producen en forma extracelular, lo cual presenta ventajas para su recuperación del medio de fermentación, así mismo la mezcla de enzimas pectinolíticas que se tienen en los filtrados libres de células, es capaz de disminuir la viscosidad de jugos de frutas, vinos y almibares (Frances et al, 1990), facilita la maceración de frutas, dando como resultado mayores rendimientos en la obtención de jugos (Saval et al, 1983), eleva el rendimiento de jugos de frutas y mejora la extracción del color de las cáscaras y de las frutas y vegetales macerados (Owen, 1991)

La levadura denominada *Kluyveromyces marxianus*, es productora de varias enzimas, pero bajo condiciones microaerobias o en presencia de pectina solo excreta endopoligalacturonasa al medio, lo que facilita su recuperación. Esta enzima se podría utilizar en la industria alimentaria ya que se ha demostrado en pruebas de laboratorio, que es capaz de clarificar eficientemente los jugos de manzana (Gómez-Ruiz et al. 1988), pues cataliza la despolimerización de sustancias pécticas (Takuo et al, 1983) atacando los enlaces internos dando como resultado una rápida reducción de la viscosidad (Suckling, 1990), además de que es efectiva en la maceración de tejidos de papa y zanahoria (Lim et al. 1980).

En estudios previos se ha demostrado que algunos factores ambientales tales como el oxígeno disuelto, la temperatura, así como la presencia de 2-desoxiglucosa y surfactantes como el Tween-80, pueden ser capaces de inducir o reprimir la excreción de la pectinasa en *K. marxianus*. Se sabe que bajo condiciones óptimas de crecimiento, la presencia de 2-desoxiglucosa y Tween-80 en concentraciones de 0.2% y 0.1% respectivamente, inducen la

producción de la endo-poligalacturonasa (Cruz-Guerrero 1995, Martínez-Moroy 1997, Montero-Andrade 1997).

En este trabajo se pretende hacer una comparación de la endo-poligalacturonasa producida en diferentes medios, caracterizándola por medio de patrones electroforéticos, ya que de encontrarse cambios en estos patrones, podrían sugerir un cambio en el mecanismo de excreción de esta pectinasa o en la estructura de la enzima que modifique su actividad.

La importancia de este trabajo radica en generar conocimiento sobre las variables que influyen en la excreción de endo-poligalacturonasa a partir de *K. marxianus* en vías de establecer el potencial de esta levadura como una fuente alterna de producción de enzimas pectinolíticas para su uso en la industria alimentaria.

3 ANTECEDENTES

3.1 ENZIMAS:

El nombre "enzima", fue creado en 1878 por Kuhne a partir del término griego "en la levadura". Las células pueden actuar como máquinas químicas porque poseen enzimas, que son capaces de aumentar la velocidad de reacciones químicas específicas. Las enzimas son moléculas proteicas muy especializadas, elaboradas por las células a partir de aminoácidos. Cada enzima solamente puede catalizar un tipo específico de reacción química. Se conocen en la actualidad casi 2000 enzimas diferentes. Las enzimas superan notablemente a los catalizadores confeccionados por el hombre en su especificidad reactiva, su eficacia catalítica y su capacidad de actuación en condiciones suaves de temperatura. En unos segundos puede catalizar secuencias de reacciones muy complejas, las cuales requerirían días, semanas o meses de trabajo en un laboratorio químico (Scriban, 1984, Lehninger, 1991).

La sustancia que sufre la transformación en presencia de la enzima se conoce como el sustrato de dicha enzima. El choque entre dos moléculas produce energía que puede ser absorbida por las moléculas mismas, o puede ser disipada bajo forma de calor en el medio. Si la energía absorbida por el sustrato es suficiente para franquear la barrera de potencial llamada energía de activación, el sustrato se puede transformar y conducir a la formación de un producto, es decir a un estado final, diferente del estado inicial. Esta energía de activación generalmente es elevada y no es compatible con las condiciones del medio en el cual se debe desarrollar las reacciones del metabolismo de los organismos vivos como pH cercano a la neutralidad, temperatura comprendida entre 0 y 40°C, presión cercana a la presión atmosférica. Por tanto, la realización de esas reacciones necesita de catalizadores bioquímicos, las enzimas, cuya acción consiste, como la de todo catalizador, en "abatir" la energía de activación, acelerando la reacción, cuya velocidad se encuentra multiplicada por un factor del orden de 10^{12} - 10^{20} . Al final de cada ciclo de reacción, la enzima permanece inalterada. (Scriban, 1984).

Las enzimas son las llaves útiles de la biotecnología y de la bioindustria, son la esencia de la ingeniería microbiológica, ya que catalizan las reacciones metabólicas puestas en juego y se aseguran de su regulación (Scriban, 1984).

Las enzimas tienen una estructura tridimensional globular, están formadas generalmente por una sola cadena polipeptídica, y sólo logran ser activadas cuando los polímeros desarrollan una conformación que permite establecer su centro activo. En muchos casos están integrados por una parte proteica y una no proteica; la primera se conoce como apoenzima y la segunda como cofactor. Este último es un compuesto de peso molecular bajo, muy estable al calor, que presenta diversos grados de unión de la apoenzima; los principales cofactores son las vitaminas (tiamina, niacina, piridoxina, riboflavina y ácido pantoténico), los cationes (cobre II, molibdeno II, zinc II, magnesio II, hierro II, manganeso II y calcio II), los aniones (cloruros) y otras sustancias orgánicas.

Debido a su naturaleza, a las enzimas les afectan los mismos factores que alteran a las proteínas; por esta razón, cada una de ellas, para actuar en forma óptima, requiere de condiciones específicas como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, etc. (Baduí, 1981).

Las enzimas se encuentran en todos los organismos vivos tales como animales, plantas y microorganismos.

La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria alimentaria son enzimas de origen microbiano, ya que presentan ventajas como (Cruz-Guerrero, 1995):

- 1) La síntesis de enzimas es predecible y controlable.
- 2) Hay disponibilidad de materias primas como sustrato con una composición relativamente constante.
- 3) Su producción no está sujeta a variaciones estacionarias, no existe riesgo de escasez por cambios climáticos o situaciones geográficas.
- 4) La manipulación genética ha aumentado considerablemente las posibilidades de optimizar los rendimientos a través de mutaciones, de selección de cepas y de

condiciones de crecimiento y más recientemente, mediante la tecnología del ADN recombinante.

- 5) Diseño de enzimas mejoradas por ingeniería de proteínas.

3.2 LEVADURAS

Cuando Pasteur comenzó sus estudios en 1857, la opinión que prevalecía respecto a la fermentación y putrefacción de la materia orgánica era que los cambios que acontecen en la materia en descomposición se debían principalmente a la acción del oxígeno del aire y que el proceso era exclusivamente de carácter químico. En esa época Pasteur era profesor de la Universidad de Lille, Francia, una ciudad en donde la fabricación de la cerveza y vinos, productos de la fermentación alcohólica, era una industria de mucha importancia. Estudió concienzudamente las fermentaciones alcohólicas y demostró que los cambios que ocurren en la materia fermentada, dando como resultado la formación de alcohol, no eran simples procesos químicos sino que se llevaban a cabo por la acción de las levaduras vivas. Demostró también que otros tipos de fermentaciones que dan origen a otros productos químicos, son producidos por bacterias u otros microorganismos, y que cada tipo tiene su modo característico de fermentación.

Alrededor de 1880, el investigador danés Hansen estableció la práctica, hoy universal, de utilizar en las industrias de fermentación cepas puras de levaduras, cultivadas en el laboratorio y seleccionadas especialmente por su eficacia para efectuar un tipo determinado de fermentación. El más importante de los cambios fermentativos producidos por las levaduras es la descomposición del azúcar en alcohol (la llamada fermentación alcohólica) (Burdon y Williams 1983).

Las levaduras son microhongos que se encuentran generalmente en forma de células únicas y que se producen por gemación. Algunas levaduras se encuentran únicamente como células individuales y a veces forman cadenas cortas, mientras que otras pueden formar diversos tipos de filamentos. Una característica de la población en crecimiento de

las células de la levadura es la presencia de yemas, producidas cuando la célula se divide. En las levaduras, la envoltura celular incluye la membrana citoplásmica, constituida por lípidos, proteínas y mananos, el espacio periplásmico y la pared celular, que contiene algunas proteínas y gran cantidad de glucano y manano (Owen, 1991).

De acuerdo a la clasificación de las levaduras, *Kluyveromyces marxianus* es una levadura ascospórica, pertenece al grupo de las Eumycota del tipo Hemiascomycetes que se encuentran dentro de la clase Ascomycotina. Es del orden Endomycetales; de la familia Saccharomycetaceae y subfamilia Saccharomycetoideae; del género *Kluyveromyces* y de la especie *marxianus*. Produce de 1 a 4 ascosporas, su forma va de reniforme a media luna, puede fermentar glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, D-xilosa e inulina. No asimila nitrato. Crece a 37°C (Cruz-Guerrero, 1995).

Por otro lado *Kluyveromyces marxianus* es productora de enzimas como β -fructofruktanohidrolasa, β -galactosidasa y la endo-poligalacturonasa entre otras (Cruz-Guerrero, 1995). Estas se podrían utilizar en la industria alimentaria, por lo que dicha levadura se considera de gran potencial económico (Espinoza et al. 1992).

En el caso particular de la pectinasa de *K. marxianus* se ha demostrado su uso en la maceración en tejidos de papa y zanahoria. (Lim et al. 1980, Takuo et al. 1983). Gómez-Ruiz et al. (1988), reportaron que la endo-poligalacturonasa de esta levadura es tan efectiva en la clarificación de jugo de manzana como la pectinasa comercial.

3.3 ENZIMAS PÉCTICAS

Las enzimas pécticas se pueden clasificar en tres categorías principalmente, (Whitaker, 1972, Colin, 1990, Tucker y Woods, 1991.):

- a) Pectato liasas
- b) Pectasas
- c) Pectinasas

a) Pectato liasas: Actúan sobre las pectinas las cuales son parciales o totalmente desesterificadas. Catalizan la ruptura de los enlaces glicosídicos por trans-eliminación del hidrógeno de las posiciones 3 y 4, formando dobles enlaces, obteniéndose unidades de galacturónidos insaturados. Pueden ser de tipo endo o exo.

b) Pectasas: Se les conoce también con los nombres de pectinesterasas, pectinmetoxilasas y pectinmetilesterasas. Catalizan la hidrólisis de los enlaces éster de las sustancias pécticas, produciendo metanol y ácido poligalacturónico.

c) Pectinasas: Se les conoce como poligalacturonasas, pectolasas y pectinopoligalacturonasas. Catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la pectina y de los ácidos pécticos y pectínicos, convirtiéndolos en ácido metil-galacturónico o ácido galacturónico según sea el caso.

Las enzimas pécticas son producidas por algunos hongos como el *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus tritici*, *Sclerotinia rofsii*, *Phytium sp.* y *Geotricum candidum*; por levaduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudotropicalis* y *Saccharomyces cerevisiae*; y por algunas bacterias como *Erwinia carotovora* y *E. chrysanthemi*. (Phaff y Demain, 1956., Ried y Collmer, 1985, 1986., García-Garibay et al., 1987a,b., Frances et al., 1990 y Owen, 1991). También se encuentran en tomates y zanahorias pero la actividad es mínima.

Las pectinasas de los hongos actúan en un rango de pH de 3 a 6 de acuerdo a la procedencia de la enzima. Aumenta su actividad en presencia de sales alcalinas y en presencia de pectinas. Es inhibida por el catión Mg (II) y por proteínas inertes. La endopoligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* tiene una temperatura óptima que va de 30°C a 50°C, pero es inactiva a 75°C (Lim et al., 1980).

Las pectinasas son producidas por bacterias, hongos y algunas levaduras, sin embargo desde el punto de vista comercial, las pectinasas de hongos son preferidas por la industria por varias razones, principalmente porque se producen en forma extracelular, lo cual presenta ventajas para su recuperación del medio de fermentación, la mezcla de actividades pectinolíticas que se tienen en los filtrados libres de células es capaz de disminuir la viscosidad de jugos de frutas, ayuda a la maceración de tejidos de vegetales y frutas, de esta manera aumenta los rendimientos en la obtención de jugos y, las características de las pectinasas producidas por estos microorganismos como el pH y temperaturas óptimos de actividad, son muy similares a las condiciones de uso en la elaboración de jugos de frutas (Saval et al., 1983).

3.4 PRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA POLIGALACTURONASA DE *Kluyveromyces marxianus*.

Kluyveromyces marxianus produce la endo-poligalacturonasa, de forma extracelular (Luh y Phaff, 1951), ésta actúa de forma específica sobre los ácidos poligalacturónicos y oligagalacturónicos. Cuando se pone a crecer esta levadura bajo condiciones microaerobias con cierta agitación a 30°C, en un medio que contiene base libre de nitrógeno para levadura, se obtiene únicamente endo-poligalacturonasa (Montero-Andrade, 1997).

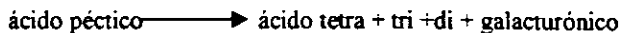
En particular la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* es una enzima que cataliza la despolimerización de sustancias pécticas pues ataca los enlaces internos dando como resultado una rápida reducción en la viscosidad, además se ha demostrado que es capaz de clarificar jugos de frutas y vegetales en pruebas de laboratorio (Takuo et al. 1983. Gómez-Ruiz et al. 1988. Colin, 1990). también muestra actividad macerativa en

tejidos de papa y zanahoria (Lim et al. 1980) y ayuda a la elaboración del vino (Owen, 1991).

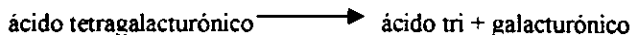
3.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PECTINASA

La endo-poligalacturonasa de *K. marxianus* cataliza la hidrólisis de ácido péctico, la cual es la ruptura de éste en ácidos tetra, tri, di y galacturónico, reacción que sucede como se muestra a continuación (Demain y Phaff, 1954, Phaff y Demain, 1956):

a) Esta reacción consiste en un rápido ataque inicial sobre la cadena lineal en un mecanismo al azar, en el cual se llega hasta un 25% de hidrólisis aproximadamente.



b) La segunda fase es más lenta, en ésta los enlaces que aún están disponibles son hidrolizados.



c) Finalmente una hidrólisis extremadamente lenta, la cual cesa hasta un 70% de ésta, es decir desde el ácido péctico hasta el ácido galacturónico.



De acuerdo con Lim et al. (1980) y Frances et al. (1990) la pectinasa de *K. marxianus* es un sistema multienzimático formado por cuatro endo-poligalacturonasas, a las que se denominan enzima I, enzima II, enzima III y enzima IV. Las propiedades de estas enzimas se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1 PROPIEDADES DE ENDO-POLIGALACTURONASA DE *Kluyveromyces marxianus*

	ENZIMA I	ENZIMA II	ENZIMA III	ENZIMA IV
pI (Punto isoeléctrico)	6.3	6.0	6.3	5.7
Peso molecular (Daltons)	49600	49600	46700	49600
pH óptimo	4-5	4-5	4-5	4-6
Temperatura óptima (°C)	50	50	50	50

(Lim, J. et al. 1980, Frances, M. et al. 1990)

Las cuatro enzimas son glicoproteínas, cuyo principal carbohidrato es la manosa, las cuatro son estables entre valores de pH de 3.5 a 6.0 y a temperaturas mayores que 50 °C, pero pierden la mayoría de su actividad a 70°C.

Por otro lado Smith y Pyle (1990), encontraron que existen nueve endo-poligalacturonasas producidas por *K. marxianus* con un punto isoeléctrico en el intervalo de 5.6-6.5, así como un peso molecular en la región de 43000 Da.

La aireación a la que se efectúa la fermentación es un aspecto importante que influye en la producción de la endo-poligalacturonasa y la morfología de *Kluyveromyces marxianus* (García-Garibay et al. 1987a). Esta enzima es producida constitutivamente en condiciones de baja aireación (Luh y Phaff, 1951), Wimborne y Rickard (1978), encontraron que en medio de glucosa, la producción de la enzima se ve reprimida con un nivel de oxígeno disuelto del 60%, mientras que a 0% la enzima se desreprime, por otra

parte García-Garibay et al. (1987a), estudiaron la influencia del oxígeno en la producción de pectinasa, reportando que con una alta aireación en fermentador, la producción de la enzima es completamente reprimida (en suero de leche y medio de lactosa), mientras que en condiciones anaerobias la enzima sí es producida. Como se tenía un intervalo de oxígeno en el cual la producción de la endo-poligalacturonasa era obtenida, Cruz-Guerrero (1995) reportó que a 3.3 mg de oxígeno disuelto/L, la producción de endo-poligalacturonasa se ve reprimida mientras que a 2.4 mg de oxígeno disuelto/L, se obtuvo la mayor producción de dicha enzima.

García-Garibay et al. (1987), realizaron estudios de producción de la pectinasa en medio con lactosa y suero de leche con pectina observando un efecto de desrepresión en condiciones aerobias. *Kluyveromyces marxianus*, no usa como fuente de carbono la pectina, ácido poligalacturónico y ácido galacturónico, pero sí usa la glucosa, galactosa y glicerol. Cruz-Guerrero (1995), reportó que la pectina presentó un efecto inductor en la producción de la endo-poligalacturonasa tanto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto como a diferentes temperaturas, este compuesto ejerció un efecto similar en la producción de la enzima al que se obtuvo con la disminución del oxígeno disuelto.

3.5 EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA EN LEVADURAS

La 2-desoxiglucosa es un análogo estructural de la glucosa. Es un fuerte inhibidor del crecimiento y utilización de azúcares en las levaduras (Heredía et al. 1964a), ya que no puede ser metabolizado por éstas, por lo cual es un inhibidor competitivo para la asimilación de hexosas en sus diferentes caminos metabólicos (Cruz-Guerrero, 1995). El efecto que se tiene con esta hexosa, se puede observar en la síntesis de manosa y glucanos provocando lisis osmótica, ya que la pared celular se vuelve más frágil (Biely et al., 1971, Rose y Harrison, 1987). El mecanismo bioquímico se basa en la incorporación de la 2-desoxiglucosa dentro de nucleótidos con la posibilidad de entrar al metabolismo de la célula (Cruz-Guerrero, 1995).

Se provoca una inhibición de la síntesis de polisacáridos por la presencia de 2-desoxiglucosa en nucleótidos lo cual ocasiona que no se lleven a cabo las reacciones normales. A altas concentraciones de 2-desoxiglucosa se atrapa una cantidad sustancial de

fosfato como 2-desoxiglucosa-6-fosfato (2DG-6-P) y el contenido de ATP en la célula se disminuye en gran medida. Por lo que las levaduras mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa se han aislado debido a que no tienen la hexoquinasa o a que presentan una fosfatasa específica para la 2-desoxiglucosa-6-fosfato (Rose y Harrison, 1987 y Cruz-Guerrero, 1995).

Los cambios que ocurren en el metabolismo de las levaduras se pueden explicar por los efectos que causa esta hexosa en su morfología, y lo que se propone es:

- La interferencia de la 2-desoxiglucosa con el transporte y fosforilación del sustrato dando como resultado el bloqueo de la glucosa fosfato isomerasa, o algún otro paso de la glucólisis por los productos fosforilados.

- La inhibición de la glucólisis en las levaduras por acumulación de 2-desoxiglucosa-6-fosfato, la cual impide la entrada del azúcar a la célula.

- La resistencia a 2-desoxiglucosa es debida a la presencia de una fosfatasa intracelular que previene la acumulación de 2-desoxiglucosa-6-fosfato. (Heredia et al., 1964 y Heredia y Sols, 1964).

- La inhibición del crecimiento por disminución de las reservas celulares de uridin nucleótidos necesarios para la síntesis de polisacáridos, dicha disminución resulta de la acumulación de uridin-difosfato-2-desoxiglucosa (UDP-2-DG)

- Existe un efecto lítico en la pared celular que se desencadena con la 2-desoxiglucosa, esto sucede porque el UDP-2-DG inhibe la inserción de glucosa en la pared celular o por la incorporación de la 2-desoxiglucosa en la pared (Byron, 1968).

El transporte y la fosforilación de la 2-desoxiglucosa en la levadura, son llevados a cabo por los sistemas constitutivos comunes para la glucosa, manosa y fructosa (Heredia et al 1964), y dado que la 2-desoxiglucosa es un análogo de la glucosa esta puede ser utilizada para simular la presencia de hexosas durante las fermentaciones de modo que si la biosíntesis de alguna enzima está reprimida por la glucosa, la 2-desoxiglucosa ejercerá la misma función (Cruz-Guerrero, 1995).

La lisis en levaduras puede ocurrir solo en los sitios de glucanos, y es producida solo si la célula está creciendo, así mismo el UDP-2DG se acumula en presencia de glucosa

y galactosa, finalmente cualquier efecto de la inhibición de fermentación por 2-desoxiglucosa es probablemente secundario (Byron, 1968).

Por otro lado, se ha encontrado que en un medio con 0.02% de 2-desoxiglucosa, el porcentaje de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* disminuye durante el período de crecimiento. En un medio con 0.05% y 0.2% de esta hexosa, la viabilidad de estas células disminuye en dos diferentes fases del crecimiento. La primera toma lugar en la fase exponencial temprana de crecimiento. La segunda comienza en la fase estacionaria de crecimiento, (Biely et al. 1971).

Cruz-Guerrero (1995), realizó estudios para investigar el efecto de la 2-desoxiglucosa, en diferentes cepas de *K. marxianus* (cepa CDBB-L-278, productora de pectinasa e inulinasa, Cepa UCD-C-351, productora de pectinasa, Cepa NCYC-587, productora de β -galactosidasa, cepa NCYC-1429, productora de inulinasa y lactasa), observando que a un nivel de 0.2% de esta desoxiazúcar, no fue tóxica para las cepas estudiadas, además que favoreció la producción de la endo-poligalacturonasa, en las cepas CDBB-L-278 y UCD-C-351, no observándose este efecto en las otras dos cepas. Así mismo observó que la cepa CDBB-L-278, fue la mejor productora de esta enzima.

Para un nivel de 0.4% de 2-desoxiglucosa, estableció que no fue tóxica para la cepa CDBB-L-278, mientras que para las otras tres cepas se observó un efecto negativo en su crecimiento.

Tomando en cuenta estos resultados, concluyó que la cepa más resistente a la 2-desoxiglucosa, es la cepa CDBB-L-278, además de que la adición de esta hexosa al medio, incrementó la producción de endo-poligalacturonasa e inclusive a concentraciones elevadas (0.6 %) todavía se encontraba el doble de la actividad enzimática.

Por otro lado, se hizo una comparación de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* crecida en un medio control de glucosa con la de un medio en presencia de 2-desoxiglucosa, observando que sólo difieren en apariencia macroscópica. La pared celular del control se encontró menos hidrofóbica que la pared celular de la levadura en presencia

de 2-desoxiglucosa. Las formas esféricas de las células crecidas en presencia de 2-desoxiglucosa, y sus paredes más plegadas y fragmentadas que las células crecidas en un medio control (glucosa), indican que con 2-desoxiglucosa se sintetizan paredes celulares muy debilitadas. (Biely et al. 1971).

La presencia de la 2-desoxiglucosa durante el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* produce un aumento en la producción de la endo-poligalacturonasa (Cruz-Guerrero, 1995), en trabajos posteriores mediante microscopía óptica se observó que en presencia de esta 2-desoxiazúcar se tiene un cambio importante en la morfología de las células de *K. marxianus* CDBB-L-278. Por medio de microscopía electrónica confirmaron este cambio de morfología, observándose que a mayor concentración de 2-desoxiglucosa mayor es la tendencia al dimorfismo, y a la gemación multipolar, lo cual además se correlacionaba con la mayor producción de pectinasa. (Cruz-Guerrero et al. 1997).

3.6 EFECTO DEL TWEEN-80 EN LEVADURAS

Los surfactantes, son sustancias que pueden actuar en la superficie cuando disminuye la tensión superficial del líquido en que está disuelta, o bien la tensión superficial de la interfase si hubiera otra fase presente. Para que una sustancia sea surfactante, es necesario que contenga dos grupos: uno polar o hidrófilo y otro no polar o hidrófobo.

Las propiedades generales y comportamiento de los agentes tensoactivos se deben al carácter dual de sus moléculas (grupo hidrófilo y grupo lipófilo); es así como el antagonismo entre las dos secciones de la molécula y el equilibrio entre ellas es la que da al compuesto propiedades de actividad superficial. El grupo hidrófilo ejerce un efecto solubilizante y tiende a llevar a la molécula a disolución completa. El grupo hidrófobo, en cambio, y debido a su insolubilidad, tiende a contrarrestar la tendencia del otro.

El término surfactante no iónico, se refiere principalmente a los derivados polioxietilenados y polioxipropilenados, también se incluyen en estas categorías los derivados del sorbitán, alcanolamidas grasas, etc. Los surfactantes no iónicos tienen la ventaja de que son estables frente a la mayoría de los productos químicos en las concentraciones usuales de empleo. En los agentes no iónicos el grupo hidrofóbico está formado por una cadena larga que contienen una serie de grupos débilmente solubilizantes (hidrofilicos), tales como enlaces etéreos o grupos hidroxilos en sus moléculas. La repetición de estas unidades débiles tiene el mismo efecto que un hidrófilo fuerte, salvo que no tiene ninguna ionización. Caso similar al de los azúcares que a pesar de su estructura hidrocarbonada contienen un gran número de hidroxilos, haciendo soluble la molécula en agua (Garfias y Ulacia, 1993).

Se ha observado que algunos microorganismos reaccionan de manera positiva en la producción de enzimas hidrolíticas al utilizarse surfactantes. Estudios que se han realizado con la adición de Tween-80 (mono oleato de polioxietileno) un surfactante no iónico, a los medios de cultivo, da como resultado un marcado incremento en la producción de enzimas. Al parecer este agente surfactante juega un papel importante tanto en la producción como en la secreción de las enzimas microbianas (Reese y Maguire, 1969).

La adición de Tween-80 al medio de cultivo cuando se crecieron *Gliocladium vermoeseni*, *Pestalotia virgatula*, *Neurospora crasa*, *Trichoderma viride* entre otras, estimuló la producción de la enzima esterasa, benzoil esterasa, celulasa y xilanasas respectivamente, hasta un doble de su valor inicial (Reese y Maguire, 1969., Buzzi et al., 1993., Viesturs et al., 1996). En estudios realizados por Otha y Hayashida, (1983), la adición de Tween-80 más ergosterol al medio base, hizo posible la obtención de altas concentraciones de etanol en cepas de sake, *Kyokai* no.7. Por otro lado *Phanerochaete chrysosporium*, en presencia de Tween-80 o ácido oléico, fue capaz de producir ligninasa y convertir lignina a CO₂. (Asther y Corrieu, 1987, Lestan et al., 1993). Así mismo Deshpande et al. (1987), al adicionar 0.1% de ácidos grasos (oléico, linoléico y linolénico) a *Penicillium funiculosum* y mutantes de ésta, aumentaron la actividad de exo-glucanasa y

β -glucosidasa, también al adicionar 0.1% de Tween-80 a estas mismas cepas, aumentó los niveles de exo-glucanasa y 3-glucosidasa. Schlochtermeyer et al. (1992), propusieron que en el cultivo de *Streptomyces reticuli*, al adicionar Tween-80 se incrementa la producción de carboximetil celulasa, como resultado del aumento de la permeabilidad de la membrana. Kuhad et al. (1994), observaron que al adicionar 0.02% de Tween-80 hubo un incremento en la secreción de la celulasa de *Fusarium oxysporum* DSM 841, en un 30 %.

De lo anterior se desprende que el Tween-80, puede interactuar con la membrana celular y la superficie de sustratos insolubles, alterar la permeabilidad de la membrana, así de esta manera conducir la liberación de las enzimas extracelulares.

Martínez-Monroy (1997), comparó la producción de endo-poligalacturonasa de *K. marxianus* en un medio con glucosa con la de un medio con 0.1% de Tween-80, observando un incremento en la actividad específica de la endo-poligalacturonasa.

A pesar de los estudios realizados aún no se conoce el modo de acción de los surfactantes (Reese y Maguire, 1969., Asther y Corrieu, 1987). Sin embargo se ha postulado que este tipo de surfactantes actúan sobre la membrana celular aumentando su permeabilidad para la liberación de la enzima (Reese y Maguire, 1969, Lestan et al., 1993).

4 OBJETIVO

Determinar por medio de patrones electroforéticos, si existe alguna diferencia en la poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 en presencia de 2-desoxiglucosa y tween-80, con respecto a la producida en un medio control que solo contiene glucosa.

5 PLAN DE TRABAJO

La producción de la endo-poligalacturonasa se llevó a cabo mediante el cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 en presencia de glucosa (medio control), 2desoxiglucosa y Tween-80 en cada caso.

Una vez terminada la fermentación la endo-poligalacturonasa se separó de la biomasa, por medio de la centrifugación del caldo de fermentación, al sobrenadante se le llamó extracto crudo y se le determinó actividad enzimática por medio del método de Nelson-Somogyi (1944) y concentración de proteína por medio de Lowry (1951).

El extracto crudo se concentró por medio de ultrafiltración con membranas de corte de 30 kDa y por precipitación con acetona, a este concentrado se le llamó extracto enzimático, al cual se le determinó actividad enzimática y proteína por los métodos de Nelson-Somogyi y Lowry respectivamente.

Con el extracto enzimático se llevó a cabo el análisis electroforético en un sistema no desnaturante de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* crecida en glucosa, 2-desoxiglucosa y Tween-80, para esto se utilizaron geles de poliacrilamida, debido a las ventajas que presentan, por ejemplo: son termoestables, transparentes, durables, relativamente inertes químicamente. Después se llevó a cabo esta técnica en un sistema desnaturante con el fin de poder saber si la enzima está formada por una o varias subunidades.

Una vez determinado el patrón electroforético en los diferentes sistemas se determinó la actividad enzimática en geles de electroforesis utilizando ácido poligalacturónico como sustrato.

Para finalizar con la caracterización y poder llevar a cabo una comparación de la endo-poligalacturonasa excretada en los diferentes medios de cultivo, se determinó el peso molecular de la enzima en los sistemas tanto desnaturante como no desnaturante.

6 METODOLOGÍA

6.1 PRODUCCIÓN DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA

6.1.1. MICROORGANISMO

Este estudio se llevó a cabo utilizando la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 que proviene del cepario del Departamento de Bioingeniería y Biotecnología del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, México.

6.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

Composición de los medios de cultivo utilizados para la producción de la endopoligalacturonasa:

6.1.2.1 Medio con glucosa (control):

- 0.1% Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- 0.05% Sulfato de magnesio (MgSO_4)
- 0.05% fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)
- 1.0% Glucosa
- 0.67% Base libre de nitrógeno para levaduras (YNB)

6.1.2.2 Medio con 2-desoxiglucosa:

- 0.1% Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- 0.05% Sulfato de magnesio (MgSO_4)
- 0.05% fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)
- 0.8% Glucosa
- 0.2% 2-desoxiglucosa
- 0.67% Base libre de nitrógeno para levaduras (YNB)

6.1.2.3 Medio con Tween-80

Este medio se preparó igual que 6.1.2.1, pero adicionándole 0.1% de Tween-80.

Una vez adicionados todos los componentes de cada medio, se esterilizaron a 121°C (15 lb/pg²), durante 15 minutos.

La base libre de nitrógeno para levaduras, se usó con la finalidad de asegurar que el único compuesto nitrogenado que se encontraba en el medio además del sulfato de amonio, era el correspondiente a las proteínas producidas por *Kluyveromyces marxianus*.

6.1.3. CONDICIONES DE CULTIVO

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL, tapados con algodón, se incubaron a 30°C, con una agitación de 200 r.p.m. en un agitador con incubadora ambiental New Brunswick modelo G 24.

Al cabo de 48 horas se separó la biomasa mediante centrifugación a 3,500 r.p.m. durante 30 min. a 4°C en una centrifuga refrigerada Beckman J2-M1, y el sobrenadante se utilizó como extracto enzimático crudo.

6.2 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ENDO-POLIGALACTURONASA

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo midiendo el aumento de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi (1944), debido a la acción de la endo-poligalacturonasa en una disolución de ácido poligalacturónico. Para la elaboración de los reactivos ver apéndice I. La determinación se llevó a cabo de la siguiente manera:

A 9.9 mL de disolución de ácido poligalacturónico 0.1% (preparado en una

disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0), que se utilizó como sustrato, se le adicionó 0.1 mL de disolución de enzima, esto se incubó a 30°C, tomándose alícuotas de 1 mL a los minutos 1, 5, 10 y 15, considerando estos tiempos como el transcurrido desde el momento en que la enzima entra en contacto con el ácido poligalacturónico hasta que se mezcla con el reactivo I de Nelson-Somogyi, contenido en la serie de tubos, con lo cual se detiene la reacción, y se procede según la técnica de Nelson-Somogyi.

6.2.1 Técnica para la determinación de reductores (Nelson-Somogyi, 1944)

En un tubo de ensaye se colocó 1 mL de muestra más 1 mL de reactivo I. Se Incubó 20 min. en baño de agua hirviendo, se enfrió, se agregó 1 mL de reactivo II, se agitó vigorosamente, se agregó 17 mL de agua destilada, se agitó y leyó en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a 520 nm.

6.2.2 Curva patrón

Los datos obtenidos se correlacionaron en una curva patrón de ácido galacturónico de concentración de 0-400µg/mL en agua, y se leyó a 520 nm. Posteriormente se determinaron las unidades de actividad de endo-poligalacturonasa (UPg) considerándose como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcar reductor por minuto a 30°C y pH 5.0.

6.3. DETERMINACION DE PROTEINA

El método de Lowry, (1951) se basa en la formación del complejo cobre-proteína en condiciones alcalinas, seguida de una reacción óxido-reducción con el reactivo de Folin. Para la elaboración de los reactivos ver apéndice II.

6.4. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Se realizó en dos etapas:

6.4.1 Se concentró el extracto enzimático crudo por medio de un ultrafiltro Minitan (Millipore model no 7523-20), utilizando membranas de corte de 30 kDa., con una presión constante de 20 psi.

6.4.2 Al concentrado anterior se le agregó 44% v/v de acetona fría en baño de hielo, para la precipitación de la proteína, posteriormente se centrifugó a 10,000 r.p.m. 30 min. a 4°C, el sedimento obtenido se resuspendió en una disolución amortiguadora de acetatos, y se dializó contra una disolución amortiguadora de acetatos 0.1M, pH 5, durante 24 hr a 4°C, obteniéndose el concentrado enzimático.

6.5 ANALISIS ELECTROFORETICO DE ENDO-POLIGALACTURONASA

Una vez obtenido los concentrados enzimáticos de cada uno de los medios, se llevó a cabo la caracterización electroforética de éstos, para determinar la diferencia existente entre los medios.

6.5.1 ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE

Las muestras de endo-poligalacturonasa previamente concentradas, se sometieron a la técnica de electroforesis no desnaturizante. Para la elaboración de los reactivos ver apéndice III.

6.5.1.2 Preparación de los geles**a) GEL DE SEPARACIÓN**

Se prepararon 10 mL de gel de separación utilizando una T= 7.5% como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Preparación del gel de separación con T= 7.5%

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua desionizada	4.85 mL
Disolución amortiguadora pH 8.8	2.5 mL
Acrilamida/bis	2.5 mL
Persulfato de amonio 10%	50 μ L
N, N, N', N'-Tetrametilendiamina (TEMED)	5 μ L

Esta mezcla se dejó durante 15 minutos utilizando vacío, transcurrido este tiempo se adicionó persulfato de amonio (10%) y TEMED. Se colocó inmediatamente esta mezcla entre las placas de vidrio previamente montadas. Después de transcurrido unos minutos se le adicionó gotas de agua para evitar la resequedad de los geles. Se dejaron reposar durante una hora para asegurar la gelificación total.

b) GEL DE CONCENTRACION

Se prepararon 5 mL de gel de concentración con una T= 3%, utilizando las proporciones indicadas en la tabla 3.

Tabla 3 Preparación del gel de concentración con T= 3%.

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua desionizada	3.22 mL
Disolución amortiguadora pH 6.8	1.25 mL
Acrilamida/bis	0.5 mL
Persulfato de amonio 10%	25 μ L
N, N, N', N'-Tetrametilendiamina TEMED	5 μ L

La disolución se dejó durante 15 minutos utilizando vacío, transcurrido este tiempo se adicionó persulfato de amonio (10%) y TEMED. Se eliminó el agua de los geles anteriores e inmediatamente se colocó esta mezcla en las placas de vidrio, acto seguido, se colocaron los peines para marcar los carriles, en los cuales se inyectan las muestras.

6.5.1.3 Preparación de las muestras

La preparación de las muestras (Tween-80, Glucosa y 2-desoxiglucosa) para la corrida de los geles de electroforesis se realizó de la siguiente manera: Se mezclaron 10 μ L de colorante y 15 μ L de muestra.

Finalmente, se tomaron 20 μ L de cada una de las muestras para ser inyectados en los geles.

6.5.1.4 Condiciones de electroforesis

Se montó el equipo de electroforesis, el cual consta de una cámara de electroforesis (BIO-RAD Mini-PROTEAN II Cell). Los geles se prepararon entre dos placas de vidrio cuyas dimensiones fueron de 72 x 101 mm, utilizando separadores de 0.75 mm y un peine del mismo espesor. Para el corrimiento electroforético se utilizó una fuente de poder (BIO-RAD Power Pak 300), con las condiciones óptimas para la corrida (200 V).

Una vez colocados los geles e inyectadas las muestras se dejó correr durante 55 min. tiempo aproximado para que el colorante azul de bromofenol alcanzara la parte final del gel. Una vez transcurrido el tiempo los geles se tiñeron con azul de Coomasie por 30-40 min., finalizado ese tiempo se colocaron en una disolución desteñidora, con recambios necesarios de esta disolución, de forma que se pudieran ver con claridad a las proteínas en estudio.

6.5.1.5.Tinción de los geles

La tinción de los geles se llevó a cabo con Sypro de la siguiente manera: Una vez terminado el corrimiento electroforético el gel se colocó en una disolución de ácido acético al 7.5% durante 30 minutos, con el fin de fijar la proteína al gel, así como eliminar el colorante del frente de corrimiento, azul de bromofenol, transcurrido el tiempo el gel se colocó en una disolución de SDS al 0.05% en ácido acético al 7.5%, con agitación por 30 minutos; finalmente se colocó el gel en una disolución de Sypro (5 µL de sypro en 25 mL de ácido acético al 7.5%) durante 30 minutos.

6.5.2 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE

Con las muestras obtenidas en 6.4.2, se llevó a cabo electroforesis desnaturizante, para poder determinar si la endo-poligalacturonasa está formada por una o varias subunidades.

Para llevar a cabo esta técnica, se utilizaron los mismos reactivos que en electroforesis no desnaturizante (apéndice III), además de:

6.5.2.1 Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%. Se disolvió 1g de SDS en 10mL de agua desionizada.

6.5.2.2 Disolución amortiguador 5X, pH 8.3 (para corrida):. Se disolvieron 9.0g de base-tris, 43.2g de glicina y 3g de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio), y se adicionaron a 600 mL de agua desionizada. Se diluyeron 60 mL de Amortiguador 5X con 240 mL de agua desionizada, para una corrida electroforética.

6.5.2.3 Colorante para corrida de muestras. Se mezclaron 3.8 mL de agua desionizada, 1.0 mL de Tris-HCl pH 6.8, 0.8 mL de glicerol, 0.4 mL de 2-mercaptoetanol y 0.4 mL de azul de bromofenol (1%).

6.5.2.4 Preparación de los geles

La electroforesis desnaturizante se llevó a cabo con una T= 7.5%, preparándose los geles de separación y concentración, con las mismas proporciones que en 6.5.1.2, además de adicionar 100 μ L de SDS 10%, tanto al gel de separación como al gel de concentración.

6.5.2.5 Preparación de muestras

Las muestras se prepararon del mismo modo que en 6.5.1.11, además de que se adicionó 0.75 μ L de 2-mercaptoetanol a cada muestra. Posteriormente las muestras se calentaron a ebullición por cinco minutos, una vez enfriadas, se tomaron 20 μ L de cada una de las muestras y se inyectaron en los carriles de los geles.

6.5.2.6 Condiciones de electroforesis

Las condiciones de electroforesis fueron las mismas que en 6.5.1.4.

6.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE ENDO-POLIGALACTURONASA EN GELES DE ELECTROFORESIS

Para la determinación de la actividad de las endo-poligalacturonasas, excretadas en los diferentes medios, se utilizó la técnica de Ried y Collmer (1985 y 1986), con algunas modificaciones (apéndice V). Los geles fueron preparados como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación del gel de separación con T= 7.5%

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua desionizada	4.85mL
Disolución amortiguadora pH 8.8	2.5 mL
Acilamida/bis	2.5 mL
Persulfato de amonio 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L
Acido poligalacturónico	0.1%

Esta disolución se dejó durante 15 minutos utilizando vacío. Antes de adicionar el persulfato de amonio y el TEMED para llevar a cabo la gelificación, se adicionó el ácido poligalacturónico, el cual se homogeneizó perfectamente. Se siguió la técnica como en el punto 6.5.1.2, tanto para el gel de separación como para el gel de concentración.

La preparación de las muestras se realizó siguiendo 6.5.1.3, así como las condiciones de electroforesis 6.5.1.4.

6.6.1 Reacción enzimática

Una vez terminado el corrimiento electroforético, el gel de substrato fue lavado durante una hora con amortiguador 5X, pH 8.3 (para corrida), con tres cambios, ya que así se elimina el exceso de azul de bromofenol, SDS y 2-mercaptoetanol que pudiera interferir en la actividad. Después se colocó en una disolución amortiguadora de acetatos 50mM-10mM EDTA, y se incubó a 37 °C. Se llevaron a cabo incubaciones a diferentes tiempos (10 min, 20 min, 4hr, 8hr, 10hr, 12hr.).

6.6.2. Tinción de los geles de actividad

Terminado el tiempo de incubación, el gel de substrato se sumergió en una disolución de rojo rutenio 0.02%, durante una hora. Transcurrido el tiempo, el exceso de colorante se eliminó con agua destilada. Las zonas sin teñir indican la posición de las bandas con actividad enzimática.

6.7 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR

El peso molecular de la endo-poligalacturonasa, se determinó tanto por electroforesis no desnaturizante como por electroforesis desnaturizante

6.7.1 Determinación de peso molecular en técnica de electroforesis no desnaturizante.

Para la determinación del peso molecular de las diferentes muestras, se llevó a cabo electroforesis no desnaturizante, del mismo modo que en 6.5.1.

Se realizaron geles de poliacrilamida a diferentes T de concentración (5, 6.5, 7.5 y 10%, con el objetivo de controlar el tamaño del poro, ya que al ir aumentando el %T, el tamaño del poro va disminuyendo, de esta manera puede observarse la diferencia de migración de las distintas muestras).

Para la identificación del peso molecular de las muestras problema, se corrieron patrones de peso molecular conocido a una concentración de 1mg/mL, como se muestra en la tabla 5, los cuales fueron preparados de la siguiente manera:

- Para β -galactosidasa de *E. coli* y β -lactoglobulina se hizo una proporción (1:1) muestra-colorante (azul de bromofenol).

- Para Seroalbúmina, se adicionó 10 μ L de disolución amortiguadora pH 6.8+5 μ L de muestra+5 μ L de colorante (azul de bromofenol).

Tabla 5. Patrones empleados con un intervalo de peso molecular de 36000-116000 Da.

Patrones	Peso Molecular (Da)
β - Lactoglobulina	36 000
Seroalbúmina	66 200
β - galactosidasa (<i>E. coli</i>)	116 000

Se obtuvo el Rf de estos patrones así como el de cada una de las muestras problemas, en cada uno de los geles realizados con las diferentes T elaboradas. Esto se obtuvo dividiendo la distancia de migración, desde la parte superior del gel hasta el centro de la banda de proteína, entre la distancia que recorre el frente de color (azul de bromofenol).

$$Rf = \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{distancia de migración del frente de color}} \quad (\text{Ec. 6.7.1.1.})$$

Con los datos obtenidos se graficó %T (5, 6.5, 7.5 y 10) vs 100[log (Rf x100)], obteniendo una pendiente correspondiente para cada uno de los patrones, así como para las muestras problemas.

Se tomaron las pendientes obtenidas para cada uno de los patrones y se graficó contra su peso molecular conocido. Las pendientes de las muestras problema, se interpolaron, obteniéndose de esta manera sus respectivos pesos moleculares (ver apéndice IV).

6.7.2 Determinación de peso molecular por medio de electroforesis desnaturalizante.

Para la determinación del peso molecular de las diferentes muestras estudiadas, se llevó a cabo electroforesis desnaturalizante como en 6.5.2.

Para la identificación del peso molecular de las muestras problema se corrió un patrón de peso molecular conocido, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Patrón de proteína de peso molecular conocido con un intervalo de peso molecular de 6 500-200 000 Da.

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (Da)
Miosina	200 000
β -galactosidasa	160 000
Fosforilasa b	97 400
Seroalbúmina	66 200
Ovoalbúmina	45 000
Anhidrasa carbónica	31 000
Inhibidor de tripsina	21 500
Lizosima	14 400
Aprotinina	6 500

Se realizó un gel de poliacrilamida a una T= 7.5%, debido a que a esta concentración se logró ver mejor la distribución de las bandas de las muestras problema.

Se obtuvo el R_f dividiendo la distancia de migración, desde la parte superior del gel hasta el centro de la banda de la muestra, entre la distancia que recorre el frente de color (azul de bromofenol), de las muestras problema y del estándar.

Con los datos obtenidos del estándar se graficó $100[\log(R_f \times 100)]$ vs Peso molecular conocido, después se interpoló el R_f de las muestras patrón, obteniéndose de esta manera el peso molecular de cada una de las bandas de proteína.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA Y TWEEN-80 EN LA PRODUCCIÓN DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA.

Se realizaron fermentaciones en medio de cultivo en presencia de la 2-desoxiglucosa (0.2%) y Tween-80 (0.1%) con la cepa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, para observar el efecto que tienen éstos en la excreción de la endo-poligalacturonasa. Se utilizaron los medios de cultivo descritos en la metodología 6.1.2.

Los resultados de actividad enzimática y proteína en los extractos crudos se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Comparación de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios.

MEDIO DE CULTIVO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (UPg/mL)	PROTEÍNA (µg/mL)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UPg/mg prot.)
GLUCOSA	0.8565	103.52	8.27
2-DESOXIGLUCOSA	1.1206	176.25	6.35
TWEEN-80	0.8756	143.05	6.12

Con respecto a la cantidad de proteína, se observó un incremento en ambos medios (2-desoxiglucosa y Tween-80), (gráfica 1), respecto al medio control, teniéndose una mayor cantidad de proteína en el medio con 2-desoxiglucosa.

El aumento de proteína en presencia de esta desoxiazúcar podría indicar una alteración en la pared celular asociada al cambio de morfología de la levadura reportado por Cruz-Guerrero et al. (1997), lo cual, posiblemente permite una mejor excreción de la endo-poligalacturonasa.

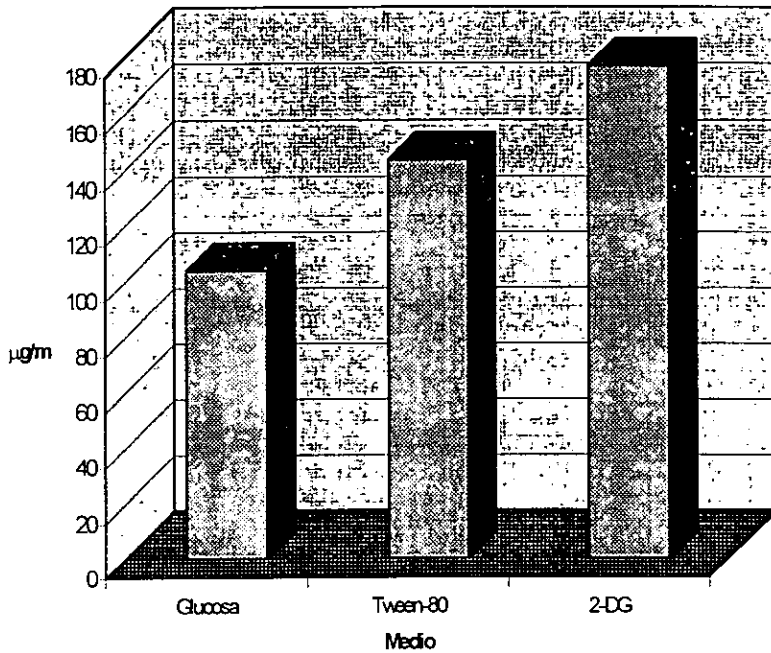
Así mismo en presencia de Tween-80, el aumento de proteína fue evidente, esto puede deberse a que estos surfactantes actúan sobre la membrana celular incrementando la

permeabilidad de la pared celular de la levadura liberándose así una mayor cantidad de proteína, como mencionan Resse y Maguire (1968) y Lestan et al. (1994).

Respecto a la actividad enzimática se observa que efectivamente, la concentración utilizada de 2-desoxiglucosa, aumenta la producción de endo-poligalacturonasa, con respecto al medio control con glucosa, ya que se obtuvo una mejor actividad enzimática, (gráfica 2), coincidiendo con lo reportado por Cruz-Guerrero (1995), sin embargo se ve una disminución significativa en la actividad específica lo que podría significar un cambio en la conformación de la enzima. Dado que la actividad específica disminuye, podría decirse que probablemente hubo excreción de otras proteínas, sin embargo como se verá posteriormente en los patrones electroforéticos se comprobó que no se excreta otra proteína, lo que necesariamente implica que la enzima excretada es menos activa.

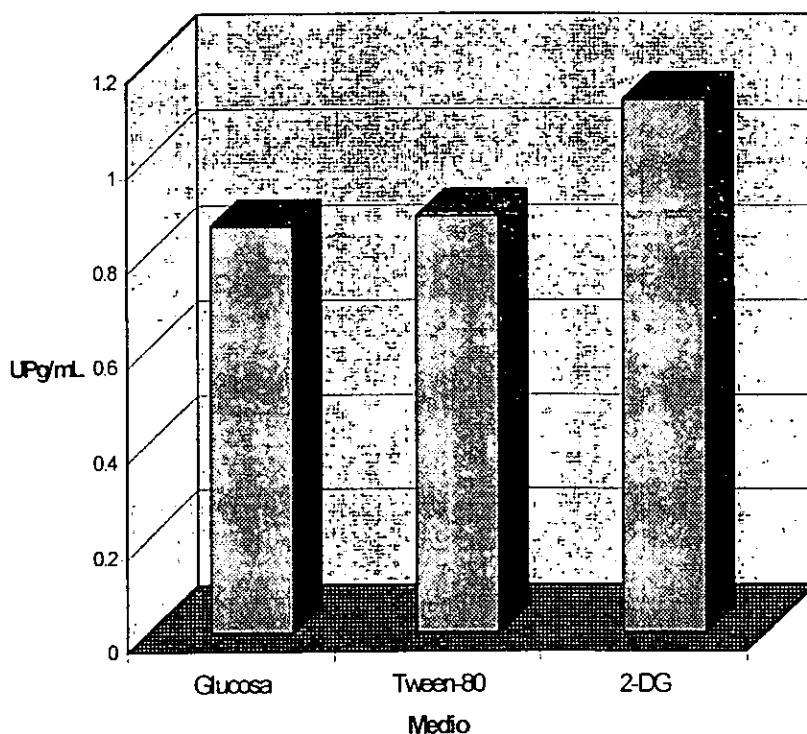
En cuanto a la actividad en presencia de Tween-80, no se observó un aumento significativo en la actividad enzimática, pero dado que hubo un incremento en la cantidad de proteína excretada y por lo tanto una disminución de actividad específica, con respecto al control se consideró importante seguir con la caracterización electroforética.

En la gráfica 1, se hace una comparación de la proteína obtenida en los diferentes medios, observándose una mayor producción en el medio con 2-desoxiglucosa.

Gráfica 1. Comparación de proteína excretada por *Kluyveromyces marxianus*.

En la gráfica 2. se hace una comparación de la actividad enzimática de la endopoligalacturonasa entre los diferentes medios, observándose que en medio con 2-desoxiglucosa, ésta fue mayor.

Gráfica 2. Comparación de la actividad enzimática de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus*.



Posteriormente se llevó a cabo la concentración de la enzima por medio de ultrafiltración con membrana de corte de 30 kDa y precipitación con acetona, seguido de una diálisis, con esto se obtuvo la enzima concentrada en los diferentes medios con el objeto de tener la concentración adecuada para la electroforesis. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 8

Tabla 8. Comparación de los concentrados obtenidos por ultrafiltración de la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* en los diferentes medios

MEDIO DE CULTIVO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (UPg/mL)	PROTEÍNA (µg/mL)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UPg/mg prot.)
GLUCOSA	2.701	150.43	17.98
TWEEN-80	3.824	209.69	18.23
2-DESOXIGLUCOSA	6.342	509.05	12.63

El aumento de actividad específica podría explicarse en parte, a la pérdida de péptidos de bajo peso molecular que se detectaron en el permeado, en el cual no se detectó actividad enzimática. Con los concentrados obtenidos se llevó a cabo el análisis electroforético.

7.2 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA

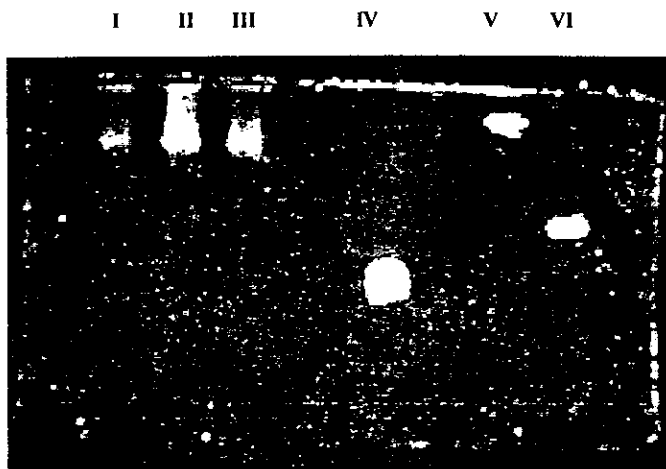
7.2.1 ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE.

Para poder evaluar si existía alguna diferencia de la endo-poligalacturonasa (endo-PG) producida en los diferentes medios de cultivo, se realizaron diferentes ensayos para lograr obtener la mejor resolución, de manera que se pudiera hacer una buena comparación entre las enzimas excretadas, hasta llegar a una proporción en los geles de acrilamida-bisacrilamida de T=7.5%, la cual fue la mas adecuada para tal fin (en donde % T es el contenido de acrilamida y bisacrilamida).

En la figura 1 Se puede observar que existe una banda definida para la endo-poligalacturonasa producida en medio con 2-desoxiglucosa al mismo nivel que la excretada en el medio control (glucosa) coincidiendo con lo reportado por Montero-Andrade (1997).

Por otro lado, se observó que para el concentrado enzimático de Tween-80, hay un pequeño barrido, es decir se tienen otras bandas con diferente peso molecular, las cuales están tan unidas que solo se logra ver una banda ancha, por esta razón da un patrón electroforético diferente al de la endo-PG producida en medio con glucosa y 2-DG. A pesar de que la banda mayoritaria en este medio está al mismo nivel de las otras dos bandas, con solo este análisis electroforético no se puede afirmar que ésta sea similar y además actúe de la misma manera que la del medio control, pues al momento de su excreción ésta pudo haber cambiado en su estructura.

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios de cultivo. (no desnaturalizante T=7.5%).



En los carriles I a III se muestra la endo-poligalacturonasa en los diferentes medios y en los carriles IV a VI se presentan los patrones de peso molecular conocido:

I 2-DG, II Tween-80, III Glucosa, IV β -lactoglobulina, V β -galactosidasa, VI Seroalbúmina

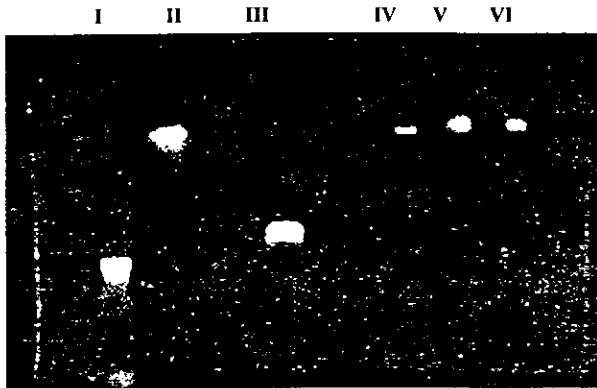
7.2.2. OBTENCIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA EXCRETADA POR *Kluyveromyces marxianus* EN LOS DIFERENTES MEDIOS POR ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE.

Los geles de poliacrilamida utilizados para la obtención del peso molecular se prepararon a diferentes "T" de concentración (5, 6.5, 7.5 y 10 %), según la metodología 6.5.1. (figuras 2-5.), con el fin de poder observar la diferencia en el corrimiento electroforético tanto de las muestras como de los patrones, de manera que se pudiera realizar un análisis de regresión para la obtención de éstos.

Se obtuvieron los Rf de los patrones de β -lactoglobulina, Seroalbúmina y β -galactosidasa de *E. coli*, midiendo la migración de cada patrón y cada una de las muestras problema, como se muestra en la figura 6, para cada uno de los geles de poliacrilamida con sus distintas T de concentración.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

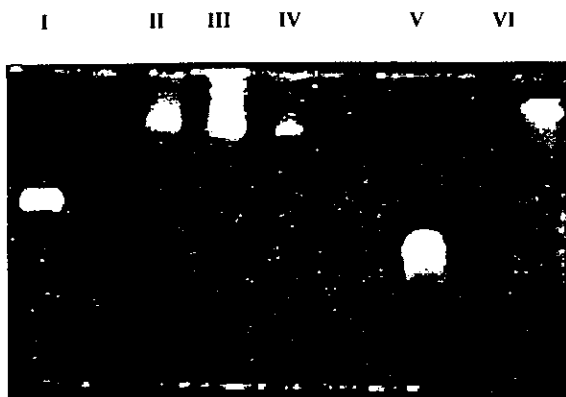
Figura 2 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios de cultivo. (no desnaturalizante T=5.0 %).



En los carriles I a III se muestran los patrones de peso molecular conocido y en los carriles III a VI se tiene la endo-poligalacturonasa en los diferentes medios:

I β -lactoglobulina, II β -galactosidasa, III Seroalbúmina, IV 2-DG, V Tween-80, VI Glucosa

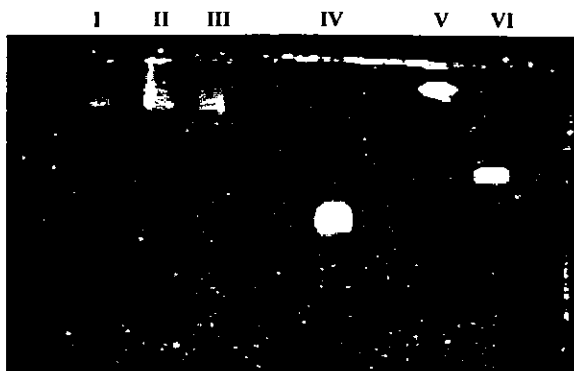
Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios de cultivo. (no desnaturalizante T=6.5 %).



En los carriles II a IV se muestra la endo-poligalacturonasa en los diferentes medios y en los carriles I, V y VI se tienen los patrones de peso molecular conocido.

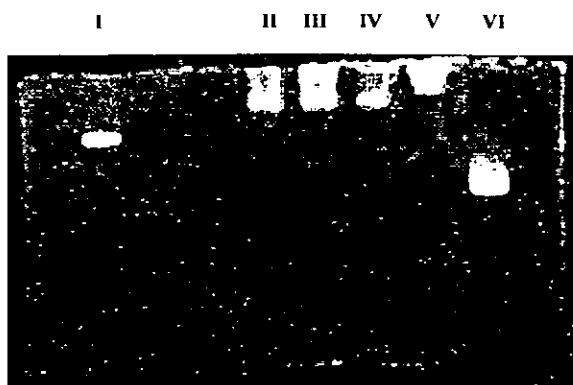
Carril: I Seroalbúmina, II Glucosa, III Tween-80, IV 2-DG, V β -lactoglobulina, VI β -galactosidasa.

Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios de cultivo. (no desnaturalizante T=7.5 %).



En los carriles I a III se presenta la endo-poligalacturonasa en los diferentes medios y en los carriles IV a VI se muestran los estándares de peso molecular conocido: I 2-DG, II Tween-80, III Glucosa, IV β -lactoglobulina, V β -galactosidasa, VI Seroalbúmina

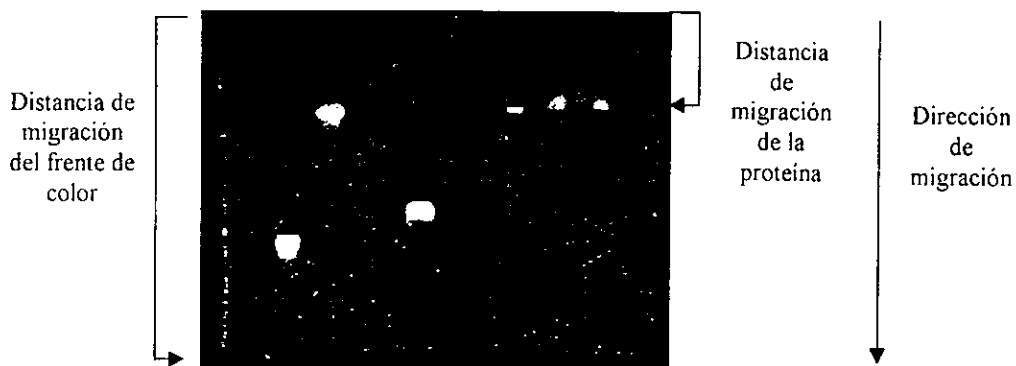
Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios de cultivo. (no desnaturalizante T=10 %).



En los carriles II a IV se muestra la endo-poligalacturonasa en los diferentes medios y en los carriles I, V y VI, se muestran los estándares de peso molecular conocido:

I Seroalbúmina, II Glucosa, III 2-DG, IV Tween-80, V β -galactosidasa, VI β -lactoglobulina

Figura 6. Obtención del Rf de muestras y patrones.



Siguiendo la ecuación 6.7.1.1. de la metodología se obtuvieron los datos de Rf tanto para los patrones como para las muestras, los cuales se transformaron a logaritmos, estos datos se utilizaron para llevar a cabo el análisis de regresión lineal. Los resultados se muestran en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Patrones de peso molecular conocido a diferentes "T"

	β -lactoglobulina	Seroalbúmina	β -galactosidasa de Escherichia coli
(%T)	$100[\log(Rf \times 100)]$	$100[\log(Rf \times 100)]$	$100 [\log(Rf \times 100)]$
5.0	186.908	175.857	139.973
6.5	178.506	163.431	113.779
7.5	172.906	155.147	96.315
10.0	158.903	134.438	52.657
*	r=0.98 m=5.6 b=214.913	r=0.98 m=8.28 b=217.276	r=0.98 m=17.46 b=227.289

* Datos obtenidos del ajuste del análisis de regresión lineal de los diferentes estándares

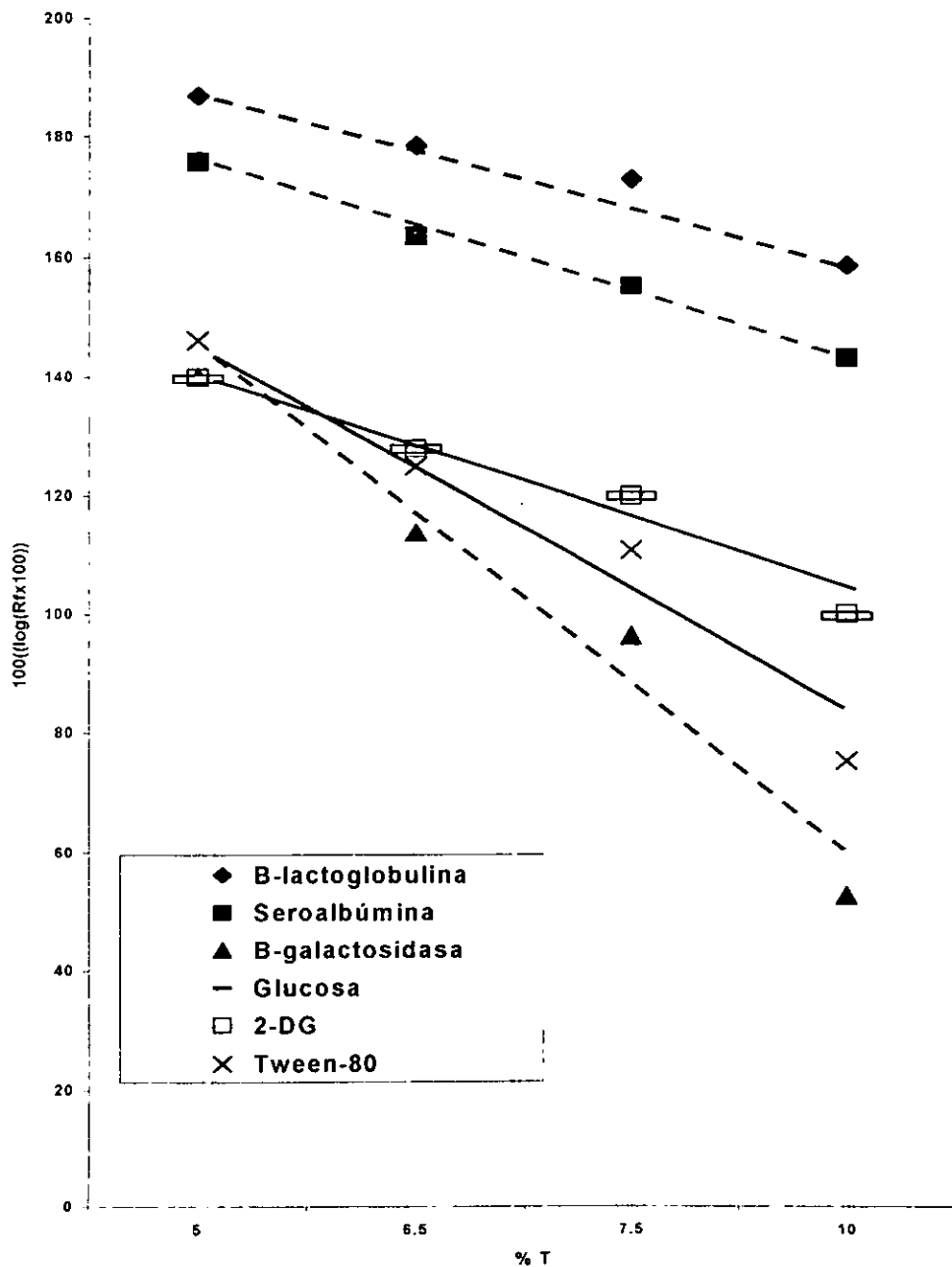
Tabla 10. Endo-poligalacturonasa producida en diferentes medios.

	2-desoxiglucosa	Glucosa	Tween-80
(%T)	100 [log(Rf x 100)]	100 [log(RF x 100)]	100 [log(Rf x 100)]
5.0	139.859	139.581	146.112
6.5	127.838	127.774	124.934
7.5	119.903	119.824	110.815
10.0	100.225	99.789	75.518
*	r=0.999 m=7.922 b=179.39	r=0.999 m=7.963 b=179.479	r=0.98 m=14.11 b=216.707

* Datos obtenidos del ajuste del análisis de regresión lineal de las diferentes muestras

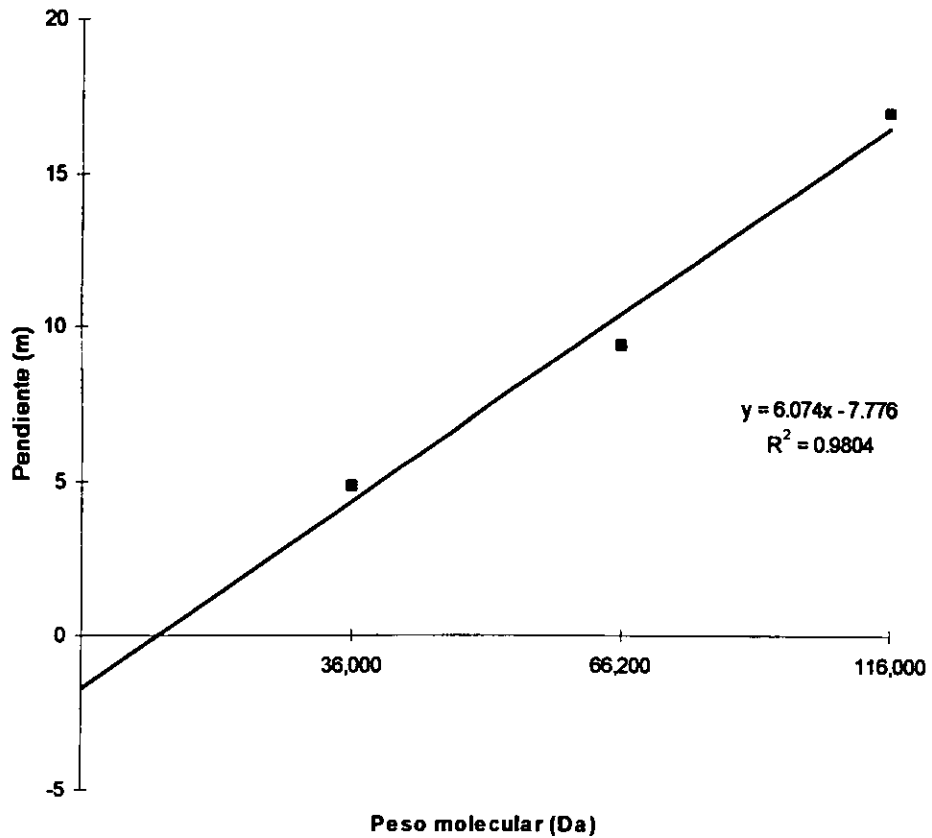
Con estos datos se obtuvo la pendiente para cada uno de los patrones así como de las muestras, los cuales se graficaron contra las diferentes "T" de concentración como se muestra en la gráfica 3.

Gráfica 3. Gráfica de los diferentes estándares y enzimas para determinar el peso molecular.



Una vez obtenidas las pendientes de los patrones, se graficaron vs pesos moleculares de cada uno de estos, como se muestra en la gráfica 4.

Gráfica 4. Gráfica del modelo estimado para la determinación del peso molecular en condiciones no desnaturalizantes.



Con la gráfica obtenida, se interpolaron las pendientes de cada una de las muestras problemas, obteniendo de esta manera sus pesos moleculares, tabla 11.

Tabla 11. Pesos moleculares de la Endo-poligalacturonasa excretada en los distintos medios.

MEDIO DE CULTIVO	PESO MOLECULAR (Da)
Glucosa	56,823
Tween-80	94,723
2-DG	56,560

En la tabla 11., se tienen los pesos moleculares para la endo-poligalacturonasa excretada en los diferentes medios, Glucosa, 2-DG y Tween-80, observando que para éste último, el peso molecular fue mucho mayor. En el análisis electroforético figura 2, se observó que en el carril II, la banda de la Endo-poligalacturonasa en presencia del surfactante está muy ancha, habiendo concordancia con su peso molecular el cual es relativamente grande con respecto al control. Este aumento de peso podría deberse a que el Tween-80, alteró de alguna manera la permeabilidad de la membrana de *K. marxianus*, de modo que al momento de su excreción alteró la estructura de la enzima incrementando su tamaño. Esto concuerda con el hecho de que se excretó más proteína en este medio, sin que se detectara un aumento en la actividad enzimática.

Por otro lado el peso molecular tanto en 2-DG como en glucosa tienen un peso molecular cercano al reportado por Lim et al. (1980) y Frances et al. (1990), el cual es de 50 kDa y 49.6 kDa respectivamente. Schwan et al. (1997), reportaron que las cuatro endo-poligalacturonasas que obtuvieron tienen un peso molecular en un intervalo de 45-36 kDa. Tal vez estas diferencias encontradas en los distintos pesos moleculares se deban a las técnicas utilizadas para su determinación (Frances et al. 1990).

7.2.3. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE.

Se evaluó la diferencia de la endo-poligalacturonasa (endo-PG) en los diferentes medios de cultivo, utilizando una proporción en los geles de acrilamida-bisacrilamida de T=7.5%, se utilizó ésta misma para poder correlacionar ambos métodos (electroforesis no desnaturalizante y electroforesis desnaturalizante).

En la figura 7, se observa un patrón electroforético diferente para cada una de las enzimas excretadas en los diferentes medios, ya que para el medio con Tween-80, se tienen cinco subunidades, para el medio control se tienen cuatro subunidades y para el medio con 2-desoxiglucosa solo dos subunidades. Sin embargo se observa un patrón electroforético similar para las subunidades producidas en medio con glucosa y Tween-80, en cuanto a las de mayor concentración, observándose un peso molecular similar, difiriendo así con el medio de 2-desoxiglucosa, que sólo presenta una banda bien definida, con respecto al medio control.

En cuanto a las bandas de menor concentración, en el medio con 2-desoxiglucosa se observa que hay una banda con un peso similar al de las bandas del medio control y del medio con Tween-80, así mismo para el medio control se observan dos bandas a un mismo nivel que dos de las tres bandas para el medio con Tween-80.

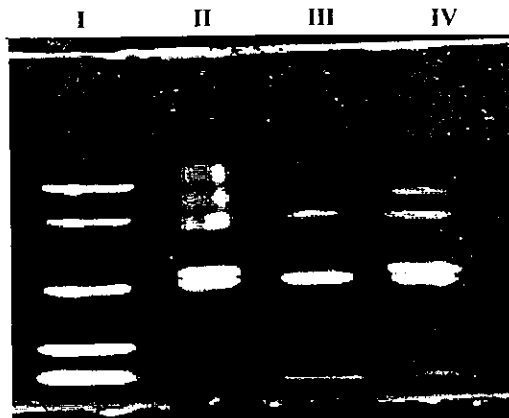
La diferencia observada en las subunidades con 2-desoxiglucosa, con respecto al medio control es porque quizá ocurrió una manipulación tal, que se alteró la membrana celular o la composición de la pared, modificándose así el mecanismo de excreción, alterando de alguna manera a la enzima excretada.

En el caso de Tween-80, la diferencia con respecto al medio con glucosa, se pudo deber a que este surfactante interactuó con la membrana celular, modificándose la permea-

bilidad de la membrana o quizá su mecanismo de excreción de esta manera al momento de excretar a la enzima, ésta sufrió alteraciones.

Para poder decir con exactitud cual de las subunidades de cada uno de los medio es en realidad endo-poligalacturonasa, fue necesario determinar actividad en geles de poliacrilamida.

Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios de cultivo (desnaturalizante T=7.5%)

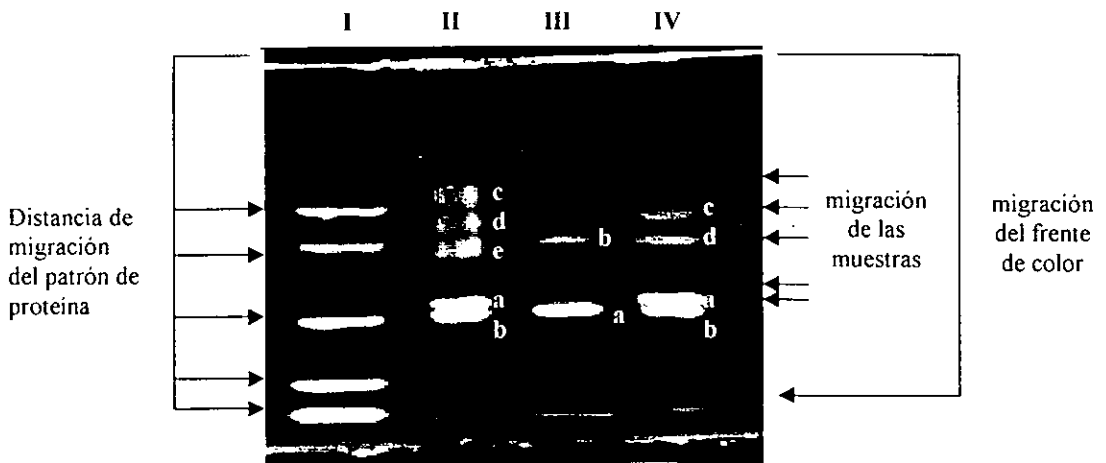


En los carriles II a IV se muestran las bandas de proteína de la preparación de enzima de la endo-poligalacturonasa obtenidas en diferentes medios de cultivo: II Tween-80, III 2-DG, IV Glucosa. En el carril I se muestra los patrones de peso molecular conocido.

7.2.4. OBTENCIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA EXCRETADA POR *Kluyveromyces marxianus* EN LOS DIFERENTES MEDIOS POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE.

Se utilizó gel de poliacrilamida con T = 7.5%, preparados según la metodología 6.5.1. Se obtuvo el Rf del patrón de peso molecular conocido, así como el de las diferentes muestras, como se muestra en la figura 8.

Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras y patrón.



En los carriles II a IV se muestran las bandas de proteína de la preparación de enzima de la endo-poligalacturonasa obtenidas en diferentes medios de cultivo:

II Tween-80, III 2-DG, IV Glucosa. En el carril I se muestra los patrones de peso molecular conocido.

Siguiendo la ecuación 6.7.1.1., se obtuvieron los datos de Rf que se muestran en las tablas 12. y 13., para el estándar y las muestras respectivamente.

Tabla 12. Patrones de peso molecular conocido

Nombre de proteína	Peso Molecular (Da)	100[log(Rf x 100)]
Fosforilasa b	97400	161.278
Seroalbúmina	66200	172.427
Ovoalbúmina	45000	185.733
Anhidrasa carbónica	31000	195.424
Inhibidor de tripsina	21500	199.563

Tabla 13. Determinación de peso molecular de las bandas de endopoligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios (desnaturalizante T=7.5%)

MEDIO DE CULTIVO	*100[log(Rf x 100)]	**100[log(Rf x 100)]
GLUCOSA	a) 183.250	c) 165.32
	b) 185.125	d) 171.60
2-DESOXIGLUCOSA	a) 185.125	b) 171.60
TWEEN-80	a) 183.250	c) 155.63
	b) 185.125	d) 165.32
		e) 171.60

*Rf de las bandas de mayor concentración

** Rf de las bandas de menor concentración

Con los datos obtenidos para el patrón se obtuvo la curva de calibración 7.2.4.1., en la cual se interpolaron los Rf obtenidos para cada muestra, de esta manera se obtuvieron los pesos moleculares que se muestran en la tabla 14.

Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de peso molecular:

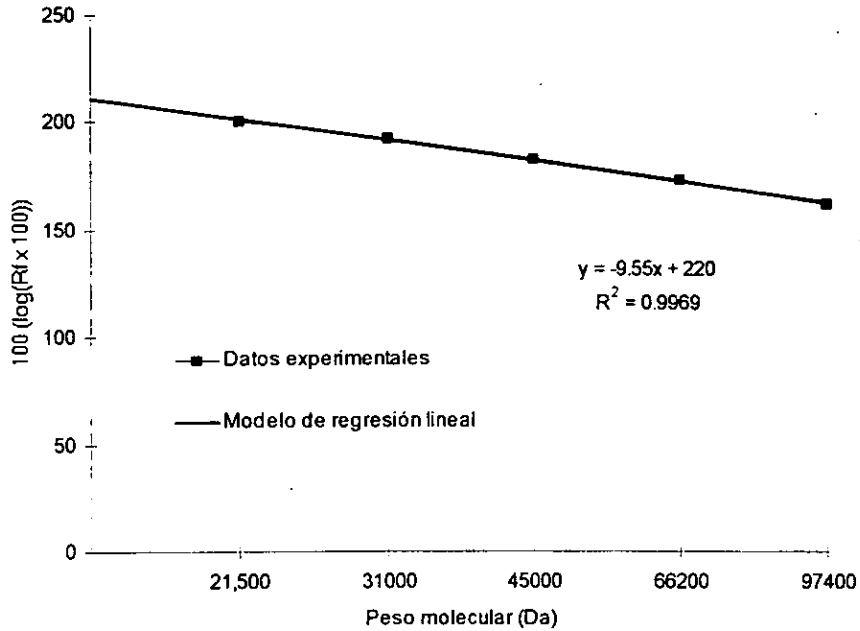


Tabla 14. Pesos moleculares de la endo-poligalacturonasa excretada en los diferentes medios.

MEDIO DE CULTIVO	* PESO MOLECULAR (Da)	** PESO MOLECULAR (Da)
GLUCOSA	a) 51 519	c) 85 886
	b) 47 925	d) 73 850
2-DESOXIGLUCOSA	a) 47 925	b) 73850
TWEEN-80	a) 51 519	c) 104 461
	b) 47 925	d) 85 886
		e) 73850

* Peso molecular de las bandas de mayor concentración

** Peso molecular de las bandas de menor concentración

En la tabla 14, se tienen los pesos moleculares para endo-poligalacturonasa excretada en cada medio. En medio con 2-desoxiglucosa, como se puede observar en la figura 7, se tiene una sola subunidad de concentración elevada, cuyo peso molecular es similar a una de las bandas de la endo-poligalacturonasa en presencia de Tween-80, así como una del medio control. Por otro lado las dos subunidades definidas de mayor concentración para el medio con Tween-80, tienen el mismo peso molecular que las subunidades del medio control. Esto concuerda con lo encontrado por Takuo et al (1984) quienes reportaron un peso molecular de 30 000 a 50 000 Da, así mismo Frances et al (1990), reportaron un peso molecular para los cuatro isoenzimas que obtuvieron, en un intervalo comprendido en 46 700 a 49 600 Da.

Las bandas de menor concentración que se observan para las tres endo-poligalacturonasa en los diferentes medios, difieren para cada uno de estos. Para el medio en presencia de Tween-80 hay tres subunidades con un peso molecular mayor que las dos bandas bien definidas en este medio. Para el medio con 2-DG, se observa una subunidad de peso molecular mayor que la banda bien definida, así mismo para el control (glucosa), se observan dos subunidades de peso molecular mayor que las dos bandas bien definidas para éste.

7.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EN GELES DE ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE.

Se llevó a cabo la actividad de cada una de las muestras, en geles de poliacrilamida con 0.1% de ácido poligalacturónico como sustrato, usándose rojo rutenio como colorante. La actividad enzimática se detectó como halos transparentes que corresponden a las zonas donde la endo-poligalacturonasa actuó degradando el ácido poligalacturónico por lo que el rojo rutenio no se queda ligado. El tamaño de la decoloración corresponde al grado de actividad. Se hicieron varias pruebas variando el tiempo de incubación, con el fin de poder detectar claramente las zonas de actividad.

En la figura 9. se hace una comparación de las endo-poligalacturonasa producidas en los diferentes medios, observándose que las bandas de la proteína en el gel de

poliacrilamida teñido con Sypro, corresponden a los halos del gel de poliacrilamida teñida con rojo rutenio.

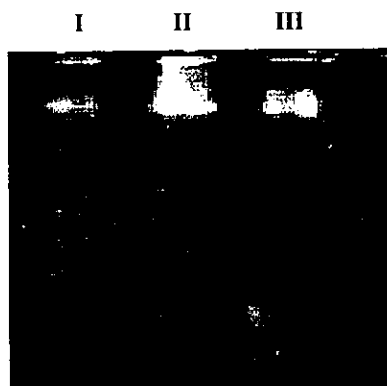
Se inició el ensayo con un tiempo de 10 hr de incubación, en el cual se detectó una gran actividad de la pectinasa, observándose un halo muy extenso a lo largo y ancho de la banda, figura 9.B. Se fue disminuyendo el tiempo de incubación, 8hr, 4hr, 20 min., figuras 10-12, observándose cada vez más definida la zona de degradación, hasta llegar a un tiempo límite de incubación de 10min, donde se pudo observar que la enzima excretada en los medios con tween-80 y 2-DG tienen actividad de endo-poligalacturonasa de forma semejante al medio control figura 13. Con esto se confirma que la enzima producida en estos dos medios al momento de su excreción no alteró su afinidad hacia el sustrato, teniendo actividad pectinolítica similar al medio control.

La formación de halos incoloros por la degradación de la endo-poligalacturonasa coincide con lo reportado por Smith y Pyle (1990), Frances et al. (1990), Schwan et al. (1997) y Montero-Andrade (1997), entre otros, ya que se observa una banda bien definida en la zona de degradación.

Figura 9. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida:

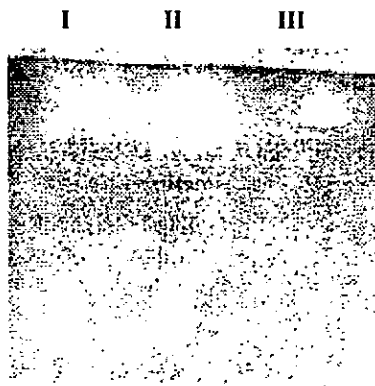
- A. Proteína teñida con Sypro:** Carril: I 2-DG, II Tween-80, III Glucosa.
B. Detección de endo-poligalacturonasa por tinción con rojo rutenio (10 hr de incubación): Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG.

A. Gel teñido con Sypro



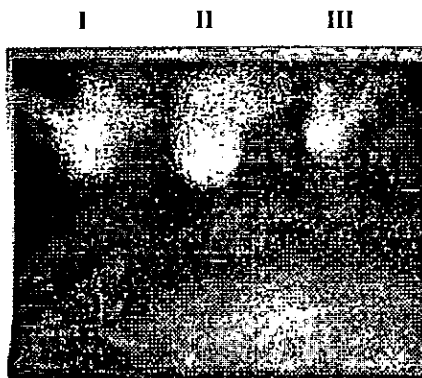
Carril: I 2-DG, II Tween-80, III Glucosa

B. Detección de endo-poligalacturonasa con rojo rutenio



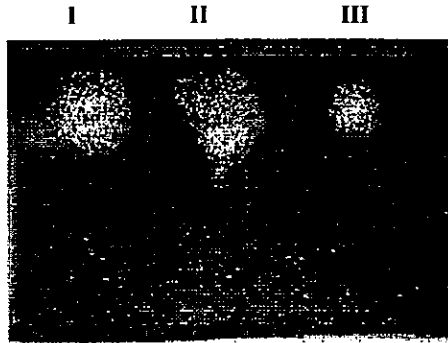
I 2-DG, II Tween-80, III Glucosa

Figura 10. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis no desnaturizante 8hr de incubación.



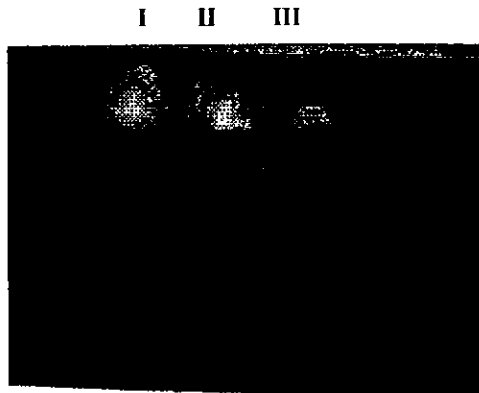
En los carriles I a III se muestran los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG

Figura 11. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis no desnaturizante 4 hr de incubación.



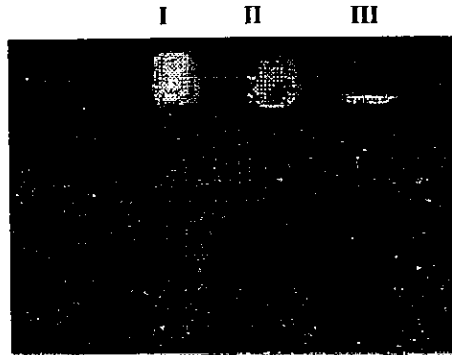
En los carriles I a III se muestran los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG

Figura 12. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis no desnaturizante 20 min. de incubación.



En los carriles I a III se muestran los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG

Figura 13. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis no desnaturalizante 10 min. de incubación.



En los carriles I a III se muestran los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG

7.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GELES DE ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE.

Cabe recordar que para llevar a cabo la actividad enzimática, los geles de sustrato se sumergen en amortiguador 5X, pH 8.3 (para corrida) y disolución amortiguadora de acetatos 50mM-10mM EDTA, para poder recobrar la actividad de la enzima. Al llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante, se observó en la tabla 8. para el medio con tween-80 que se tuvieron cinco bandas, dos de mayor concentración (a y b) y tres con menor concentración(c, d y e), para el medio con 2-DG dos bandas, una con mayor concentración (a) y otra con menor concentración (b) y para el medio con glucosa dos bandas de mayor concentración (a y b) y dos bandas de baja concentración (c y d). Por medio de la determinación de actividad enzimática en geles de electroforesis se trató de demostrar si alguna de estas bandas tenía actividad pectínolítica.

Se realizó la determinación de actividad enzimática en geles de electroforesis con un tiempo de incubación de 12 horas, observándose una gran actividad por parte de las tres muestras de endo-poligalacturonasa (figura 14). Posteriormente se fue disminuyendo el tiempo de incubación para poder ver con mas claridad la actividad de cada una de las

bandas (figuras 15-19), llegando hasta un tiempo límite de 15 min. (figura 20), en el cual se observó con claridad la actividad de cada una de las subunidades de mayor concentración, por lo que se puede decir que para el medio con tween-80, las dos bandas bien definidas presentaron actividad, teniéndose dos isoenzimas con actividad pectinolítica. Para el medio con 2-DG la subunidad con mayor concentración tiene actividad, por lo cual también es una isoenzima con actividad pectinolítica, comparando esto con el medio control se tiene también que las dos bandas de mayor concentración, son isoenzimas.

Por otra parte se observó que las bandas de menor concentración también presentaron actividad pectinolítica (figura 14), sin embargo al ir disminuyendo los tiempos de incubación no se logró detectar de forma feaciente la actividad pectinolítica de dichas bandas, esto se debe a la baja concentración de proteína que se tenía en cada muestra y también a que la disminución de los tiempos de incubación se realizaron a grandes intervalos.

En la figura 14. se hace una comparación de la endo-poligalacturonasa en los diferentes medios, por medio de gel de poliacrilamida teñido con Sypro y gel de poliacrilamida teñido con rojo rutenio, observando que las bandas de actividad coinciden con los halos de actividad.

Figura 14. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida:

- A. Proteína teñida con Sypro: Carril: I 2-DG, II Tween-80, III Glucosa
 B. Detección de endo-poligalacturonasa por tinción con rojo rutenio (12 hr de incubación):
 Carril: I 2-DG, II Tween-80, III Glucosa.

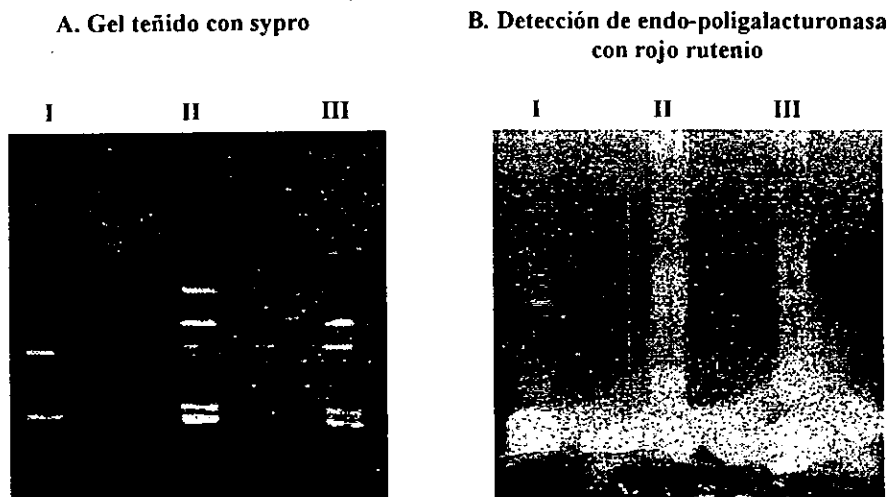
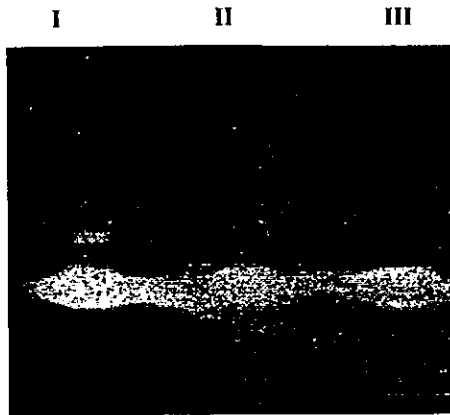


Figura 15. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis desnaturalizante 7.5 hr de incubación



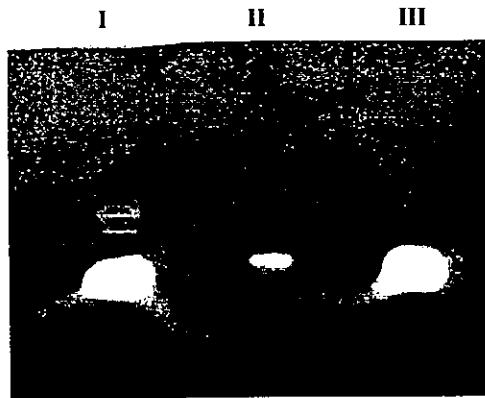
En los carriles I a III se muestran los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG.

Figura 16. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis desnaturalizante 4 hr de incubación.



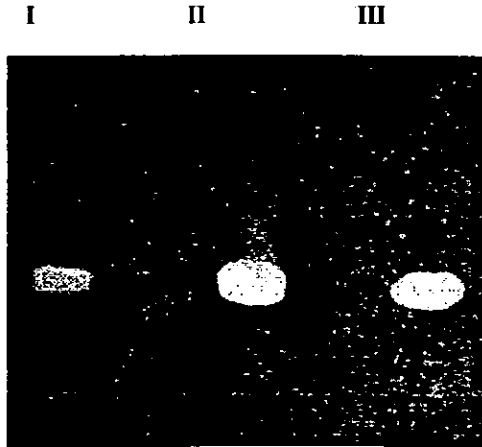
Se observan en los carriles I a III los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en los diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG

Figura 17. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis desnaturalizante 2 hr de incubación



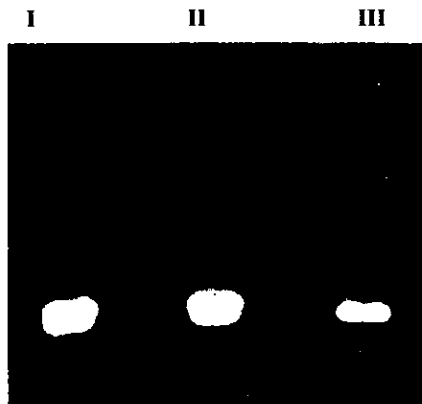
Se observan en los carriles I a III los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en los diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG.

Figura 18. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis desnaturalizante 1:30 hr de incubación



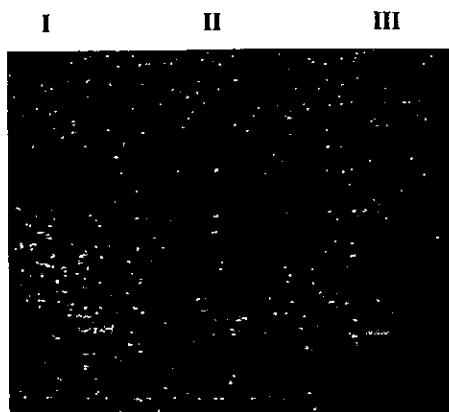
Se observan en los carriles I a III los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en los diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG.

Figura 19. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis desnaturalizante 30 min. de incubación



En los carriles I a III se observan los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en los diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG.

Figura 20. Detección de la endo-poligalacturonasa en gel de poliacrilamida por tinción con rojo rutenio. Electroforesis desnaturalizante 15 min. de incubación



En los carriles I a III se observan los halos de actividad de la endo-poligalacturonasa obtenidas en los diferentes medios de cultivo: Carril: I Glucosa, II Tween-80, III 2-DG.

En base a los resultados obtenidos, no se pudo comprobar una diferencia entre las enzimas producidas en los tres medios bajo condiciones no desnaturalizante.

Sin embargo, en condiciones desnaturalizantes, se observó que cada enzima está constituida por un número diferente de subunidades, lo que nos lleva a pensar que posiblemente hubo un cambio en el mecanismo de excreción.

8. CONCLUSIONES

- Se observó un aumento de proteína así como de actividad enzimática en el medio con 2-desoxiglucosa debido a que probablemente hubo un cambio en la pared celular de la levadura, este cambio podría estar asociado a un cambio en la morfología, permitiendo así una excreción de la endo-poligalacturonasa, como han reportado Cruz-Guerrero et al. (1997).
- En el medio con Tween-80, se observó un aumento en la cantidad de proteína, debido a que probablemente el surfactante actúa sobre la membrana celular incrementando la permeabilidad de la pared celular de la levadura, permitiendo así la liberación de una cantidad mayor de proteína, como han reportado Rosse y Maguire (1968) y Lestan et al (1994).
- Las pectinasas excretadas por *Kluyveromyces marxianus*, en cada uno de los medios son diferentes ya que en condiciones desnaturalizantes presentaron un patrón electroforético diferente.
- La endo-poligalacturonasa excretada por *K. marxianus* en presencia de Tween-80 presentó cinco subunidades, dos en mayor concentración y tres con menor concentración, con pesos moleculares de 51 519, 47 925, 104 4061, 85 886 y 73 850 Da respectivamente. Para el medio de cultivo control, se obtuvieron cuatro subunidades de la pectinasa con pesos moleculares para las de mayor concentración de 51 519 y 47 925 Da, y para las de menor concentración de 85 886 y 73 850 Da, finalmente para el medio con el análogo se obtuvieron dos subunidades, una en mayor concentración con un peso molecular de 47 925 Da y una en menor concentración con un peso molecular de 73 850 Da.
- Las subunidades tanto para el medio control como para los medios con Tween-80 y 2-desoxiglucosa presentaron actividad pectinolítica.
- No hay excreción de alguna otra proteína, solo de endo-poligalacturonasa

9. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Asther, M., Corrieu, G. (1987). Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Technol.* 9:245-249.
- (2) Baduí, D.S.,(1981) Química de los alimentos, 1ª edición. Editorial Alhambra, México, D.F.
- (3) Biely, P., Krátký, J., Kovarik, J. and Bauer, S.(1971). Effect of 2-Deoxyglucose on Cell Wall Formation in *Saccharomyces cerevisiae* and its Relation to Cell Growth Inhibition. *J. of Bacteriology.* 107 (1): 121-129.
- (4) Burdon, K., Williams, R. (1983). *Microbiología.* 1ª edición. Editorial Publicaciones culturales. S.A.
- (5) Buzzi, M., Soarez-Felipe, M.S., Azevedo, O. (1993). Membrane Lipid composition and invertase secretion of *Neurospora crassa* and its wall-less mutant slime: effects of temperature and the surfactant Tween 80. *J. of Gen. Microbiol.* 139:1885-1889.
- (6) Byron, F.(1968). Lysis of Yeast Cell Wall Induced by 2-Deoxyglucose at Their Sites of Glucan Synthesis. *J. of Bacteriology.* 95 (3):1169-1172.
- (7) Colin, J.S.1990. *Enzyme Chemistry. Impact and Applications.* Chapman and Hall. London-New York.
- (8) Cruz-Guerrero A. (1995). Regulación de la síntesis y excreción de enzimas extracelulares de *Kluyveromyces marxianus*. Tesis M. en C. Biotecnología. UAM: Iztapalapa.
- (9) Cruz-Guerrero, A., Lappé, A., Ulloa, M., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (1997). Efecto de la 2-desoxiglucosa en el cambio de morfología y la producción de pectinasa de *Kluyveromyces marxianus*. VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Int. sobre Ing. de Bioprocesos.
- (10) Demain, A.L. and Phaff, H.J.(1954). Hydrolysis of the Oligogalacturonides and Pectic Acid by Yeast Polygalacturonase. *J. Biol. Chem.* 210:381-393.
- (11) Deshpande, M.V., Srinivasan, M.C. and Deshmukh, S.S.(1987). Effect of Acids on Cellulase Production by *Penicillium funiculosum* and its Mutants. *Biotechnol. Lett.*, 9(5):301-304.
- (12) Espinoza, P., Bárzana, E., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (1992). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. *Biotechnol. Lett.* 14:1053-1058.
- (13) Frances, M., Barnby, F., Morpeth, P. (1990). Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification and partial characterisation of the enzyme. *Enzyme microb. Technol.* 12(Nov.):891-897.

- (14) García-Garibay, M. Gómez-Ruiz, L., Bárzana, E. (1987a) Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol. Lett. 9(6):411-416.
- (15) García-Garibay, M. Gómez-Ruiz, L., Bárzana, E. (1987b) Proceeding of the 1987 Food Processing Waste Conference, Atlanta USA.
- (16) Garfias, A. Ulacia, E. (1993) Tensoactivos y su aplicación en la industria. Sociedad Química de México.
- (17) Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Bárzana, E. (1988) Utilisation of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in clarification of apple juice. J. Food Sci. 53:1236-1240.
- (18) Hames, B.D. and Rickwood, D. (1981) Gel electrophoresis of proteins. a practical approach. fourth reprinting. England, Oxford.
- (19) Heredia, C., De la Fuente, G. and Sols, A. (1964). Metabolic Studies with 2-deoxyhexoses. I. Mechanisms of inhibition of growth and fermentation in baker's yeast Biochim. Biophys. Acta. 86:216-223.
- (20) Heredia, C., Sols, A. (1964). Metabolic studies with 2-deoxyhexoses. II. Resistance to 2-deoxyglucose in a yeast mutant. Biochim. Biophys. Acta. 86:224-228.
- (21) Kuhad, R.C., Kumar, M. and Singh, A. (1994). A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Lett. in Appl. Microbiol. 19:397-400.
- (22) Lehninger, A. (1991). Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª edición. Editorial. Omega, S.A. Barcelona.
- (23) Lestan, D., Cernilec, M. and Perdih, A. (1993). Determination of ligninase activity in *P. chrysosporium* pellets with diffuse reflectance spectrophotometry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:570-573.
- (24) Lim, J. Yamasaki, Y. Suzuki, Y. Ozawa, J. (1980) Multiple forms of endo-polygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. Agric. Biol. Chem. 44(3):473-480.
- (25) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem 193:25-6275.
- (26) Luh, B. Phaff, H. (1951). Polygalacturose of certain yeast. Arch. Biochem. Biophys. 33:212-227.
- (27) Martínez-Monroy, S. (1997). Efecto del Tween-80 en la producción y/o excreción de endo-polygalacturonasa a partir de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278. Reporte de servicio social UAM-I.
- (28) Montero-Andrade, F.F. (1997). Purificación Parcial de Poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278. Reporte de servicio Social UAM-I.

- (29) Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153(2):375-380.
- (30) Ohta, K. and Hayashida, S. (1983). Role of Tween 80 and Monoolein in a Lipid-Sterol-protein Complex Which Enhances Ethanol Tolerance of Sake Yeast. *Appl. and Environm. Microbiol.* 46(4):821-825.
- (31) Owen, P.W., 1991. *Biotechnology de la fermentación. Principio, Procesos y Productos.* 2ª edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- (32) Phaff, H. and Demain, A. (1956). The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.* 218:875-886.
- (33) Reese, E.T. and Maguire, A. (1969). Surfactants as Stimulants of Enzyme Production by Microorganisms. *Appl. Microbiol.* 17(2):242-245.
- (34) Ried, J.L. and Collmer, A. (1985). Activity Stain for Rapid Characterization of Pectic Enzymes in Isoelectric Focus and Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gels. *Appl. Environm. Microbiol.* 50 (3): 615-622.
- (35) Ried, J.L. and Collmer, A. (1986). Comparison of Pectic Enzymes Produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotova* subsp. *carotova*, and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environm. Microbiol.* 52(2):305-310.
- (36) Rose, a. y Harrison, J. (1987). *The yeast.* 2ª edition. Edit Academic press. London. Vol. 1, 3 y 4.
- (37) Saval, S., Solórzano, R.M., Alpizar, L., Cea, A. y Huitrón, C. (1983). Producción de Pectinasas Microbiana a partir de la Pulpa del Henequén., *Biotechnology de Enzimas.* Depto. de Biotechnology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- (38) Schlochtermeyer, A., Niemeyer, F. and Schrempf, H. (1992). Biochemical and Electron Microscopic Studies of the *Strptomyces reticuli* Cellulase (Avicelase) in Its Mycelium-Associated and Extracellular Forms. *Appl. and Environm. Microbiol.* 58(10):3240-3248.
- (39) Scriban, R. (1984), *Biotechnology*, 2ª edición, Editorial Manual Moderno, México, D.F.
- (40) Segel, I.H.. (1982). *Cálculos de Bioquímica.* 2ª edición Editorial Acribia, Zaragoza (España).
- (41) Smith, A. and Pyle, D. (1990). Two-dimensional electrophoretic analysis of endopoligalacturonases produced by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Food Biochem.* 14:273-281.
- (42) Stryer, L., (1993). *Bioquímica.* 3ª edición, Tomo I, Edit. Reverté, S.A. New York.
- (43) Suckling, C. (1990). *Enzyme chemistry. Impact and applications.* 2ª edition. Edit Chapman and Hall. London.

- (44) Takuo, S. Okushima, M. Yoshitake, S. (1983). Purification. Crystallisation and some properties of endo-poligalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 48(8), 1951-1961.
- (45) Tucker, G.A. and Woods, L.F.J. 1991, *Enzymes in Food Processing*. Edit AVI, New York.
- (46) Viesturs, U., Leite, M., Treimanis, A., Eremeeva, T., Apsite, A., Eisimonte, A. and Jansons, P. (1996). Production of cellulases and Xylanases by *Trichoderma viride* and Biological Processing of Lignocellulose and Recycled Paper Fibers. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 57(58):349-360.
- (47) Whitaker, J. R. (1972). *Principles of enzymology for the Food Sciences*. Editorial Marcel Dekker, Inc. New York.
- (48) Wimborne, M., Rickard, P. (1978) Pectinolytic Activity of *Saccharomyces fragilis*. *Cult. in contr. Envirom. Biotechnol. Bioeng.* 20:231-242.

10. ANEXO**APÉNDICE I**

Para la determinación de actividad enzimática de endo-poligalacturonasa por el método de Nelson-Somogyi fue necesario elaborar los reactivos que a continuación se mencionan:

Reactivo I**Disolución A:**

En 500 mL de agua se disolvieron: 25g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3), 25g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 20g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 200g de sulfato de sodio (Na_2SO_4), y se aforó a 1 litro.

Disolución B:

En 200 mL de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), y se disolvieron 30g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Para preparar el reactivo, se mezcló 1 mL de disolución B más 25 mL de disolución A.

Reactivo II**Disolución A:**

En 450 mL de agua destilada se disolvieron 21 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 25 g de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Disolución B:

Se disolvió en 25 mL de agua destilada 3g de arseniato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Se mezcló lentamente con agitación las disoluciones A y B, se aforó a 500 mL y se calentó a 55°C por 30 min.

APÉNDICE II

Para la determinación de proteína por el método de Lowry se requirió la preparación de los siguientes reactivos:

- A) Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% en NaOH 0.1 N
- B) Sulfato de cobre (CuSO_4) al 1%
- C) Tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 2%
- D) Reactivo de Folin 1:1 con agua (preparado al momento de usarlo).

Técnica:

- 1) Se mezclaron 50 mL del reactivo A mas 1 mL del reactivo B y 1 mL del reactivo C
- 2) Se tomaron 5 mL de lo anterior y se adicionó 1 mL de muestra problema
- 3) Se dejó reposar 10 min. en la oscuridad.
- 4) Posteriormente se agregaron 0.5 mL de la disolución D
- 5) Se dejó reposar 30 min. en la oscuridad.
- 6) Las muestras se leyeron en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a $\lambda = 590 \text{ nm}$, contra un blanco de reactivos y ácido poligalacturónico.
- 7) Los datos obtenidos se correlacionaron con una curva patrón de seroalbúmina-bovina de concentración de 0-500 $\mu\text{g/mL}$

APÉNDICE III

Para la elaboración de los geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes se prepararon los reactivos que se mencionan a continuación:

1) Disolución de acrilamida/bis (T=30% y C= 2.67%, en donde %T se define como el contenido de acrilamida y bisacrilamida $\%T = (\text{g acrilamida} + \text{g bisacrilamida} / \text{volumen total}) \times 100$, y %C se define como la relación de bisacrilamida/acrilamida $\%C = (\text{g bisacrilamida} / \text{g acrilamida} + \text{g bisacrilamida}) \times 100$). Se pesaron 14.6g de acrilamida, 0.4g de N'N'-bis-metilen-acrilamida, se disolvieron en 35 mL de agua y se aforó a 50 mL.

2) Amortiguador Tris-HCl 1.5M, pH 8.8 (para gel de separación). Se pesaron 18.15g de base-Tris y se aforó a 100 mL, se ajustó a pH 8.8 con HCl 6N.

3) Amortiguador Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 (para gel de concentración). Se pesaron 6.0g de base-tris y se aforó a 100 mL, se ajustó a pH 6.8 con HCl 6N.

4) Amortiguador 5X, pH 8.3 (para corrida). Se pesaron 9.0g base-tris, 43.2g de glicina y se adicionaron a 600 mL. Para una corrida electroforética se diluyeron 60 mL de amortiguador 5X con 240 mL de agua desionizada.

5) Persulfato de amonio al 10%. Se disolvió 0.1 g en 1 mL de agua. Este reactivo se preparó al momento de su utilización.

6) Colorante azul de bromofenol. Se agregó 0.01 g de azul de bromofenol en 172.5 μL de NaOH 0.1 M y se aforó a 25 mL.

7) Colorante para corrida de muestras. Se mezclaron 3.8 mL de agua desionizada, 1.0 mL de Tris-HCl pH 6.8, 0.8 mL de glicerol y 0.4 mL de azul de bromofenol (1%).

8) Colorante azul de Coomassie al 0.25%. Se pesaron 0.25g de azul de Coomassie y se aforó a 100 mL en disolución desteñidora.

9) Disolución desteñidora se preparó con ácido acético, metanol y agua destilada en proporciones de 10:40:50.

APÉNDICE IV

Para la determinación del peso molecular de la proteína se utilizó el dodecil sulfato de sodio (SDS), es un detergente aniónico que destruye muy eficazmente la estructura cuaternaria de la mayoría de las proteínas. Muchas moléculas de SDS se unen fuertemente a las subunidades y anulan la carga original de la proteína. Así, en una electroforesis, todos los complejos SDS-proteína migran hacia el polo positivo con aproximadamente la misma relación carga/masa. Si la electroforesis se hace en geles de poliacrilamida, la movilidad de un complejo SDS-proteína dependerá casi exclusivamente de su tamaño. En efecto, la electroforesis en gel SDS es una filtración con gel que tiene un campo eléctrico como fuerza directora en vez de un flujo de una disolución. Así, se puede trazar una gráfica patrón, utilizando proteínas de pesos moleculares conocidos. El peso molecular de un compuesto desconocido se puede determinar fácilmente. La electroforesis en gel-SDS puede llevarse a cabo con preparaciones no homogéneas si es que es posible localizar la posición de la proteína que nos interesa (por ejemplo, por alguna mancha específica de esa proteína o uno de sus productos de reacción si la proteína es un enzima) (Segel, 1982, Stryer, 1993).

Tomando en cuenta lo anterior, se corrió junto con las muestras un patrón de peso molecular conocido, obteniendo de éste la migración relativa al frente del colorante, así mismo de las muestras estudiadas. El R_f se calculan dividiendo la distancia de migración de la muestra (la cual se mide desde la parte superior del gel hasta el centro de la muestra) entre la distancia de migración del frente de color.

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{distancia de migración del frente de color}}$$

Con los R_f del patrón de peso molecular conocido se realizó una gráfica $100[\text{Log}(R_f \times 100)]$ vs PM, interpolando en esta los R_f de las diferentes muestras, se obtiene el peso molecular de la enzima.

También, por electroforesis en un sistema no desnaturalizante se puede determinar indirectamente el peso molecular de la proteína.

- Junto con las muestras se corrieron diferentes patrones de peso molecular conocido en geles de diferente concentración de poliacrilamida, y se determina el R_f de la proteína en cada uno de estos geles.

-Se obtuvo la pendiente de cada uno de los estándares así como de las muestras problemas, graficando $100[\text{Log}(R_f \times 100)]$ vs %T.

- Por otro lado se graficó la pendiente de cada uno de los patrones vs sus pesos moleculares conocidos.

- Se interpolaron las pendientes obtenidas de las muestras problemas, obteniéndose de esta manera el peso molecular de las diferentes muestras de la endo-poligalacturonasa. (Hames and Rickwood, 1981).

APÉNDICE V

La determinación de actividad en geles de electroforesis, se basa en la habilidad de la enzima para difundir las bandas sobre el gel de poliacrilamida, para degradar el sustrato que se encuentra en este, los cuales deben estar inmersos en una disolución amortiguadora durante un tiempo de incubación y a una temperatura, la cual sea conveniente para que la enzima actúe sobre el sustrato, seguido de una tinción con un colorante.

Los geles que contienen el sustrato, pueden ser de poliacrilamida, agarosa-pectato o simplemente de agarosa, éstos deben ser ultrafinos, con la finalidad de que la difusión y la degradación se lleven a cabo con relativa facilidad.

Estos geles llamados "geles de sustrato" son empalmados con los geles que contienen a la enzima, o bien los geles que contienen a la enzima (geles de poliacrilamida), pueden contener al sustrato, el cual se adiciona desde la preparación del gel.

El colorante utilizado para poder detectar la actividad en geles de electroforesis, depende del sustrato con el que se esté trabajando. Para detectar la actividad pectinolítica, se empleó el colorante rojo rutenio, el cual reacciona con el ácido poligalacturónico, formándose un complejo colorante-sustrato en todo el gel. Cuando la enzima actúa sobre el sustrato, rompe las cadenas del ácido poligalacturónico presente en el gel, produciendo

unidades de ácido galacturónico, el cual no puede actuar con el rojo rutenio, de tal manera que al momento de revelar el gel de substrato con el colorante para observar la actividad, se observan algunas partes sin teñir, con lo cual se demuestra la acción de la enzima sobre el substrato.