UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Secreción de Pectinasas Extracelulares de *Aspergillus* MGM-180 en Condiciones Extremas de pH.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGA

PRESENTA

Sara Fabela Leal

Director de tesis:

DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO

MEXICO, D. F. 2000

2778-5

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Secreción de pectinasas extracelulares de Aspergillus MGM-180 en condiciones de estrés por pH".

realizado por Sara Fabela Leal.

Con número de cuenta 9052249-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de tesis
Propietario Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Propietario Biol. Josefina Herrera Santoyo

Propietario M en C. Alfredo Fco. Ayala Ochoa

Suplente Biol. Luis Angel Gómez Velez

Suplente Biol. Mario Gutiérrez Rodríguez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz.

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradecimientos

Al Dr. Guillermo Aguilar, por todo su apoyo y tiempo brindado para la realización de éste trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y sugerencias, gracias.

A todos mis amigos, por su compañía y su amistad sincera.

Dedicatoria

A mi mamá y a todos mis hermanos.

A mi esposo Alejandro por su paciencia y compañía en todo momento.

Dios creó la naturaleza, con ella la vida y las interacciones que se pueden encontrar. La naturaleza se transforma y evoluciona a cada momento. En nosotros está conservar su belleza tan preciada, llena de incognitas y sabiduría.

Contenido

Capítulo I.- Introducción.....1

Enzímas pectinolíticas.....2
Substancias pécticas.....5
Enzímas pécticas.....7
Aspectos regulatorios en la producción de pectina.....11

Capítulo II.- Objetivo.....15

Capítulo III.- Materiales y métodos.....16

Microorganismo.....16
Medio de cultivo.....16
Crecimiento celular.....17
Azúcares reductores.....18
Actividad exopectinolítica.....18
Actividad endopectinolítica.....19
Determinación de los productos de hidrólisis.....19
Prehidrólisis del substrato.....20

Capítulo IV.- Resultados y discusión.....21

Efecto del pH sobre la producción de pectinasas y el cecimiento celular.....21
Efecto de la concentración de potasio.....25
Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento y producción de pectinasas extracelulares.....28
Efecto de diferentes fuentes de carbono con extracto de levadura al 0.3% como nutrientes sobre el crecimiento y producción enzimática.....32
Obtención de productos de hidrólisis.....35
Prefermentación.....38

V.- Discusión general.....40

VI.- Conclusión.....45

VII.- Referencias.....46

SECRECION DE PECTINASAS EXTRACELULARES DE *Aspergillus MGM-180* EN CONDICIONES DE ESTRES POR pH.

I.- INTRODUCCION

Las enzimas pectinolíticas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza que se caracterizan por su capacidad para degradar pectina y sustancias relacionadas. Estas enzimas juegan un papel importante en la naturaleza, ya que la degradación de la pectina está relacionada al desarrollo de muchos procesos biológicos en las plantas, entre las cuales se encuentran: su crecimiento, la elongación celular, la maduración de las frutas y la absición de las hojas. Además de que podemos encontrarlas en las plantas, las enzimas pecticas también son producidas por bacterias, hongos, levaduras y algunos insectos, nemátodos y protozoarios. La degradación de la pectina de las plantas está estrechamente ligada con la patogénesis, la simbiosis y la descomposición de frutas, vegetales y residuos de plantas.

En la industria, las pectinasas se utilizan para el procesamiento de frutas y vegetales, en la despectinización y clarificación de jugos, y para aumentar los rendimientos de extracción, reducir el tiempo de filtración y la extracción de aceites esenciales. Dada la naturaleza inducible de estas enzimas para su producción es necesario la adición de pectina o bien, materiales que la contengan tales como cáscara de algunos cítricos, bagazo de manzana, pulpa de remolacha y de henequén, entre otros. Actualmente la producción industrial de pectinasas se lleva a cabo mediante procesos de fermentación sumergida y/o semisólida a partir de materiales ricos en pectina usados como sustrato y, suplementados con glucosa, fructuosa, sacarosa, maltosa, almidón, cereales molidos o bien, algunos derivados intermedios de la pectina como ácido galacturónico y ácido poligalacturónico, utilizando hongos principalmente del género *Aspergillus* (4).

ENZIMAS PECTINOLITICAS

Las enzimas pectinolíticas son un grupo de enzimas ampliamente distribuido en la naturaleza; se caracterizan por su capacidad de degradar pectina y sustancias relacionadas como el ácido poligalacturónico (59). Las pectinasas juegan un papel importante en la naturaleza, ya que la degradación de la pectina se encuentra asociada estrechamente al desarrollo de muchos procesos biológicos en las plantas, entre los que se encuentran: el crecimiento de las plantas, la elongación celular, la maduración de frutos y, la absición de las hojas (58).

Algunos subproductos agrícolas contienen grandes cantidades de pectina, por lo que el potencial de ser utilizados en la producción de enzimas pectinolíticas extracelulares y biomasa microbiana, de acuerdo a investigaciones realizadas durante los últimos años es muy grande (1,2). Esto se hace actualmente con la pulpa de remolacha y de manzana. Así mismo estos productos se usan para la extracción de pectina contenida en ellos.

Una de las principales causas de la opalescencia en jugos de frutas y vinos se debe a la presencia de sustancias pecticas y particularmente de pectina, que se encuentra localizada en las paredes celulares vegetales, y son liberadas cuando la fruta es exprimida, por lo cual durante la producción de jugos, extractos o concentrados de frutas, es conveniente la adición de enzimas pécticas, con el fin de acelerar las operaciones de maceración y solubilización de la fruta, así como para incrementar los rendimientos de extracción y reducir el tiempo del proceso (17).

Actualmente el uso de enzimas pectinolíticas en el procesamiento de frutas, está muy difundido, sobre todo en la industria de los jugos ya que la pectina insoluble aumenta la viscosidad y altera la estabilidad y color (3,4). Las propiedades coloidales de la pectina impiden la sedimentación de partículas en el jugo. En presencia de enzimas

pécticas las moléculas de pectina son hidrolizadas y los productos formados no retienen las propiedades coloidales de la pectina, lo que facilita la rápida sedimentación de las partículas responsables de la opalescencia que pueden ser fácilmente separadas por centrifugación, decantación o filtración (3,5). Hay casos en los que la opalescencia en los jugos es comercialmente deseable, tal es el caso de los jugos y puré de tomate por lo que es importante, en estos procesos, el precalentamiento de los jugos para destruir o desnaturalizar las pectinasas naturalmente presentes, de esta manera se garantizan la opalescencia del jugo.

Las enzimas pécticas las podemos encontrar en frutas y vegetales, así como en bacterias, hongos y levaduras, capaces de degradar sustancias pécticas de diversos orígenes (Tabla 1).

TABLA 1.**Principales Fuentes Naturales de Pectinasas**

	Tipo de enzimas pécticas						
Organismo	PE	PG	PGL	PMG	PMGL	OG	OGL
Plantas superiores:							
Cítricos		+					
Licopersicum esculentum		+	+				
Malus silvestris	+	+					
Hongos:							
Aspergillus niger	+	+	+		+	+	
Penicillium digitatum		+			+	+	
Fusarium solani			+			+	
Levaduras:							
Kluyveromices			+				
Bacterias:							
Bacillus sp.			+			+	
Erwinia aroideae		+	+		+	+	
Pseudomonas marginalis	+	+	+				

PE, Pectinesterasas; PG, Poligalacturonasas; PGL, Poligalacturonato-liasa; PMG, Polimetilgalacturonasa; PMGL, Polimetilgalacturonato-liasa; OG, Oligogalacturonasas; OGL, Oligogalacturonato-liasa.
Adaptado de Fogarty y Kelly (1976) y Pilnik y Rombouts (1979).

Los hongos producen preferentemente poligalacturonasas y pectinesterasas, siendo las primeras las que tienen la mayor importancia desde el punto de vista industrial, lo que ha favorecido la utilización de hongos para la obtención industrial de estas enzimas (6,7).

Muchas, pero no todas las pectinasas extracelulares son sintetizadas en respuesta a la presencia de inductores (8-11), los cuales son generalmente insolubles o por lo menos incapaces de ser transportados al interior de la membrana celular por lo que no pueden ser los inductores directos, solo que la inducción se realice en la periferia externa de la célula. Probablemente, los inductores directos son productos intermedios de la degradación de los primeros, para citar un ejemplo, para la pectinasa de *Erwinia caratovora*, el ácido galacturónico (8).

Debido a la naturaleza inducible de la mayoría de las enzimas pectinolíticas su producción está estrechamente ligada al sustrato utilizado como inductor (16), por lo que el rendimiento y tipo de enzimas que se obtienen depende fundamentalmente de: a) El microorganismo utilizado; b) De la eficiencia en el proceso de producción; c) El tipo de proceso que se utilice (lote continuo o alimentado, fermentación sumergida o semisolida); y d) De la naturaleza y concentración del sustrato inductor.

Aunque todos los inductores conocidos de las pectinasas son urónidos, productos derivados de la pectina o del ácido poligalacturónico, dependiendo de la concentración y tipo de inductor presente, el microorganismo puede producir cierta actividad pectinolítica preferencialmente sobre otras (8,17,18).

SUBSTANCIAS PÉCTICAS

Las substancias pécticas son los substratos de las pectinasas. Están localizadas en la pared primaria de las células y en la lámina intermedia de los tejidos vegetales, dónde funcionan como cemento intercelular y se encuentran también en algunos microorganismos (3). Se ha reportado que hay un 35% de sustancias pécticas en la pared celular de plantas dicotiledoneas (19).

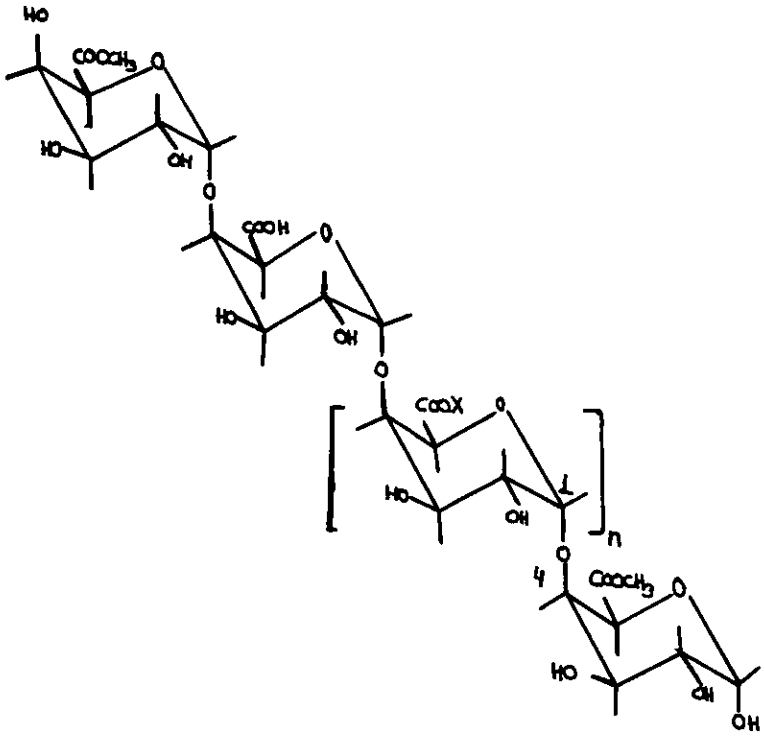

Figura 1. Estructura de pectina, mostrando enlaces alfa 1,4, del ácido galacturónico. X representa H o CH3 dependiendo del grado de esterificación.

En algunas ocasiones en estos polisacaridos se encuentran ramificaciones de L-arabano y β1,4-D-galactano; de ellos también se han aislado y caracterizado los siguientes azúcares: L-rhamnosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa y L-fucosa (17). Sin embargo, la L-rhamnosa es la única que esta presente en el interior de la cadena, interrumpiendo secuencias de 10-20 residuos de ácido galacturónico. La presencia y concentración de estos azúcares, así como el grado de esterificación dependen de la fuente vegetal. La unión de las unidades de ácido galacturónico forma una cadena lineal, la cual tiende a girar sobre su propio eje (17).

El tipo de azúcares y cantidad de éstos así como el grado de esterificación dependen básicamente del origen de las sustancias pécticas (20,22-25). La pectina se encuentra en forma insoluble en las plantas y se denomina protopectina, cuya síntesis ocurre en las etapas tempranas de crecimiento, cuando el área de la pared celular aumenta (18). La transformación de la protopectina en pectina soluble, está directamente relacionada con la maduración y envejecimiento de frutas y vegetales. Estos fenómenos tienen gran importancia económica, ya que la textura de éstos está influida directamente por el tipo y cantidad de pectina presente (8)

ENZIMAS PÉCTICAS

Las enzimas que actúan sobre las sustancias pécticas pueden ser divididas en dos grandes grupos (8,26,27) enzimas despolimerizantes y pectinesterasas, las primeras pueden clasificarse a su vez en base a los siguientes criterios:

a) si la ruptura de los enlaces alfa- 1,4 se lleva a cabo por hidrólisis o transeliminación.

b) de acuerdo al sitio de iniciación de la ruptura: aleatoriamente dentro de la cadena (de tipo endo), o en el extremo de la misma (de tipo exo), y

c) por el tipo de sustrato sobre el que preferentemente actúan (pectina, ácido péctico u oligoD-galacturonatos).

Actualmente se han encontrado, en diversos organismos poco más de 15 diferentes actividades pectinolíticas (tabla 2).

Tabla 2.**CLASIFICACION DE ENZIMAS PÉCTICAS**

Enzimas	Mecanismo de acción
I.- Pectinasas despolimerizantes	
1.-Actúan sobre la pectina	
a) Polimetilgalacturonasas (PMG)	
i) Endo-PMG	Hidrólisis
ii) Exo-PMG	Hidrólisis
b) Polimetilgalacturonato-liasas (PMGL)	
i) Endo-PMGL	Transeliminación
ii) Exo-PMGL	Transeliminación
2.- Actúan sobre ácido péctico	
a) Poligalacturonasas (PG)	
i) Endo-PG	Hidrólisis
ii) Exo-PG-1	Hidrólisis
iii) Exo-PG-2	Hidrólisis
b) Poligalacturonato-liasas (PGL)	
i) Endo-PGL	Transeliminación
ii) Exo-PGL	Transeliminación
3.- Actúan sobre oligo-D-galactosiduronatos	
a) Oligogalacturonasas (OG)	Hidrólisis
b) Oligogalacturonato-liasas (OGL)	Transeliminación
II.- Esterasas	
a) Pectinmetilesterasas o pectinesterasas (PE)	Hidrólisis

Adaptado de Kilara (4) y Fogarty y Kelly (13)

De todas éstas las de mayor importancia desde el punto de vista de su aplicación en la industrialización de frutas y vegetales son las enzimas despolimerizantes de tipo endo (20,24,25,28-32), ya que reducen rápidamente la viscosidad de la pectina presente en estos materiales, permitiendo aumentar los rendimientos de extracción y reduciendo los tiempos de filtración de los jugos (4). Las despolimerazas rompen los enlaces glucosídicos alfa-1,4 del sustrato de su preferencia ya sea por hidrólisis actuando para ello las enzimas del tipo de las hidrolasas o bien por beta-eliminación enzimas del tipo de las liasas (8,11,12,31,33). El rompimiento hidrolítico puede iniciarse por el extremo de la cadena del sustrato (enzimas de tipo exo), rindiendo productos de bajo peso molecular, principalmente monómeros (Fig 2).

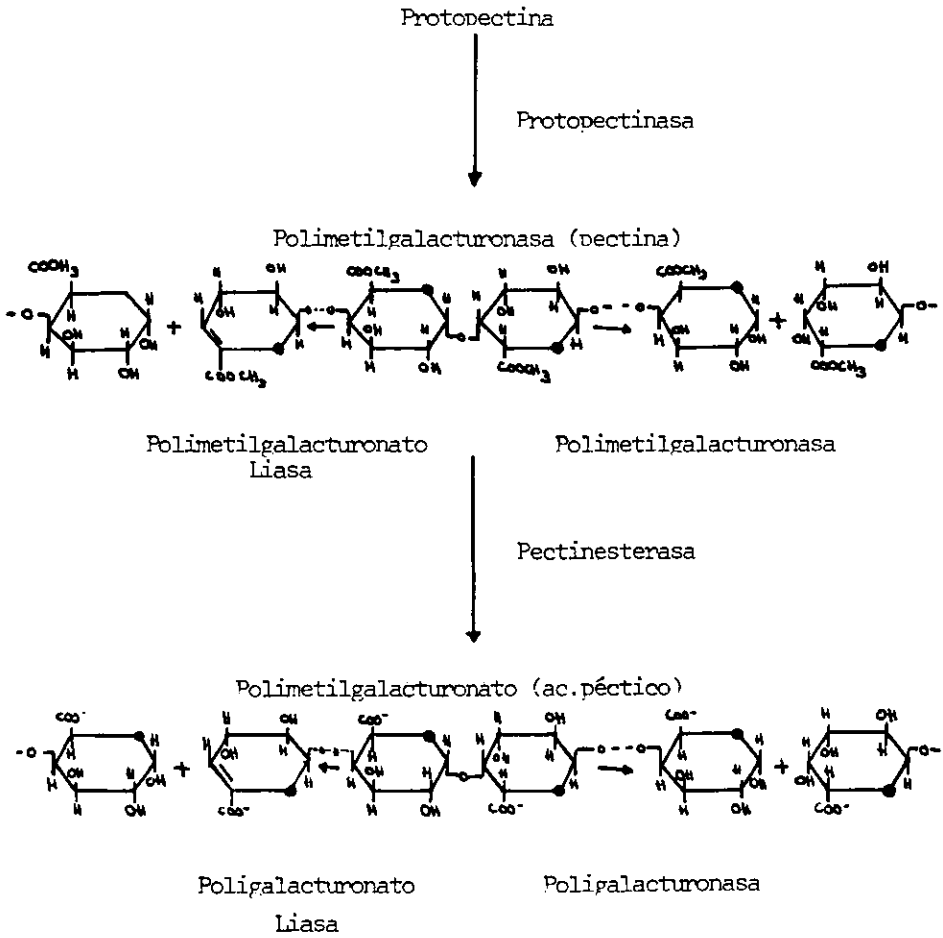

Figura 2. Modo de acción de las enzimas pécticas sobre sustrato.

Si el rompimiento ocurre de manera aleatoria actuando las enzimas de tipo endo, los productos principales son oligómeros con menos proporciones de monómeros y dímeros, que con las enzimas de tipo exo (3). El ataque enzimático por beta-eliminación da como resultado la formación de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 y, al igual que las enzimas del tipo de las pectinasas hidroliticas puede haber de tipo exo y endo.

Las pectin-liasas (PMGL) polimetilgalacturonato-liasas son producidas por hongos (8,10,11,12,25,30,34,35) y no han sido encontradas en bacterias ni en plantas superiores. Las pectato-liasas (endo y exo-PGL) poligalacturonato-liasas son enzimas típicamente bacterianas, pocos hongos las producen, y no han sido encontradas en plantas superiores. Las endo y exo poligalacturonasas son producidas por la mayoría de los hongos, por algunas bacterias y se encuentran con mucha frecuencia en plantas superiores. Las pectinesterasas las podemos encontrar en plantas, hongos y algunas bacterias. Por último la exo-PMG (polimetilgalacturonasa y la exo-PGL no han sido encontradas en la naturaleza (36). Las oligogalacturonasas se han encontrado en algunas esporas de los géneros *Bacillus y Erwinia*. Estas enzimas generalmente unidas a la célula, convierten oligoúronidos en monómeros, atacan al sustrato solo por los extremos (reductor y no reductor) por lo que son de tipo exo y se han descrito tanto oligogalacturonato-hidrolasas como oligogalacturonato-liasas (3,17).

ASPECTOS REGULATORIOS EN LA PRODUCCIÓN DE PECTINA

de poligalacturonato-liasas (PGL) en forma constitutiva, utilizando para ello diferentes fuentes de carbono; pero cuando *B. subtilis* crece en presencia de pectina el crecimiento y la producción de PGL disminuye debido a que el microorganismo no produce pectinesterasas, responsables de la desmetilación de la pectina (38). De las baterías productoras de pectinasas es importante destacar que, el género *Erwinia* produce prácticamente todas las actividades que se han reportado hasta el momento (17). En virtud de que las sustancias pécticas son polisacaridos de alto peso molecular que dificilmente pueden entrar a la célula, surge la interrogante de como los microorganismos pueden detectar la presencia de los materiales que llevan a cabo la inducción enzimática en el ambiente externo. Se ha sugerido que algúnos microorganismo producen niveles básales de pectinasas constitutivas que degradan el sustrato polimérico y que los productos de bajo peso molecular de esta reacción sirven como inductores y fuentes de energía para promover el crecimiento e inducir la producción de otras pectinasas (41). Para unos microorganismos esto es totalmente cierto, particularmente en algúnas bacterias y un número reducido de hongos (8,41,42).

La producción de pectinasas en muchos organismos está limitada por mecanismos que regulan su síntesis y, por factores ambientales externos como la temperatura y húmedad. La mayoría de las enzimas son inducidas por la presencia de pectina y están sujetas a represión catabólica por la fuente de carbono (10,13,33,38,39,40).

Las pectinasas son producidas por varios géneros de bacterias que incluyen, *Bacillus, Clostridium, Pseudomonas, Xantomonas y Erwinia* (17). *Bacillus subtilis* es productor tambien.

La síntesis de endo-poligalacturonatoliasas es constitutiva para *Erwinia. caratovora y E. aroidae*, y debido a la velocidad diferencial de síntesis en glucosa, glicerol y pectato de sodio se ha concluido que esta enzima se encuentra sujeta a

represión catabólica. *E. caratovora, E. chrysanthemi y E. aroidae* secretan una parte de la poligalacturonatoliasa que producen al medio de cultivo, y otra parte permanece asociada a la célula (8,39,43). Así mismo, se ha descrito que la síntesis de endopoligalacturonatoliasa extracelular de *Aeromonas liquefaciens* es constitutiva y sensible a represión catabólica (39).

En hongos los fenómenos regulatorios en general asociados a la producción de pectinasas han sido menos estudiados que en baterías (10,11,23,32,35,46), a pesar de la gran importancia que esta información representa a nivel industrial. Sin embargo, se sabe que la síntesis de pectinasas en hongos de los géneros *Aspergillus, Fusarium y Verticillium* es, en general, inducida por sustancias que contienen pectina (18,21,27,47) y que están sujetas a represión catabólica como se ha descrito para *Aspergillus niger* (39) y *Pyrenochaeta terrestris* (48). *P. terrestris* produce pequeñas cantidades de endo-poligalacturonasas de forma constitutiva (48). Así mismo, en *A. saitoi* (33) y *Botrytis cinerea* (41,42) se ha reportado la producción constitutiva de poligalacturonasas. Sobre la regulación de la síntesis de estas enzimas se ha reportado que la poligalacturonasa de *A. niger* está sujeta a represión catabólica por glucosa a nivel de transcripción y traducción (27,38).

Igualmente, se sabe que la síntesis de endopoligalacturonasas de *Pyrenochaeta terrestris* es reprimida por la adición de glucosa u otras hexosas a concentraciones de 0.05 M, pero es estimulada a concentraciones 0.005 M cuando el microorganismo crece en medios que contienen pectina (49). De la mayoría de los hongos, se desconoce cual es el inductor directo de la síntesis de pectinasas pero, se ha encontrado que, el ácido poligalacturónico induce la síntesis de endo-pectin-liasas en *Verticillium alboatrium* (3), y que el D-galactato o ácido músico, parece ser el único compuesto estimulador de la síntesis de pectinesterasas y poligalacturonasas en *Penicillium chrysogenum* (33).

Actualmente, no se sabe con precisión cual es el inductor directo de la actividad pectinolítica en hongos, de entre los diferentes compuestos producidos durante la degradación de las sustancias pécticas (21) Por otro lado, se ha observado en *Fusarium roseum* la presencia de un fenómeno de inducción diferencial relacionado con el pH (9). Se ha descrito que a pH de 3.5 en medios que contienen pectina como fuente de

carbono, se inducen la endo-poligalacturonasa y pectinesterasa. Esto no ocurre a pH de 6.5 (48).

En la actualidad, la producción de enzimas pécticas se lleva a cabo usando sistemas de fermentación del tipo semisólido (31,49) o sumergido (15,45,46,49,50) en medios de composición compleja y usualmente indefinida usando sustratos como glucosa, maltosa, almidones y cereales (10,11,30,35,40,53,), entre muchos, adicionando materiales que contengan pectina. Para ello generalmente se usan desperdicios del procesamiento de las frutas como pueden ser bagazos de manzana, naranja, limón y otros como el bagazo de caña (15,20,28,34). Las preparaciones comerciales de pectinasas se encuentran formadas por poligalacturonasas y pectinesterasas obtenidas de hongos como *Aspergillus y Penicillium* (32,34,45,46,55).

El interés del presente trabajo es conocer más acerca de la producción de pectinasas extracelulares en condiciones extremas de pH 2.5, utilizando para ello la cepa *Aspergillus MGM-180*, cepa pectinolítica aislada de fuentes naturales. Se ha demostrado que la cepa *MGM-180* puede ser utilizada adecuadamente para la producción de éstas enzimas (58). Ésta cepa se seleccionó por su gran capacidad para producir pectinasas.

De lugares donde se generan subproductos agroindustriales, se han aislado cepas pectinolíticas de importancia en la producción de pectinasas y biomasa microbiana. De esta forma se obtienen cepas que a través del tiempo ha sufrido adaptaciones biológicas que les han ayudado a crecer en condiciones adversas y a utilizar los productos o subproductos como nutrientes básicos. La cepa de *Aspergillus MGM-180* aislada en el laboratorio es un hongo blanco del género *Aspergillus*, crece a 37°C y, puede utilizar pectina como única fuente de carbono (58).

Se ha encontrado que la producción de pectinasas por *Aspergillus sp.* es afectada por la concentración de los productos de degradación que se acumulan en el medio durante las primeras horas de fermentación. De esta forma, si los productos se

encuentran en una concentración elevada, la producción de enzimas es reprimida, lo que indica que estas enzimas están sujetas a represión catabólica por la fuente de carbono. También produce actividad de liasa, esto nos da una idea de que este organismo posee un amplio sistema pectinolítico.

II.-OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fué caracterizar la secreción de pectinasas extracelulares de *Aspergillus MGM-180* a pH muy ácido; comparar la secreciòn de pectinasas a pH inicial de 3 y 2.5; determinar el efecto de diferentes fuentes de carbono como: glucosa, fructuosa, sacarosa, ac. galaturònico y ac. poligalacturònico en la secreciòn de pectinasas extracelulares; determinar el efecto de sales de potasio del medio sobre el crecimiento y producción de pectinasas extracelulares. Asì mismo, determinar si las pectinasas extracelulres secretadas son constitutivas.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMO

Hongo de color blanco del género *Aspergillus*; fue aislado a partir de desechos orgánicos; propagado y conservado en tubos con medio inclinado de papa dextrosa agar (PDA) durante 72 hrs. a temperatura de 37°C. Después las esporas fueron cosechadas e inoculadas a una concentración de 1×10^{6} esporas por ml de medio basal (59); suplementado con pectina cítrica al 1%.

MEDIOS DE CULTIVO

El medio basal está constituido por K_2HPO_4 y KH_2PO_4 etc. grado reactivo (J T Baker Analyzed, México) a una concentración final de 0.2% (59); al medio se le adiciona la fuente de carbono deseada.

Se usan diferentes concentraciones de pectina cítrica con 60% de esterificación (0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0%); por otro lado se probaron algunos azúcares como glucosa, fructuosa, sacarosa, ácido galacturónico y ácido poligalacturónico preparados a una concentración final de 1%.

Los reactivos tales como glucosa, fructuosa y sacarosa son grado reactivo (J T Baker Analyzed, México); ácido galacturónico y ácido poligalacturónico grado analítico (Sigma Chemical, Co. USA).

En algunos casos, se usan diferentes concentraciones de sales de potasio (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) como sigue: 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.4% y 0.6%.

El medio fue esterilizado a 121°C y 15 psi de presión durante 20 minutos, esterilizando por separado la fuente de carbono y el medio basal.

La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer con capacidad de 500ml poniendo 200ml de medio a una temperatura de 37°C con agitación constante de 100 r.p.m. en una agitadora G-25 (New Brunswick Sci; USA). En todas las pruebas realizadas el pH inicial (pHi) fue de 2.5

CRECIMIENTO CELULAR

El crecimiento celular fue determinado en miligramos de peso seco de muestras de cultivo tomadas cada 24 hrs, cada muestra se filtró a través de una membrana Millipore de 0.5μm; la biomasa retenida fue secada en estufa a 70°C hasta obtener un peso constante.

AZÚCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores se miden directamente del filtrado libre de células, por el método de DNS, (0.1mL de muestra + 0.9 ml de agua + 2 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS),la cual se pone en ebullición durante 5 minutos, se añaden 5ml de agua destilada y se determina absorbancia a 540 nm (60). Para calcular la concentración de azúcares reductores se utilizó una curva de calibración de ácido galacturónico.

ACTIVIDAD EXOPECTINOLÍTICA

Determinada por la cuantificación de azúcares reductores producidos a partir de pectina utilizada como sustrato. La mezcla de reacción contiene 0.5ml de pectina cítrica con 8.6% de metoxilo al 1% a pH 5.0, 0.4ml de buffer acetatos 0.17 M pH 5.0 y 0.1ml de filtrado enzimático; la mezcla se incuba a 45 C durante 20 minutos, se agregan 2.0ml de DNS y se pone a ebullición durante 5 minutos. Después se lleva a un volumen final de 8ml con agua destilada. La absorbancia es determinada a 540 nm. Los grupos reductores se expresan como mg de ácido galacturónico.

Una unidad (U) de actividad exo-pectinolítica es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de una mol (u)de ácido galacturónico en 20 minutos (U/mgPS).

ACTIVIDAD ENDOPECTINOLÍTICA

La actividad se determina por la reducción de viscosidad de una solución de pectina con 8.6% de metoxilo, usando un viscosímetro Canon-Fenske No.200, la mezcla de reacción contiene 10ml de solución de pectina cítrica al 1% disuelta en buffer acetatos 0.17 M pH 4.2 y 0.5ml de filtrado enzimático. El ensayo se lleva a cabo a 30°C de temperatura.

Una unidad (U) de actividad endopectinolítica se define como la cantidad de enzima que reduce en un 50% la viscosidad de la solución de pectina en 10 minutos (U/mgPS).

DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS

La determinación de los productos de la degradación de pectina y ácido poligalacturónico al 1% se realizó mediante la adición de 5ml de filtrado enzimático libre de células a 25ml de una solución de pectina cítrica o ácido poligalacturónico al 1%. La reacción se llevó a cabo a 45 C de temperatura con agitación constante durante 7hrs., tomando muestra cada hora. A cada muestra se adicionó etanol al 70% y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante, se concentró y se determinaron sus contenidos por cromatografía en placa fina.

PREHIDRÓLISIS DEL SUBSTRATO

Se hace una prefermentacion del sustrato de pectina al 1% durante 24 hrs. con la finalidad de obtener fracciones de pectina mas pequeñas directamente del filtrado y ver si hay un cambio en el crecimiento y actividad pectilolitica. Se usa medio de pectina cítrica al 1% como fuente de carbono, se inocula el medio y a las 24 hrs. de fermentación el medio se filtra con papel filtro Watman No.1 quedando libre de células, el filtrado se reinocula con células. La fermentación continúa hasta completar un total de 72 hrs, tomando muestra cada 24 hrs.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado y los resultados se expresan como promedio en las figuras.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

. EFECTO DEL pH INICIAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS Y EL CRECIMIENTO CELULAR

Como es sabido, el pH influye en diversos procesos metabólicos, que son importantes para los procesos fisiológicos celulares. La cepa *Aspergillus MGM-180* en particular, tiene un crecimiento ideal dentro de un rango de pH de 3 a 9, mientras que a pH menores y/o mayores su desarrollo celular es muy limitado. Sin embargo, produce pectinasas extracelulares a un pH ácido de 2.5. Por esta razón se evaluó el efecto de pH inicial (pHi) del medio de cultivo en el desarrollo y producción de pectinasas extracelulares utilizando como fuente de carbono pectina cítrica. Los diferentes pH's que se analizaron son pH inicial de 2.5 y pH inicial de 3.0, (Fig 3).

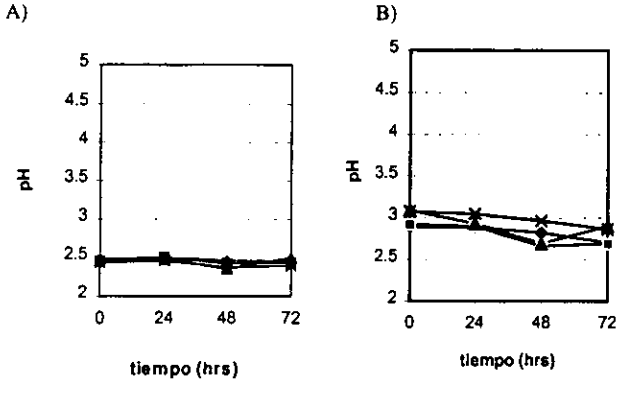

Figura 3. Cambios en el pH durante el crecimiento *Aspergillus MGM-180* a diferentes concentraciones de pectina a pH inicial de 2.5 (A) y de 3 (B). Pectina a 0.5% (◊); 1.0% (□); 1.5% (▲) y 2.0% (×).

El pH inicial de 3.0 no mostró estabilidad durante la fermentación pues entre más tiempo transcurre, el pH va en descenso llagando a pH's de 2.7 a 2.8, al finalizar la fermentación. Mientras que el pHi 2.5, se mantiene con menos fluctuaciones; al término de la fermentación teniendo un pH final que se encuentra entre 2.38 y 2.51.

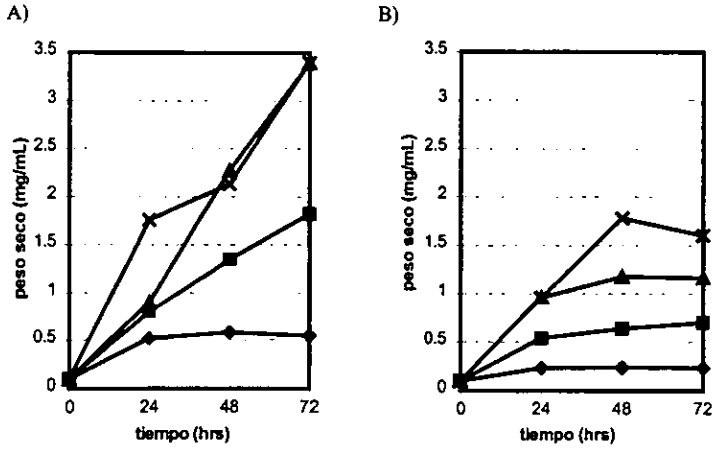

Figura 4. Crecimiento celular mostrado para las fermentaciones a pH 3.0 A) y pH 2.5 B), teniendo concentraciones de pectina cítrica de 0.5% (◇); 1.0% (□); 1.5% (△) y 2.0% (×).

En la fermentación a pH de 3 *Aspergillus MGM-180* tuvo un crecimiento celular máximo a las 72 hrs. con una concentración de pectina de 0.5% mientras que a concentraciones de pectina de 1.0% y 1.5% el crecimiento fué de 50% y 15% respectivamente. Por otro lado, a pH inicial de 2.5 el mayor crecimiento celular fué solamente del 45% en relación al 100% de pH 3. Esto se da a una concentración de pectina del 2% a las 72 hrs, como vemos el crecimiento celular disminuye a medida que la concentración de pectina en el medio es menor, (Fig.4). A pH inicial de 2.5 el menor crecimiento lo tuvimos con pectina al 0.5%.

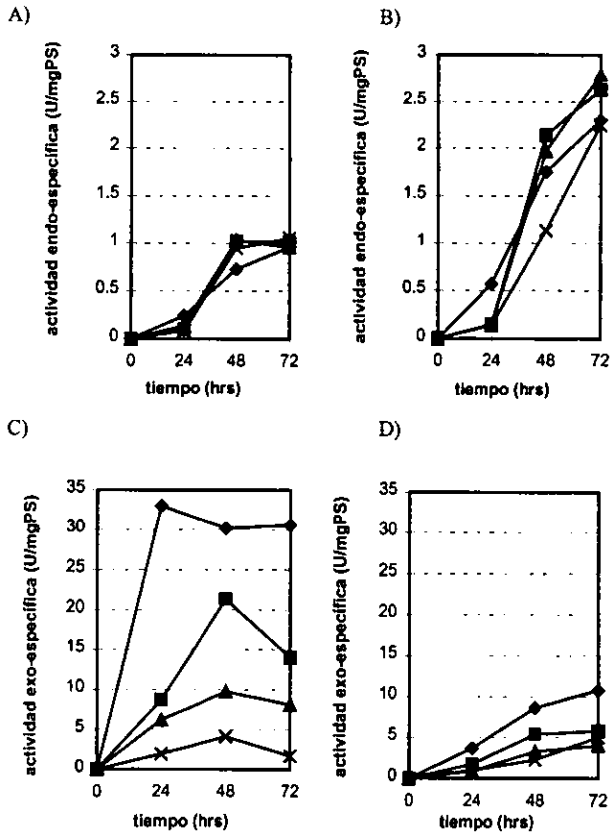

Figura.5. Actividad endo y exo pectinolítica extracelular a pH de 2.5 (A y C) y pH de 3 (B y D) por la cepa *MGM-80* crecida en pectina cítrica como fuente de carbono a diferentes concentraciones; 0.5% (◇); 1.0% (□); 1.5% (△) y 2.0% (×). Los matraces se incubaron a 37°C con agitación de 100rpm.

La actividad endo a pH 3 con diferentes concentraciones de pectina tuvo un comportamiento muy similar durante las 72 hrs. de fermentación, aunque a las 48 hrs. con pectina al 0.5% se observó que la actividad es menor en un 25% con respecto a las demás, (Fig 5A). Esta actividad es 2.5 veces menor que a pH 2.5 en el que la mayor actividad endo se tiene a una concentración de pectina de 1.5%. En este pH la actividad mas baja durante toda la fermentación fue con pectina al 2.0% siendo màs evidente a las

48 hrs. de fermentación, (Fig. 5B)mientras que a pH 3 después de la 48 hrs de fermentación la concentración con más actividad fue a 2.0%. Como podemos observar se tuvo mayor actividad de tipo endo a pH 2.5, a concentraciones de pectina arriba de 1.0%.

En cuanto a la actividad de tipo exo, a pH 3 se tuvo que a medida que se disminuye la concentración de pectina hay más actividad. Como vemos, durante toda la fermentación hay una actividad del 100% con pectina al 0.5%. Así mismo, a pH 2.5 también tuvimos este comportamiento pero la actividad exo fúe del 33% en relación al 100% de pH 3, (Fig.5 C y D).

Así, encontramos que los medios que tuvieron concentraciones pequeñas de sustrato (pectina al 0.5%) tuvieron mayor actividad. Es importante señalar que a pH 2.5 hubo una actividad de tipo exo que alcanza el 33% con respecto a pH 3 en condiciones a las que prácticamente no hay crecimiento.

En algunos trabajos reportados (58), se ha visto que a pH inicial arriba de 3.5 la actividad endo-pectinasa no se presenta.

La mayor secreción de tipo endo se obtuvo a una concentración de pectina de 1.5% a pH 2.5 teniendo una secreción de 2.6 veces mayor en relación a pH 3; con pectina al 2.0% la secreción es de 2 veces mayor. Sin embargo, el crecimiento celular aumentó a pH 2.5 por lo que al comparar las actividades específicas en cada caso, se observa que la mayor actividad se tuvo a menor concentración de fuente de carbono (0.05%), (Fig 5). Esto indica que la producción enzimática es sensible a represión catabólica por la fuente de carbono. Lo que ocasiona que la velocidad relativa de síntesis sea mayor en la menor concentración de sustrato.

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE POTASIO

Las sales minerales tales como el nitrógeno y el potasio, juegan un papel importante en la producción enzimática así como en el crecimiento de los microorganismos. Se probaron diferentes concentraciones de sales de potasio (0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.4% y 0.6%), para evaluar su efecto sobre la síntesis de pectinasas extracelulares; el microorganismo crece en medio a pH inicial de 2.5.

El pH no tuvo variación a medida que transcurre la fermentación. Por otro lado, el crecimiento celular se vió afectado a diferentes concentraciones de potasio, en las 24 hrs de fermentación, a todas las concentraciones de sales de potasio el crecimiento se encontró entre 0.42 y 0.56 mg/ml. Sin embargo, a tiempos más largos el mayor crecimiento se obtuvo a 0.6 % de potasio. A las 48hrs de fermentación el crecimiento fue muy variado, el menor crecimiento fue a 0.15% de potasio El crecimiento más bajo que se tuvo fue a una concentración de 0.2% de potasio a las 72 hrs. Este efecto es más evidente a las 48 hrs. de crecimiento, (Fig 6).

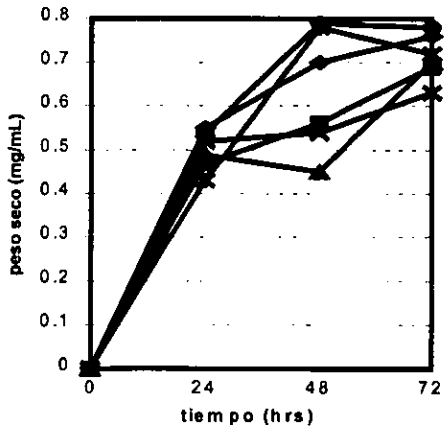

Figura 6. Crecimiento de la cepa *MGM-180* en medio con pectina cítrica como fuente de carbono y, diferentes concetraciones de sales de potasio 0.05% (◇); 0.1% (□); 0.15% (△); 0.2% (×); 0.4% (✱) y 0.6% (○). Los matraces fueron incubados a 37 C y agitación de 100rpm.

En cuanto a la actividad de tipo exo, observamos que con una concentración de potasio de 0.05% hubo mayor actividad durante toda la fermentación. La secreción de actividad a las 48 hrs. para todas las concentraciones de potasio se encontraron entre 13.5 y 17.5 U/ml, (Fig. 7A). Por otro lado, para la actividad de tipo endo la mayor secreción durante las 24 hrs. tuvimos a concentración de potasio de 0.1% y, posteriormente la mayor secreción se obtuvo con una concentración de 0.05% de potasio manteniéndose hasta las 72 hrs. de fermentación, (Fig. 7B). Podemos observar que la concentración de potasio en el medio afectó a la actividad exo y endo de diferente manera, sin embargo, a concentraciones de potasio de 0.05% tuvimos mayor actividad exo y endo.

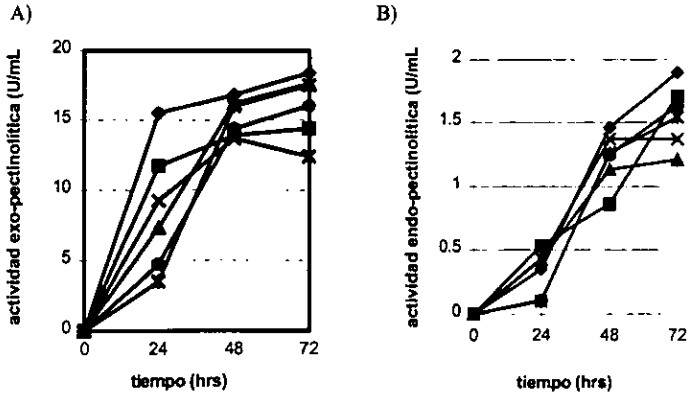

Figura 7. Actividad pectinolítica extracelular (A exo y B endo), producida por la cepa de *Aspergillus MGM-180* crecida en un medio de pectina cítrica como fuente de carbono a diferentes concentraciones de sales de potasio; 0.05% (◊); 0.1% (□); 0.15% (Δ); 0.2% (×); 0.4% (✱) y 0.6% (○).

La producción de exo-pectinasas estuvo muy ligada a la concentración de potasio particularmente a tiempos cortos en el que el efecto de estos iones es muy evidente favoreciéndose la producción de esta actividad a baja concentración de potasio. Con tiempos más largos las diferencias fueron menores pero siguen siendo notables. El efecto del potasio sobre la actividad endo fue menos evidente que para la exo-PG (Fig. 7A y B).

En virtud de las diferencias en crecimiento y actividad de *Aspergillus MGM-180* calculamos la actividad especifica tanto exo como endo, (Fig. 8A y B).

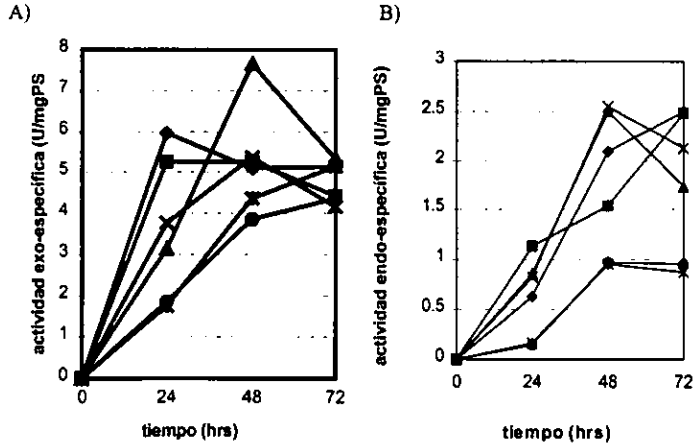

Figura 8. Actividad especifica (A y B), presentes en los filtrados celulares de *Aspergillus MGM-180* cultivado en medio con pectina cítrica como fuente de carbono y diferentes concentraciones de sales de potasio: 0.05% (◇); 0.1% (□); 0.15% (△); 0.2% (×); 0.4% (✱) y 0.6% (○).

Como se muestra en la Fig.8, el comportamiento de la actividad especifica tanto de tipo exo y endo mostraron el mismo comportamiento con concentraciones de potasio de 0.05% siendo la concentración con mayor actividad. Mientras que a concentraciones arriba de 0.4% la actividad exo y endo fueron las menores.

INFLUENCIA DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PECTINASAS EXTRACELULARES

Algunas cepas del género *Aspergillus* son buenas productoras de enzimas (amilasas, xilanasas, lipasas,celulasas, pectinasas, etc), cuando se usan diferentes azúcares simples como fuentes de carbono. Al agregar uno o varios de estos nutrientes al medio el organismo los puede asimilar con facilidad. Estas fuentes pueden ser, glucosa, fructuosa, galactosa, sacarosa, etc. Por lo que se requería producir pectinasa para crecer y si produjera se podría decir que son constitutivas.

Con el fin de evaluar si *Aspergillus MGM-180* produce pectinasa en forma constitutiva y tiene un crecimiento celular satisfactorio se utilizaron varias fuentes de carbono (glucosa, fructuosa, sacarosa, ácido galacturonico (AG) y ácido poligalacturonico (APG), azúcares simples fácilmente asimilables para el microorganismo. Todos a una concentración de 1% para su crecimiento.

En pH inicial de 2.5; al transcurrir la fermentación no hubo variación significativa, su crecimiento celular fue muy incipiente (Fig 9). Empleando productos de la degradación de pectina como sustrato, ácido poligalacturonico (APG) y ácido galacturonico (AG), el crecimiento fue muy variable , su estimulación se vió reflejada al usar APG como fuente de carbono con un crecimiento de 1.9 mg/ml mientas que, al usar AG apenas es de 0.23mg/ml. *Aspergillus MGM-180* creció poco, sólo una sexta

parte con respecto al medio de pectina cuando glucosa, fructuosa o sacarosa son empleadas como fuentes de carbono, en general son fuentes fácilmente asimilables .(Fig. 9)

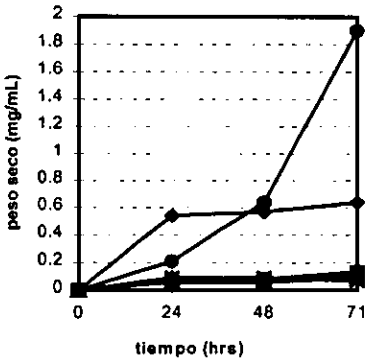

Figura 9. Crecimiento celular de *Aspergillus MGM-180* con diferentes fuentes de carbono tales como: pectina cítrica 8.6% de metoxilo (◇); glucosa (□); sacarosa (△); fructuosa (×); ácido galacturónico (✱) y ácido poligalacturónico (○). Todas se encuentran a una concentración en el medio de 1%.

Por otro lado, los azúcares reductores fueron consumidos muy pobremente como consecuencia del bajo crecimiento (Fig 10), en los medios con glucosa, fructuosa y ácido galacturónico. No así, los medios que contienen pectina cítrica, sacarosa y APG, en estos se van acumulando grupos reductores a medida que transcurre la fermentación. Al usar fuentes de carbono tales como sacarosa, pectina y APG éstas últimas, para entrar a la célula se tienen que hidrolizar previamente por lo que los azúcares producidos por la hidrólisis pueden ser asimilados por el organismo. Se llevó a cabo una proceso de hidrólisis en el que los azúcares son generados y, posteriormente fueron fácilmente asimilados por la cepa *MGM-180*.

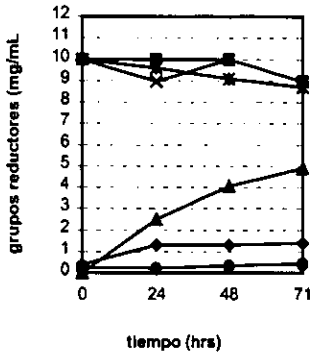

Figura 10. Grupos reductores de diferentes fuentes de carbono por *Aspergillus MGM-180* tales como: pectina cítrica (◆); glucosa (▫); sacarosa (▲); fructuosa (×);- ácido galacturónico (✱) y ácido poligalacturónico (○); todos al 1% en el medio.

Ahora bien, la actividad exo-pectinasa se presentó únicamente con pectina cítrica, (Fig 11), y la actividad endo-pectinasa no es significativa para ningún azúcar simple, el consumo de carbono en ellos es nulo, mientras que con productos de degradación de pectina tales como APG y AG, es apenas del 10%. Esto nos habla de que la cepa *MGM-180* no produce actividad endo-pectinasa ni exo-pectinasa en medio con azúcares simples usados como fuentes de carbono.

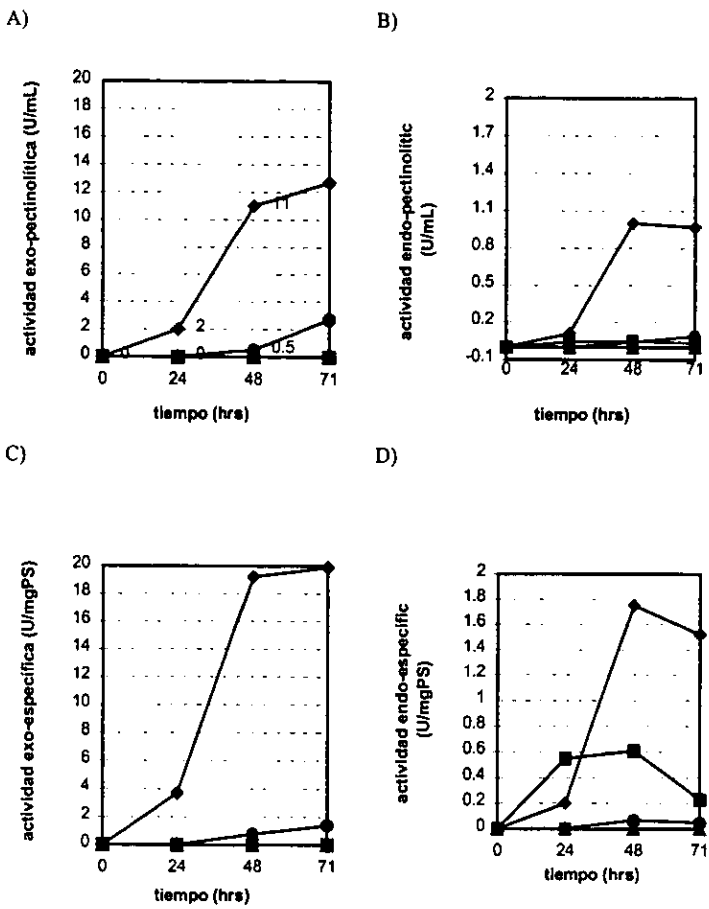

Figura 11. Actividad pectinolítica (A y B) y actividad específica (C y D), obtenida de *Aspergillus MGM-180* crecido en diferentes fuentes de carbono en el medio de fermentación tales como: pectina cítrica 8.6% de metoxilo (◇); glucosa (□); sacarosa (△); fructuosa (✕); ácido galacturónico (✱) y ácido poligalacturónico (○); todos al 1% de concentración en el medio.

. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO ADICIONADAS CON EXTRACTO DE LEVADURA AL 0.3% COMO NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

En virtud de que al utilizar azúcares sencillos la cepa crece poco; se probó medio de extracto de levadura al 0.3% el crecimiento y peso de pectina en estos azúcares. De forma que se evaluó el crecimiento de *Aspergillus MGM-180* en fructuosa, sacarosa, glucosa y AG, teniendo una concentración en el medio de 1%; adicionando el medio con extracto de levadura al 0.3% con la finalidad de brindar un medio más rico en nutrientes.

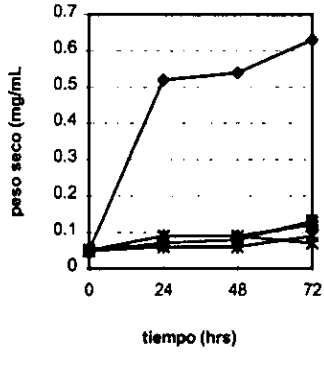

Figura 12. Crecimiento celular de *Aspergillus MGM-180* en fermentación con diferentes sustratos como fuentes de carbono adicionados con extracto de levadura al 0.3%; pectina cítrica al 1% (◇); glucosa (□); sacarosa (△); fructuosa (×) y ácido galacturónico (AG) (✱); todos a una concentración de 1%.

La cepa *MGM-180* tuvo un crecimiento muy similar a pesar de ser adicionada con extracto de levadura (Fig 12). El pHi en todos los casos varia entre 2.34 como mínimo y 2.65 como máximo. El único caso en el que se observó un cambio, fue cuando se utilizó AG en donde el pH aumento hasta valores de alrededor de 6.5.

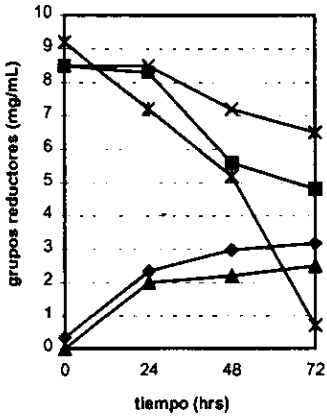

Figura 13. Grupos reductores de diferentes fuentes de carbono adicionados con extracto de levadura al 0.3% por Aspergillus *MGM-180* tales como: pectina cítrica (◇); glucosa (□); sacarosa (△); fructuosa (×) y ácido galacturónico (AG) (✱); todos a una concentración de 1%.

Cuando se emplea APG como fuente de carbono sin extracto de levadura, el crecimiento celular se triplica comparativamente a lo que ocurre con pectina cítrica; con AG-levadura solo tenemos el 12.43%.

Por otra parte, el alto índice de reductores al iniciar la fermentación para glucosa, fructuosa y AG es consumido progresivamente llegando casi a su término a las 72 hrs. Comparativamente la actividad exo-pectinasa que se obtuvo con los medios de glucosa y fructuosa es de 37.3% y 69.75% respectivamente, (Fig 14).

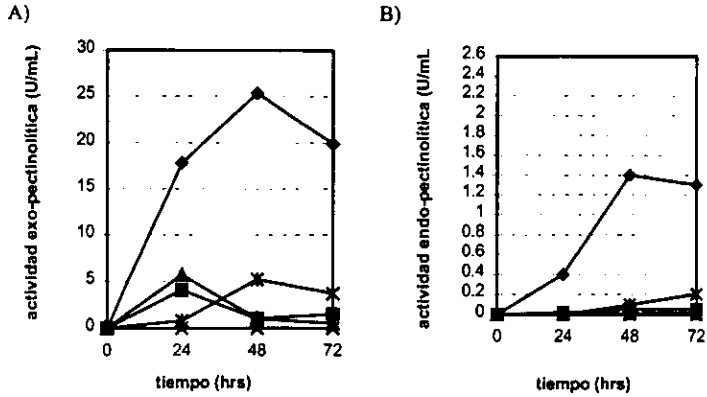

Figura 14. Producción comparativa de actividad pectinolítica extracelular partir de diferentes fuentes de carbono adicionados con extracto de levadura al 0.3% en agitación. Pectina cítrica (◊); glucosa (□),sacarosa (Δ), fructuosa (x) y AG (✱).

No hubo actividad endo-pectinolítica usando en el medio azúcares sencillos. Con AG la actividad exo-pectinasa alcanzó su máximo a las 48 hrs con un rendimiento de 184.86% con respecto a pectina cítrica al 1%.

OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS

La probabilidad de que los inductores directos de muchas enzimas que degradan polisacaridos sean productos intermedios de la degradación de esta macromolécula es muy alta, por lo cual la evolución del crecimiento de *Asperguillus MGM 180* en monómeros, dímeros y trímeros derivados de las substancias pécticas es importante y nos puede dar información más específica de las moleculas responsables de la inducción directa de las diferentes pectinasas de esta cepa. Sin embargo, dado que no se dispone comercialmente de estos derivados con excepción del monómero, se hace necesario obtenerlos a partir de substancias pécticas. Para lo cual se evalúo el proceso de hidrólisis de pectina cítrica al 1% con el fin de obtener los productos de su degradación tales como monómeros, dímeros y/o trímeros (Fig 15).

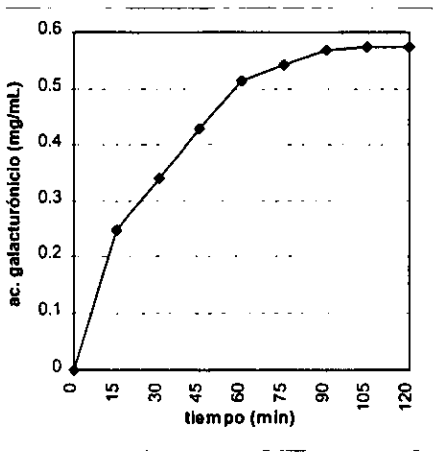

Figura 15. Cinética de la hidrólisis de pectina cítrica al 1%, medida como ácido galacturónico en el medio manteniendo temperatura a 45°C.

A medida que transcurre el proceso de hidrólisis de pectina cítrica, hubo más grupos reductores alcanzando un máximo alrededor de los 90 min. Las muestras de hidrólisis se aplicaron junto con los estándares de AG y APG a una concentración de 0.1% en placa de silica gel-25 para desarrollar la técnica de cromatografía en placa fina. Al revelar la placa no se observaron productos semejantes a los esperados.

Por otro lado se realizó el poceso de hidrólisis para APG a una concentración de 1%, con el fin de que la enzima (filtrado enzimático) actúe sobre el sustrato fragmentando la molécula en forma endo/exo para tener unidades más pequeñas. Los grupos reductores fueron en aumento durante la digestión (Fig 16).

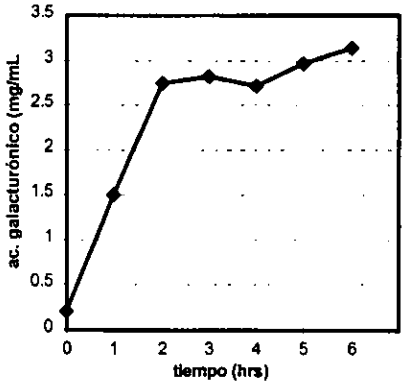

Figura 16. Producto de la hidrólisis de ac. Poligalacturónico (APG) al 1% medido como ac. Galacturónico en el medio. La temperatura del medio se mantiene a 45°C.

A partir de la tercera hora de digestión los grupos reductores presentes se mantuvieron hasta la quinta hora, en la que la acumulación de reductores se fue incrementando gradualmente hasta llegar a 3.2 mg/mL a las 7 horas.

Durante las seis primeras horas de digestión, los productos derivados de ella tuvieron un Rf de 0.6 comparativamente con los estándares de AG 0.1% muestra un Rf de 0.7 respectivamente. Se considera que los productos que se obtuvieron podrían ser dímeros ya que el Rf obtenido es similar al obtenido para éste tipo de moléculas (61). La muestra obtenida en la última hora de digestión tuvo Rf de 0.64 (Fig 17A).

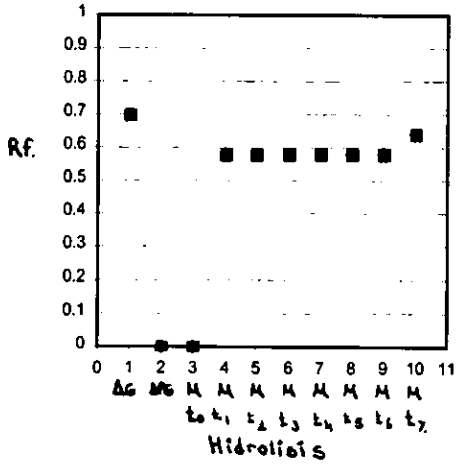

Figura 17. Cromatografía en placa fina de los productos de hidrólisis de ácido poligalacturónico (APG) al 1% por *Aspergillus MGM-180* a 45°C de temperatura. Cromatograma de las siguientes muestras: estándar de ácido galacturónico (AG) a 0.1% de concentración 1); ácido poligalacturónico (APG) a 0.1% de concentración 2); muestra de hidrólisis de ácido poligalacturonico al 1% inicial (tiempo cero de hidrólisis), 3); muestra a 15min. de hidrólisis 4); muestra a 30min. 5); muestra a 45min. 6); muestra a 60min. 7); muestra a 75min. 8); muestra a 90min. 9), y muestra a los 105min.de hidrólisis 10).

Se presume que la digestión de APG al 1% presenta dímeros de ácido galacturónico pues, la distancia de migración de las muestras comparativamente con el estándar de AG al 0.1% tienen Rf de 0.6 y 0.65 respectivamente. El ácido poligalacturónico como tal no migra en la cromatografía; así el Rf del monómero es de 0.7 y la concentración de pectina es de 0.05% es de 0.4. Con estos datos se puede inferir que los polimeros de ácido poligalacturonico son degradados por hidrólisis enzimatica de *Aspergillus MGM-180* obteniendo como resultado moléculas más pequeñas de ácido galacturónico. Con este sustrato se podrá evaluar la actividad pectinolítica de manera directa.

PREFERMENTACIÓN

Como una alternativa para saber si los productos que se producen en el medio durante las primeras horas de fermentación ejercen una acción de inducción sobre las enzimas pectinolíticas, se realizaron una serie de experimentos preliminares utilizando una prefermentación. Esta consistió en crecer al microorganismo durante 24 hrs al cabo de las cuales el medio de cultivo se recupera separando las células por filtración y el medio filtrado libre de células se ùtiliza como medio de cultivo inicial adicionando una suspensión de esporas recientemente colectadas y reiniciando la fermentación. Por otro lado las células colectadas se lavaron exhaustivamente con solución salina y fueron reinoculadas en medio fresco no tratado.

Con el medio recuperado y parcialmente digerido por efecto de la prefermentación se logró un incremento en el crecimiento celular en un 10% a las 48 hrs en relación a un cultivo control. En cuanto a la producción de pectinasas se obtuvo un incremento del mismo orden de magnitud que el crecimiento por lo que la actividad específica se conservó en niveles semejantes al control. Esto indica que la degradación parcial del substrato no es la única condición para que se presente la inducción del sistema pectinolítico de éste microorganismo. Por otro lado, con las células (micelio) reinoculadas en medio fresco, las actividades específicas exo y endo se incrementaron en un 30% por lo que suponemos que el micelio ya inducido por un crecimiento previo

en pectina ha producido ya las enzimas necesarias para la digestión rápida de la pectina y por lo tanto su crecimiento es más acelerado así como la producción del complejo enzimático pectinolítico.

En otro orden de ideas, y dado que la pectina presenta diferentes grados de esterificación con el metanol y éste al ser liberado por digestión de la pectina puede influir en el crecimiento y/o la actividad enzimática, se realizaron pruebas adicionando metanol al medio de cultivo con pectina asi como evaluando si en microorganismo podría utilizar al metanol como única fuente de carbono. El crecimieento y la actividad no se vieron afectados por la presencia de metanol en el medio cuando la pectina estuvo presente y no hubo crecimiento en el medio de metanol solo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

V.- DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados muestran que *Aspergillus MGM-180* es capaz de crecer y de presentar actividad pectinolítica extracelular a un pH de 2.5, lo cual no es muy común en la mayoría de los microorganismos. *Aspergillus MGM-180* mostró capacidad para adaptarse a condiciones extremas en el medio. El pH del medio para iniciar la fermentación fue de 2.5, favorable para la producción de actividad exo y endo-pectinolítica, en el cual estas enzimas de tipo hidrolítico se producen con buen rendimiento, es de importancia hacer notorio que el crecimiento de la cepa es muy limitado en este pH.

Las investigaciones que se han hecho a este respecto son pocas, aunque ya se esta tomando en cuenta la importancia que tiene el que un organismo produzca actividad en pH's extremos, ya que en la industria de los alimentos, sobre todo en la preparación de jugos, el rango de pH que se necesita para su preparación es bajo. Aunque la mayoría de las cepas comerciales usadas en la industria alimenticia pertenecen al género *Aspergillus*, la cepa *MGM-180* supera la producción enzimática de éstas en un amplio margen.

Al ser analizada la producción de actividad pectinolítica extracelular en azúcares sencillos probados como fuente de carbono, no se presento la actividad exo-pectinolítica ni endo en ninguno de los azúcares usados. Las enzimas de tipo exo permíte que el microorganismo tenga rápido acceso al sustrato, degradarlo para que los inductores actúen en la producción de las otras enzimas pectinolíticas.

Se ha comprobado que *Aspergillus MGM-180* produce aparte de pectinasas de tipo exo y endo, pectin-liasas y pectin-esterasas (58). Su secreción es ideal a pH de 3 a 4; a pH de 3 con una concentración de pectina cítrica en el medio de 1% en las primeras 24 hrs. hay cinco veces más enzima, por otro lado el crecimiento celular también es mayor, más del doble.

Es importante dar mencionar que este tipo de enzimas son específicas de APG (17). Con el análisis en cromatografía en placa fina que se realizó, usando filtrado enzimático para degradar APG, se puede ver que los productos de esta degradación desde, los primeros minutos fueron productos poco más pequeños que APG. Sin embargo, se puede decir que los productos de hidrólisis de pectina cítrica al 1% son moléculas que si bien no son AG, son unidades muy similares.

Por otro lado, el grado de esterificación del sustrato (pectina cítrica) influye sobre la actividad específica ya que la producción de actividad de liasas y endo pectinasas tiene su máximo con pectinas de alto grado de esterificación (57). En este trabajo no se evaluó esta característica, pues solamente se utilizó pectina cítrica de 8.6% de metoxilación. Con este substrato la actividad endo-pectinolítica no es significativa aún usando diferentes concentraciones de dicho substrato y, diferentes substratos. De acuerdo a los reportes citados en la bibliografía (17), las endo pectinasas hidrolíticas que actúan sobre pectina no se han reportado. Por otra parte, las pectinasas de tipo exo se producen con substratos de bajo grado de esterificación.

Se ha evaluado la producción de pectinasas utilizando cultivos con fermentación alimentada en lote con limitación de nutrientes (30). El efecto de los productos de degradación sobre la producción de estas enzimas puede ser determinante. Se probaron diferentes concentraciones de pectina cítrica utilizada como fuente de carbono para, evaluar sus efectos sobre la producción de pectinasas, así como diferentes concentraciones de potasio, todo ello creciendo el microorganismo a pHi de 2.5. Los resultados muestran que en la secreción, tanto la actividad exo como la actividad endo-pectinolítica se incrementan a medida que se aumenta la concentración de pectina en el medio. La mayor secreción se obtiene a una concentración de pectina cítrica de 1.5% a las 48 hrs. Comparando las actividades específicas en cada caso se observa que la mayor actividad específica se obtiene con la menor concentración de pectina (0.5%) cuya actividad es de 180%. Esto nos da una pauta a pensar que la producción es sensible a represión catabólica por la fuente de carbono. Así mismo, la velocidad de síntesis es mayor cuando hay menos pectina. Se ha reportado (30) que cuando el medio esta limitado de pectina se tiene un rendimiento de grupos reductores del 249% producido por *Aspergillus sp.*

Resulta evidente que al aumentar la concentración de fuente de carbono hay una represión catabólica en el sistema. Se estima que la concentración más favorable para obtener mayor rendimiento en la secreción de pectinasas es de 0.05% a tiempos cortos de 24 hrs.

En cuanto a la concentración de potasio se evaluaron aquellas que van de 0.05% a 0.6%. No se encontraron diferencias entre 0.4% y 0.6% en la actividad específica. Sin embargo, la actividad se incrementa a medida que la concentración disminuye por debajo de 0.2% en las primeras horas de fermentación, obteniéndose la máxima secreción con 0.05% de potasio en el medio. Se ha determinado que al combinar sales como sulfato de amonio y fosfato de potasio obtenía mayor actividad exopectinolítica.(7). Los resultados que se tienen al variar las concentraciones de sales indica que, la concentración de iones fosfato tienen efecto sobre la producción de actividad medida por reductores , incrementándose a medida que la concentración de sales disminuye. De acuerdo a los resultados obtenidos, al probar diferentes concentraciones de potasio en el medio, el crecimiento no varia.

Con el objeto de ver si *Aspergillus MGM-180* produce pectinasas en forma constitutiva se utilizan diferentes fuentes de carbono como substrato en el medio, la mayoría de los substratos son azúcares sencillos como glucosa, sacarosa, fructuosa, ácido galacturónico (AG) y ácido poligalacturónico (APG), todas al 1% para su crecimiento. El crecimiento de *Aspergillus MGM-180* fue poco cuando glucosa, sacarosa o fructuosa son utilizadas como fuentes de carbono a pesar de que son en general, fuentes fácilmente asimilables. Con AG se obtuvo un crecimiento muy incipiente y no se detecto actividad exo ni endo pectinolítica, pero con APG el crecimiento fue de 300% manteniéndose el pH en 2.53 y sólo se encontró actividad exo y endo-pectinolítica después de las 48 hrs. de fermentación. Se ha visto que a concentraciones de 0.05% de glucosa en el medio hay represión de la actividad pectinolítica, mientras que a 0.005% si se encuentra actividad. La actividad de tipo exo-pectinasa es inducida por el substrato ya que no se encontró con ningún otro que no fuera pectina.

La velocidad de degradación de las diferentes fuentes de carbono, así como la velocidad de consumo se expresa de diferente manera; en medios con glucosa, fructuosa y AG la fuente de carbono es consumida poco a poco al transcurrir la fermentación, mientras que en medios con pectina cítrica, sacarosa y APG, la fuente comienza a ser degradada por

el microorganismo. Esto es por que dichas fuentes de carbono son moléculas más grandes y, que necesitan ser reducidas para que puedan consumirse. Los azúcares simples son moléculas muy sencillas que no requieren en este caso de degradación.

Para determinar si la escasez de crecimiento se debe a la falta de nutrientes en el medio o bien, a la acción de represión que puede ejercer la fuente de carbono sobre el microorganismo, se adicionó extracto de levadura a los substratos antes mencionados a una concentración de 0.3%. En este sentido, hay más crecimiento aunque sigue siendo limitado. Así encontramos poca actividad exo en los azúcares simples. Podemos decir entonces que la actividad exo pectinasa es cuando menos parcialmente constitutiva ya que se produjo en glucosa y fructuosa. El consumo de la funte de carbono se observa desde las primeras horas para AG mientras que para fructuosa y glucosa comienza en forma a partir de las 24 hrs. Para sacarosa la degradación comienza a minimizarse después de 24 hrs y no tenemos actividad.

Se ha podido demostrar, con este trabajo que las pectinasas extracelulares producidas por *Aspergillus MGM-180*, son sensibles a represión catabólica ejercida por los productos de la degradación de pectina cítrica, y por azúcares simples como glucosa, fructuosa, sacarosa, y ácido galacturónico (ver fig.11). Por otro lado, resulta evidente que al aumentar la concentración de fuente de carbono hay represión catabólica en el sistema. Por ello, se estima que la concentración más favorable para obtener mayor secreción de pectinasas es de 0.5% de pectina.

Las endo-pectinasas secretadas por *Aspergillus MGM-180* no pertenecen al grupo de las enzimas constitutivas pues, requieren de la presencia de pectina para su producción. Sin ambargo, se encontró que la exo-pectinasa es parcialmente constitutiva. El papel que desempeña el ácido galacturónico (producto de la degradación de pectina) es de represor de la actividad pectinolítica de la cepa, aunque los resultados con extracto de levadura sugieren que éste compuesto también participa como inductor de exo-pectinasa.

Por otro lado, es claro que el pH tiene un efecto muy marcado sobre la producción de las pectinasas extracelulares de *Aspergillus MGM-180*. En términos generales, la producción de enzimas de tipo endo pectinasas es la más afectada a pH de 2.5. Para las enzimas de tipo exo pectinasas, su producción no se ve afectada y de hecho es mayor a pH 2.5 que a 3.0. La producción de este tipo de enzimas no sólo depende del pH del medio, también puede ser afectada por el tipo de pectina utilizada como fuente de carbono y particularmente de su grado de esterificación. Esto se ha observado en otros hongos por lo que podemos decir que la inducción de actividad puede estar relacionada a la presencia de derivados metoxilados generados en el medio, pero se requiere hacer más pruebas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, al probar diferentes concentraciones de sales de potasio en el medio, el crecimiento no varía con notoriedad, mientras que al comparar la producción enzimática, esta es mayor a medida que disminuye la concentración de potasio, siendo potasio al 0.05% el que presenta una mayor secreción de enzimas.

VI.-CONCLUSIONES

1.- El pH tuvo un marcado efecto sobre el crecimiento y la producción de pectinasas en *Aspergillus MGM-180*. El crecimiento fue menor a pH de 2.5 mientras que la actividad exo se incrementó de manera notable a ese pH, aproximadamente tres veces y la actividad de tipo endo disminuyó a éste valor de pH.
Los resultados muestran que *Aspergillus MGM-180* es capaz de crecer y producir actividad pectinolítica en pH´s extremos, que podrían ser desfavorables para otros microorganismos.

2.- La concentración de pectina afecta la producción de enzimas y el crecimiento, en la menor concentración de pectina se obtiene la mayor actividad específica, aunque un crecimiento menor. El aumento de la concentración de la fuente de carbono disminuye la producción lo que nos indica la sensibilidad de éstas enzimas a la represión catabólica.

3.- Al utilizar diferentes azúcares como fuente de carbono no se encontró actividad de tipo endo y si se pudo detectar actividad exo-pectinolítica, por ésta razón se puede decir que no hay endo-pectinasas constitutivas y que la exo es parcialmente constitutiva en *Aspergillus MGM-180.*

4.- La mayor actividad enzimática se produjo a una concentración de potasio de 0.05%. Mientras el crecimiento tiende a aumentar conforme aumenta la concentración de potasio en el medio.

VII.-BIBLIOGRAFÍA

1.- Kubicek, C.P. 1981. European Journal Appl. Microbiology Biotecnology. 13:226-231.
2.- Kubicek, C. P. 1987. Journal Gen. Microbiología. 133:1481-1487.
3.- Rombouts, F.M. y Pilnik W. Microbial Enzymes and Bioconversions. 1980. Vol. 5 : 227-272.
4.- Kilara, A. Process Biochemistry. 1982. 17 (4): 35-41.
5.- Beckhorn, E. J., Labbee, M. D. and Uderkofler, L.A. Journal of Agr. Food Chem. 1965. 13:30-36.
6.- Saval, S. and Huitron, C. Developments in Industrial Microbiology. 1983. 24:547-551.
7.- Saval, S., M. Sc. Tesis 1985, Universidad Nacional Autónoma de México.
8.- Tsuyumu, S. Nature. 1977. 269: 237-238.
9.- Perley, A. F. and Page, O. T. Canadian Journal of Microbiology. 1971. 17: 415-420.
10.- Hulme, M. A. and Stranks, D. W. Journal of General Microbiology. 1971. 69:145-155.
11.- Polizeli, T. M. Joao, A. J. and Terenzi F. H. Journal of General. Microbiology. 1991. 137: 1815-1823.
12.- Collmer, A., Whalen, C. H., Beer, S. V. and Bateman, D. F. Journal of Bacteriology. 1982. 626-634.
13.- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Reverchon, S., Condemine, G. and Baudouy, J. R. Journal of General Microbiology. 1986. 132:2099-2106.
14.- Kubicek, C. P., Messner, R. and Kubicek-Pranz, M. Enzyme Microb. Technol. 1993. 15:90-99.
15.- Fonseca, M. J. V. and Said, S. Appl. Microbiology Biotechnology. 1994. 42:32-35.
16.- Fogarty, W.M. and Kelly, C. T. Can. Journal Microbiology. 1978. 24: 1164-1172.
17.- Fogarty, W. M. and Kelly C. T. Microbial Enzymes and Biotechnology. 1983. 131-182.
18.- Whitaker, J. R. Enzyme Microbiology Technology. 1984. 06: 341-349.
19.- Sakamoto, T. et. al. Process Biochemistry. 1995. 30 (5): 403-409.
20.- Thibault and Petit. Industries Alimentaires et. Agricoles. 1979. 18:1231-1240
21.- Rexová-Bencová, L. and Marcovik, D. Adv. Carbohydrate Chem. and Biochem. 1976. 33:323-385.

22.- Snir, R., Koehler P. E. and Wicker, L. Jounal Agric. Food Chem. 1995. 43:1157-1162.
23.- Camperi, S. A. and Cascone, O. Proc. Biochem. 1996. 31 (1):81-87.
24.- Ishii, S. and Yokotsuka, T. Journal Agr. Food Chem. 1972. 20 (4):787-791.
25.- Shanley, N. A. and Coughlan, M. P. Journal of Biotechnology. 1993. 28:199-218.
26.- Ward, O.P. and Moo-Young, M. CRC Critical Reviews in Biotechnology. 1989. 8 (4):237-274.
27.- Fogarty and Ward, O.P. Progress in Industrial Microbiology. 1974. 13:59119.
28.- Larios, G., J. M. García and Huitron. Biotechnology Letters. 1989. 11 (10):729-734.
29.- Call, H. P., Walter, J. and Emeis C. C. Journal of food Biochemistry. 1985. 9:325-348.
30.- Aguilar, G. and Huitron, C. Enzyme Microbiology Technology. 1986. 9:541-545.
31.- Fonseca, M. J. V. and Said, S. Biotechnology Letters. 1991. 13 (1):39-42.
32.- Bussink, H. J. D., Brouwer, K. B., and Visser, J. Current Genetics. 1991. 20:301-307.
33.- Shinmyo, A., Davis, I. K. et. al. European Journal Appl. Microbiology Biotechnology. 1978. 5: 59-68.
34.- Szajer, I. Acta Microbiological Polonica. 1978. 27 (3):237-242.
35.- Deising, H., Frittrang, K. A., Kunz, S. and Mendgen, K. Microbiology. 1995. 141:561-571.
36.- Pilnik, W. and Rombouts, F. M. Enzymes and Food Processing. Applied Science Publishers, LTD. 1981. 6:105-128
37.- Grammp, E. G. Proc. Biochem. 1981. April/May, 24-27.
38.- Kurowski, W. M. and Dunleavy, J. A. European Appl. Microbiology. 1976. 2: 103-112.
39.- Hsu, E. J. and Vaughn, R. H. Journal of Bacteriology, Apr. 1969. 98, (1):172-181.
40.- Matsumura, M., Imanaka, T. and Taguchi H. Ferment. Technol. 1981. 59 (2):115-123.
41.- Leone, G and Van Der Heuvel, J. Canada Journal Botanic 1985 65: 2133-2141.
42.- Verhoeff, K. and Liem, J. I. Phytopathology Z. 1978. 91-110.
43.- Ried, J. L. and Collmen, A. Appl. and Environmental Microbiology. 1986. 52 (2):305-310.
44.- Kozianowski, G. Institute of Microbiology. 1988. 37-39.
45.- Schmidt, O., Angermann, H. and Hoppe, K. Appl. Microbiology Biotechnology. 1995. 43:424-430.
46.- Pereira, S. S., Favela, E. T. and Rojas, G. M. Appl. Microbiology Biotechnology. 1993. 39:36-41.
47.- Saval, S. Solorzano, R. Alpizar, L., Cea, A. and Huitron C. In use of Enzymes in Food Technology, P. Dopa, Ed. Technique et Documentation. 1982. 531-535.

48.- Keen, N. T. and Horton, J. C. Can. Journal. Microbiol. 1966. 12:443-453.
49.- Morán, F., Nosuno S. and Starr, M. P. Arch. Biochem. Biophys 1968. 123-298.
50.- Fiedurek, J., Szczodrak, J. and Rogalski J. Journal of Appl. Microbiology. 1995. 78:409-412.
51.- Friedrich, J., Cimerman, A. and Steiner, W. Appl. Microbiology Biotechnology. 1989. 31:490-494.
52.- Friedrich, J., Cimerman, A. and Steiner, W. International Biotechnology Symposium. 1988.
53.- Siessere, V. and Said, S. Biotechnology Letters. 1989. 11 (5):343-344.
54.- Chapman, S. J. and Lynch J. M. Enzyme Microbiology Technology. 1985. 7:161-163.
55.- Kopecny, J. and Hodrava, B. Letters in Appl. Microbiology. 1995. 20:312-316.
56.- Martindale, C. The Extra Pharmacopoeia. Pharmaceutical Press. 1982. 1136-1141.
57.- Davis, B. D. Tratado de Microbiología. Cuarta adición, Salvat. 1990.
58.- Delgado, L. Tesis de licenciatura, 1993. Universidad Nacional Autónoma de México.
59.- Aguilar, G. and Huitron C. Biotechnology Letters. 1990. 12:655-660.
60.- Miller, L. Annal. Chem. 1959. 31: 426-428.
61.- Kester, H.C. and Visser, J. Biotechnol. Appl. Biochem. 1990. 12 (150-160).