



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN DE XILANASAS POR CEPAS DE *Aspergillus*,
CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN CON ENZIMAS COMERCIALES
PARA SU USO EN PANIFICACIÓN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A
PERLA MARIELA ROSAS GÓMEZ



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

MÉXICO, D.F.,

2006

m.340613



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.

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recreacional.

Perla M. Rosas Gómez

1 de febrero del 2005

Perla M.

E12078.m

Jurado asignado:

Presidente MA. DEL ROCIO SANTILLANA HINOJOSA

Vocal ELPIDIO GARCÍA RAMIREZ

Secretario JOSE GUILLERMO DE J. AGUILAR OSORIO

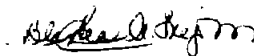
1er suplente FRANCISCO RUIZ TERAN

2º suplente ALFREDO SALAZAR ZAZUETA

Este trabajo se realizó en el Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio.



Asesor: Dr. Jose Guillermo de J. Aguilar Osorio



Asesor técnico: E. Blanca Trejo



Sustentante: Perla Mariela Rosas Gómez

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio. Las pruebas de panificación se realizaron en el Laboratorio de Alimentos.

Este proyecto fue parcialmente financiado por el proyecto DGAPA IN207603 y DGAPA IN219604.

Gracias al jurado integrado por:

Presidente MA. DEL ROCIO SANTILLANA HINOJOSA

Vocal ELPIDIO GARCÍA RAMIREZ

Secretario JOSE GUILLERMO DE J. AGUILAR OSORIO

1er suplente FRANCISCO RUIZ TERAN

2º suplente ALFREDO SALAZAR ZAZUETA

por su rápida evaluación del presente trabajo y sus comentarios.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Guillermo Aguilar y Blanca Trejo por su apoyo y enseñanzas, sin las cuales este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo.

Agradezco a la profesora Graciela Fernández por su amistad y por cuyo entusiasmo permitió tomarle gusto a la Analítica.

Agradezco a mis compañeros de grupo y amigos Elena, Carlos, Karina, Melisa, Irene, Shingú y Lorena por la alegría y continuo aprendizaje que me transmitieron a cada momento.

Agradezco a todos mis amigos de la oficina, ya que al formar una segunda familia en nuestro segundo hogar, fue una de las principales razones por las cuales valió la pena estudiar en esta Universidad.

Agradezco a mis padres y hermanas por su amor, tolerancia y confianza a cada instante.

Finalmente agradezco a mi hijo Daniel, por cuya compañía, luz y sonrisas me han recordado lo hermoso que la vida es.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| • RESUMEN | 1 |
| • INTRODUCCIÓN | 3 |
| • ANTECEDENTES | |
| El género <i>Aspergillus</i> | 5 |
| Polisacáridos de la pared celular de las plantas | 6 |
| Xilanos y xilanasas | 7 |
| Xilano. Estructura y función. | 7 |
| Xilanasas | 11 |
| Distribución de xilanasas | 13 |
| Aplicaciones de las xilanasas | 14 |
| Industria del papel | 14 |
| Mejoramiento de alimentos para animales | 15 |
| Industria de la panificación | 16 |
| Enzimas en la Industria de la panificación | 17 |
| El uso de enzimas en la Industria de la panificación | 18 |
| Amilasas | 18 |
| Proteasas | 20 |
| Xilanasas | 21 |
| Lipasas | 22 |
| Oxidoreductasas | 22 |
| • OBJETIVOS | 24 |
| • HIPÓTESIS | 24 |
| • METODOLOGÍA | |
| Microorganismos | 25 |

| | |
|--|----|
| Crecimiento y actividad de <i>Aspergillus</i> cepa FP-60 y FP-520 en olote de maíz y desechos de tamarindo | 41 |
| Caracterización bioquímica de los filtrados enzimáticos producidos por <i>Aspergillus</i> cepa FP-60 y FP-520 y de las preparaciones comerciales | 42 |
| Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad xilanolítica | 42 |
| Efecto del pH en la actividad y estabilidad xilanolítica | 45 |
| Pruebas de panificación | 50 |
| • CONCLUSIONES | 57 |
| • ANEXO I | 58 |
| • BIBLIOGRAFÍA | 59 |

RESUMEN

Las xilanasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar a los xilanos, los cuales forman parte de las hemicelulosas y están constituidos por residuos de xilosa unidos por enlaces β -(1,4). La importancia de estas enzimas se ha incrementado en los últimos años debido a su aplicación en una variedad de procesos industriales como en la elaboración de alimentos para animales de granja, en la Industria del papel, en la elaboración de bebidas y en panificación entre otras. Las fuentes de estas enzimas son vegetales, animales y microbianas, entre las que destacan de éstos últimos los hongos filamentosos del género *Aspergillus*.

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos en el crecimiento y la producción del sistema xilanólítico, pectinolítico y amilolítico de cuatro cepas de *Aspergillus* crecidos en cuatro distintas fuentes de carbono. Además de la caracterización de cuatro filtrados enzimáticos y de dos preparaciones comerciales y su aplicación en panificación.

La cepa 60, 440, 470 y 520 se hicieron crecer en matraces de 500 mL con diferentes fuentes de xilanos como fuente de carbono: xilanos de abedul, desechos de tamarindo, olote de maíz y salvado de trigo.

La mayor actividad xilanólítica se presentó en olote. La capacidad de producir pectinasas en salvado de trigo y olote es menor que en tamarindo y xilanos de abedul. La actividad amilolítica la mostraron la cepa 60, 440 y 470 solo al usar desechos de tamarindo y la cepa 520 solo al crecer en olote y salvado de trigo.

Con los desechos industriales que resultan de menor costo: olote y desechos de tamarindo, usadas como fuente de carbono, se realizaron fermentaciones; utilizando la cepa que produjo mayor actividad xilanolítica, la 520 (cepa negra) y la cepa 60 (cepa blanca). Fueron caracterizadas bioquímicamente y se obtuvo un perfil de xilanasas con zona de hidrólisis entre 79 y 81 kDa y a 41 kDa para la cepa 60 y con zona de hidrólisis por enzimas de peso molecular mayor a 51 kDa para la cepa 520.

La máxima actividad de los filtrados enzimáticos producidos fue a pH de 4, excepto para el filtrado de la cepa 60 crecida en olote que cambio a 5 y la temperatura de máxima actividad

enzimática fue de 50°C. Las enzimas fueron estables en un rango de pH 3 a 7 durante 24 h a 2°C y a 30°C. La estabilidad térmica se midió a 30, 50 y 77°C para la cepa 60, siendo ésta última la temperatura de menor estabilidad. Y a 30, 50, 77 y 100°C se midió la estabilidad térmica para la cepa 520, disminuyendo la actividad xilanolítica hasta desaparecer al incubar durante 15 minutos a 100°C.

Las enzimas comerciales Harizyme y Ban 800 tuvieron actividad xilanolítica, pectinolítica y amilolítica, mostrando actividad xilanolítica en el gel de actividad "in situ" a 28 kDa y de 24 kDa, respectivamente. La actividad máxima para Ban 800 se obtuvo a un pH de 6 y a una temperatura de 50°C, mientras que para Harizyme fue a un pH de 6 y a 60°C.

En las pruebas de panificación primero se probó la influencia que tenían las harinas con diferente cantidad de xitanos en respuesta al volumen, decidiendo usar la mezcla de harina integral y harina blanca 50/50 (p/p) debido al mayor volumen que se obtuvo en el pan con respecto al uso de harina 100% integral. Al elegir la mezcla, se probaron los filtrados enzimáticos, se compararon con las enzimas comerciales y se elaboraron panes con una adición de 200 ppm (con respecto a Ban 800), resultando los filtrados de las cepas 520 y 60 crecidas en olote las que aumentaron en mayor proporción el volumen del pan. De lo anterior se decidió probar diferentes dosis de enzimas comerciales y filtrados enzimáticos. El máximo incremento de volumen fue del 35% en relación con el control (pan sin enzima) producido por el filtrado de la cepa 60 a 100 ppm y de 32.5% de la preparación de Ban 800 a 200 ppm. Las características sensoriales de los panes muestran que la textura de la miga mejora al adicionar los filtrados enzimáticos obteniendo la mayor calificación de 9 con respecto a las enzimas comerciales. El filtrado de la cepa 520 crecida en olote permite observar mayor homogeneidad en la miga y el color de la corteza a 200 ppm de enzimas adicionadas mejoró con respecto a 100 ppm.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente el principal objetivo del cultivo masivo de la tierra, ha sido la producción de más y mejores alimentos. Sin embargo, en estos días no se pueden enfocar los esfuerzos solamente en la producción de alimentos, si no también en la utilización de los residuos generados después de su procesamiento.

En este contexto, la industrialización de alimentos genera desechos que bien pueden aprovecharse vía microbiana para la producción de productos de alto valor agregado, éste es el caso de las enzimas. Entre las enzimas de interés se encuentran las xilanasas, así como también las que degradan polisacáridos complejos como son: el xiloglucano y el ramnogalacturonano además de la pectina, hemicelulosa y celulosa provenientes de la pared celular de plantas. Estas enzimas pueden ser producidas por bacterias, levaduras, hongos, protozoarios, insectos, nemátodos y plantas, con el fin de degradar dichos polisacáridos.

Al respecto y con propósitos de uso industrial, los hongos son preferidos por que en un 90% las enzimas pueden ser excretadas al medio de cultivo. Específicamente el género *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Trichoderma* son la principales fuentes para la producción de sistemas enzimáticos que degraden polisacáridos de la pared celular de plantas.

Se ha reportado que la síntesis de estas enzimas se ve fuertemente influenciadas por los componentes presentes en el medio de cultivo, particularmente por la fuente de carbono. Otro factor importante para la síntesis de estas enzimas es la presencia de inductores en el medio.

Enzimas como las xilanasas son de interés debido a los resultados que muestran en la industria de la panificación. Los pentosanos o hemicelulosas, constituyentes de algo más del 3% del total de los polisacáridos presentes en las harinas de trigo tienen la capacidad de absorber agua en cantidades superiores a 10 veces su propio peso (Morales, 1999). Su contenido afecta de gran forma las propiedades reológicas de la masa de la harina de trigo y las características de productos de panificación.

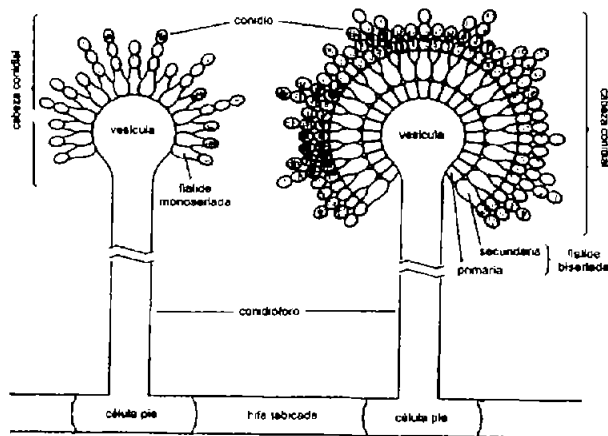
El uso cuidadoso de xilanasas puede mejorar algunas características del pan, como el color de la corteza y el volumen de la hogaza, sin embargo, un tratamiento de la masa con niveles excesivos de xilanasas produce masa húmeda y pegajosa.

ANTECEDENTES

El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece al grupo de los ascomycetes y es considerado un hongo imperfecto por su forma de reproducción asexual, mediante estructuras llamadas conidios. Los miembros de este género presentan hifas tabicadas, hialinas y muy ramificadas, sus células son haploides y multinucleadas (Figura 1).

Figura 1. Morfología microscópica de *Aspergillus* spp



Este género está constituido por numerosas especies, Mendicuti (1996) ha reconocido 132 especies y 18 variedades, muchas de las cuales son de gran importancia en las actividades humanas. Presenta una amplia distribución geográfica, encontrándose desde las regiones árticas hasta el Ecuador. El aire y el suelo de casi cualquier parte del mundo contiene conidios de diferentes especies.

Algunos de éstos hongos son patógenos (por ejemplo: *A. fumigatus*, *A. flavus*, y *A. parasiticus*) y otros son aplicados industrialmente, los más importantes en esta actividad son los hongos negros (*A. niger* y *A. tubigensis*) cuyas características permiten su uso en fermentaciones y en

la obtención por secreción de altas cantidades de proteína. Productos obtenidos de diversas especies han sido clasificados por la legislación estadounidense como GRAS (Generalmente reconocidos como seguros), lo que permite que sean usados en la industria de alimentos, al igual, la gran cantidad de enzimas producidas por *Aspergillus* para la degradación de polisacáridos de la pared celular de plantas son utilizadas en esta industria (de Vries, 2001).

Estos hongos son capaces de asimilar una enorme variedad de sustancias debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas. Es debido a esta variedad de actividades enzimáticas, que muchas especies son utilizadas en procesos industriales para la elaboración comercial de diversos productos como algunos alimentos fermentados; entre ellos la salsa de soya, el tempe y similares elaborados con intervención de *A. oryzae* y *A. tamarii*. Otras aplicaciones son la síntesis de ácidos orgánicos como los ácidos cítrico y glucónico producidos por algunas cepas de *A. niger* y antibióticos. La primera enzima microbiana para uso industrial fue preparada por Takamine, quien desarrollo un proceso para la manufactura de amilasa usando una cepa de *Aspergillus oryzae*. El producto llamado "Taka-diestasa", es utilizada comercialmente todavía (Mendicuti, 1996).

Polsacáridos de la pared celular de plantas

Los polisacáridos de la pared celular de plantas son los componentes orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza. Estos pueden dividirse en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina.

La celulosa representa el mayor constituyente en la pared celular. Consiste en un polímero lineal formado por residuos de D-glucosa unidos por enlaces β -1,4. Se presenta como estructuras ordenadas (fibras), cuya principal función es asegurar la rigidez de la pared celular de plantas.

La hemicelulosa es el segundo heteropolímero más abundante en las paredes vegetales secundarias en general y el más abundante en las paredes primarias de las monocotiledóneas. Las paredes secundarias se forman una vez que la célula ha alcanzado su madurez,

constituida por varias capas de celulosa y hemicelulosa. Las paredes primarias se forman una vez constituidas las células hijas, formada por un retículo denso de microfibrillas de celulosa, pectina y hemicelulosa.

La estructura que forma en su mayoría a la hemicelulosa es el xilano sin embargo, la arabinosa, manosa y galactosa también forman parte de éste.

La pectina es el otro grupo de heteropolisacáridos la cual consiste en una cadena de residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -1,4. En regiones específicas "peludas" el ácido galacturónico es interrumpido por uniones α -1,2 de residuos de L-ramnosa (de Vries, 2001).

Xilanos y xilanasas.

Xilano. Estructura y función.

La hemicelulosa es una familia de polisacáridos no amiláceos que se encuentran en plantas. Dentro de esta familia se encuentran los xilanos, los arabanos, mananos y galactanos. El xilano (Figura 2) un heteropolisacárido que consiste en una cadena principal de residuos de D-xilosil unidos por enlaces β -1,4 (85-93% de la molécula), altamente ramificada: La arabinosa se encuentra unida por enlaces α -(1,2) y α -(1,3) como residuo sencillo o como una pequeña cadena, a la que se encuentra unida una xilosa con un enlace β -(1,2) o una galactosa en posición β -(1,5); esta última también puede estar unida a la xilosa mediante un enlace β -(1,4). Los grupos acetilos se encuentran unidos a la cadena de xilosa en el carbono 2 o 3 por uniones α . El ácido glucurónico y su éter, el 4-O-metilo están unidos, mediante un enlace α -(1,2), mientras que los residuos de los ácidos ferúlico y p-cumárico se encuentran unidos a la arabinosa en el carbono 5 mediante un enlace éster (de Vries, 2001). La frecuencia y composición de las ramificaciones en el xilano dependen de su origen y de su localización (citológica). El homopolímero de xilano, compuesto por xilosa, es difícil de aislar, se ha logrado solo a partir de algunos pastos, tabaco y de la cáscara de la semilla guar (Mendicuti, 1996; Sunna y Antranikian, 1997; Kulkarni *et al.*, 1999).

El xilano acetilado de las maderas duras y el arabinoxilano de las maderas suaves (Figura 3) son los dos tipos de xilano que tienen un sustituyente único de ácido 4-o-metil- α -D-glucurónico, apareciendo de 10 a 18% respecto a los residuos de xilosil, uniéndose al C₂ de residuos xilosil; mientras que los sustituyentes O-acetil y α -L-arabinofuranosil tienden a unirse al C₃. Ninguno de los residuos de xilosil tiene más de una ramificación.

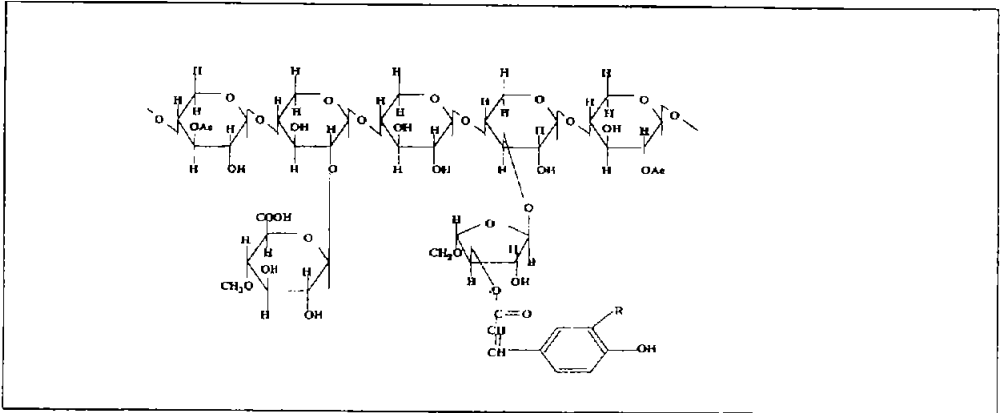


Figura 2. Estructura del xilano de una planta hipotética en donde se muestran los diferentes grupos sustituyentes. Fuente: Modificada de Beg *et al.*, 2001.

Tanto en maderas duras como en las suaves los xilanos tienen un extremo reductor que consiste en un residuo ramnosil, galacturonosil y xilosil. Los xilanos de los pastos, son por lo general arabinoxilanos y algunos xilanos tienen ramificaciones que contienen varias combinaciones de residuos de arabinosil, galactosil, glucuronosil y xilosil (Beg, 2001).

En el caso de xilanos de cereales, éstos están sustituidos por ácido-D-glucurónico y/o 4-O-metil eter y arabinosa. Los arabinoxilanos de plantas endospermas son llamados pentosanos (Kulkarni *et al.*, 1999).

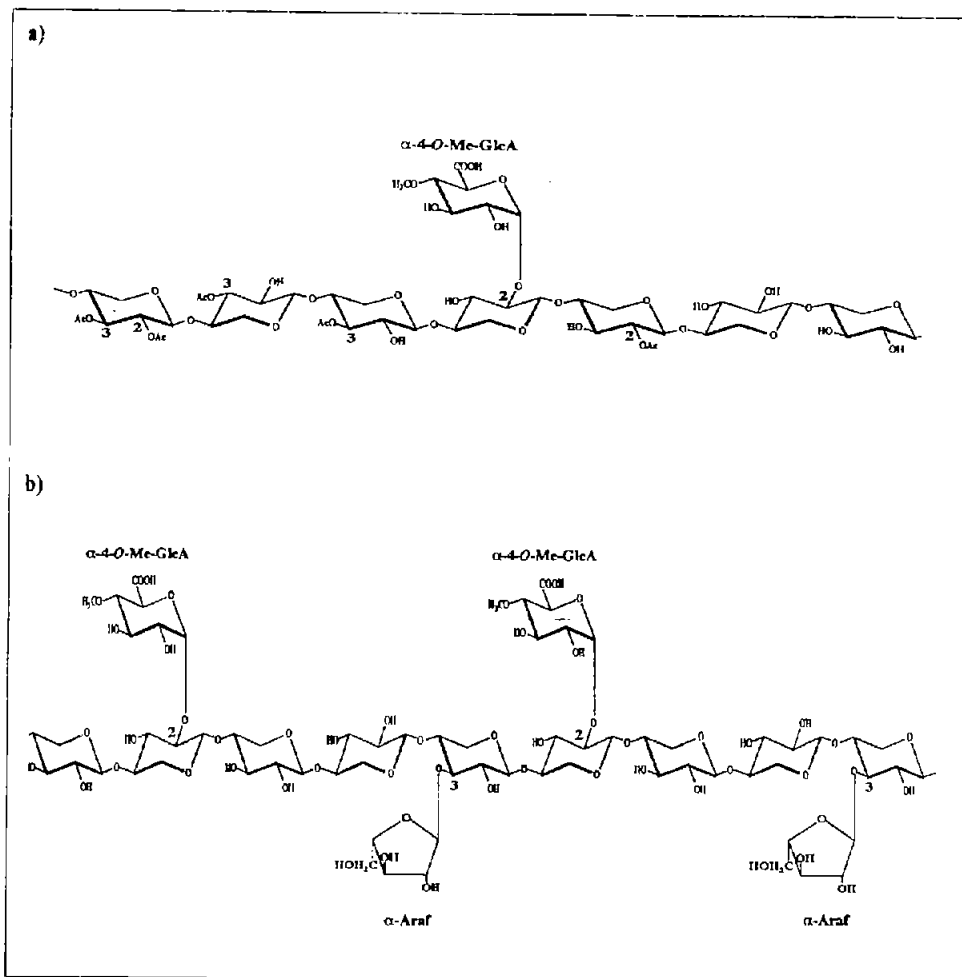


Figura 3. Estructura del xilano de: a) Maderas duras y b) Maderas suaves. Los números indican el átomo de carbono en el cual se está llevando a cabo la sustitución.

Ac: Grupo acetilo, α -4-O-Me-GlcA: ácido α -4-O-metilglucurónico, α -Araf: α -arabinofuranosa,

En la Tabla 1 se presentan diferentes fuentes de xilanos, así como su composición (Mendicuti, 1996).

Tabla 1. Composición de xilanos de diferentes fuentes

| FUENTES | Rha | Ara | Xil | Man | Gal | Glc | AAU |
|---|------|------|------|------|------|------|------|
| Cascarilla de arroz: | | | | | | | |
| Fracción neutral | n.d. | 44.9 | 46.0 | n.d. | 6.1 | 1.9 | 1.1 |
| Fracción ácida | 0.6 | 40.9 | 45.6 | n.d. | 5.9 | n.d. | 7.0 |
| Ojuelas de avena | n.d. | 9.7 | 81.4 | n.d. | 1.1 | 3.4 | 4.3 |
| Trigo | n.d. | 33.5 | 65.8 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | n.d. |
| Lárice | n.d. | 11.4 | 55.6 | n.d. | 3.1 | 25.7 | 4.2 |
| Madera de abedul | n.d. | 1.0 | 89.3 | n.d. | n.d. | 1.4 | 8.3 |
| Madera de abedul (tratada con vapor) | n.d. | 1.0 | 79.2 | 1.2 | 3.7 | 3.6 | 11.5 |

Abreviaturas: n.d., no detectado; **Rha**, ramnosa; **Ara**, arabinosa; **Xil**, xilosa; **Man**, manosa; **Gal**, galactosa; **Glc**, glucosa; **AAU**, ácido anhidrourónico.

La distribución de los componentes lignocelulósicos a través de la pared celular vegetal depende de las diferentes especies de plantas, de su crecimiento y diferenciación de la misma pared. El xilano aparece como el mayor constituyente de la interfase entre la lignina y otros carbohidratos en la pared celular secundaria en las plantas, en particular con las microfibrillas de celulosa y pectina vía interacción covalente y/o puentes de hidrógeno, lo que hace que los tejidos presenten una gran resistencia mecánica y biológica. Es el principal carbohidrato que compone los complejos fenol-carbohidrato que se han aislado, se encuentra unido covalentemente a los residuos fenólicos vía residuos arabinosil y glucuronosil. El alto contenido fenólico presente en estos complejos muestra que los carbohidratos están unidos a fragmentos de lignina, además esto sugiere que los substituyentes fenólicos también se unen en forma cruzada a las moléculas de xilano, y a éstas con otros polisacáridos.

Se ha sugerido también una posible unión de xilano con sustancias pécticas y en complejos de proteína-glucano-xilano. (Wong, 1988)

El xilano presenta las siguientes propiedades (Bastawde, 1992):

1. Xilanos desacetilados son insolubles en agua, pero solubles en soluciones alcalinas y son fácilmente hidrolizables con ácidos.
2. Xilanos acetilados pueden extraerse con agua caliente y son más solubles en agua.
3. Soluciones de xilanos no reducen al reactivo de Fehling.

4. Soluciones de xilanos muestran una alta rotación óptica negativa $\alpha_D = -78.2$ a 109.5° C .

Xilanasas

Las xilanasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, son producidas por muchos organismos procariotes y eucariotes. Éstas juegan un rol fisiológico importante en los tejidos vegetales, ya que están involucradas en el ablandamiento de frutas, la germinación de las semillas y algunas enzimas microbianas inducen la formación de etileno (Morales, 1999).

Debido a la heterogeneidad de los xilanos, la hidrólisis de éstos requiere la acción de un sistema enzimático complejo, que puede mostrar una acción sinergista entre los componentes de dicho sistema.

Algunas de las enzimas conocidas involucradas en la degradación de xilano son:

β -xilosidasas

Las β -xilosidasas son exoglucosidasas que hidrolizan xilooligosacáridos cortos y xilobiosa de los extremos no reductores para liberar xilosa, siendo la xilobiosa el mejor sustrato: la afinidad de las enzimas hacia los xilooligosacáridos disminuye al aumentar el grado de polimerización. Las β -xilosidasas tienen pesos moleculares de 60-360 KDa, pueden ser mono o diméricas, su actividad es inhibida por su producto de hidrólisis (xilosa). Algunas β -xilosidasas muestran actividad α -arabinofuranosidasa y transferasa. Entre los microorganismos productores de β -xilosidasas se tienen a *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei* y *Penicillium woertmanni* (Sunna y Antranikian, 1997).

α -arabinofuranosidasas

Existen dos tipos de arabinasas, la actividad $\text{exo-}\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidasas que son activas contra el p -nitrofenil- $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranósido y contra los arabinanos ramificados; y las $\text{endo-1,5-}\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidasas que son activas contra los arabinanos lineales. La mayoría de las enzimas degradadoras de arabinanos estudiadas hasta ahora tienen actividad exo . Las arabinofuranosidasas tienen pesos moleculares hasta de 495 kDa y se encuentran en formas mono, di, tetra, hexa y octaméricas. Entre los microorganismos productores de $\text{endo-1,5-}\alpha\text{-L}$ -

arabinofuranosidasas se encuentran *Bacillus subtilis* y *Clostridium felsineum*; mientras que entre los productores de exo- α -L-arabinofuranosidasas se tiene a *Aspergillus niger* (Sunna y Antranikian, 1997).

α -glucuronidasas

Las α -D-glucuronidasas hidrolizan los enlaces α -1,2 entre el ácido glucurónico y los residuos de xilosa en los glucuronxilanos. Estas enzimas solo son activas sobre fragmentos de glucuronxilanos de bajo peso molecular resultantes de la hidrólisis del xilano por la acción de las endoxilasas. La acción de algunas α -glucuronidasas es inhibida por la presencia de grupos acetilo cercanos a los sustituyentes glucuronosilos. El peso molecular de las α -glucuronidasas es mayor a 100 kDa. Entre los microorganismos productores de estas enzimas se tienen a *Agaricus biosporus*, *Aspergillus niger* y *Fibrobacter succinogenes* (Sunna y Antranikian, 1997).

Acetilxilaneesterasas

Las acetilxilaneesterasas retiran los sustituyentes O-acetil de las posiciones C-2 y C-3 de los residuos de xilosa en los acetilxilanos, de manera que retiran el impedimento estérico que inhibe la acción de las otras xilasas. Las acetilxilaneesterasas tienen un peso molecular de 34 kDa y son producidas por *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *A. niger*, *Schizophyllum commune* y *F. succinogenes*. (Sunna y Antranikian, 1997).

Ácido ferúlico y p-cumárico esterasas

Los ácidos ferúlico y p-cumárico están unidos al xilano mediante enlaces éster. Las ácido ferúlico esterasas cortan las uniones éster entre las cadenas laterales de la arabinosa y el ácido ferúlico en el xilano, de igual manera, las ácido p-cumárico esterasas cortan las uniones éster entre la arabinosa y el ácido p-cumárico. Son pocas las enzimas ácido ferúlico y p-cumárico esterasas caracterizadas y purificadas, de entre estas, las primeras tienen un peso molecular aproximado de 11 kDa y son producidas por *Streptomyces commune* y *S. olivochromogenes*; las segundas tienen pesos moleculares entre 24 – 68 kDa y son producidas por *S. viridosporus* y el hongo *Neocallimastix* Cepa MC-2 (Sunna y Antranikian, 1997).

Endoxilanasas

Las endoxilanasas son con mucho las enzimas más estudiadas de entre las demás xilanasas. Las β -1,4-endoxilanasas cortan enlaces glicosídicos internos del esqueleto del heteroxilano, resultando en una disminución en el grado de polimerización del sustrato (Sunna y Antranikian, 1997)

Las endoxilanasas tienen un pH óptimo de 4.0 – 7.0; sin embargo algunas enzimas tienen pH extremos, como es el caso de la endoxilanasas C producida por *A. kawachii* con pH óptimo de 2.0, o la endoxilanasas producida por *Cryptococcus flavus* con pH de 10.0. La temperatura óptima de las endoxilanasas está entre 45 – 75°C y solo un número pequeño de estas enzimas presentan actividad a temperaturas mayores, como es el caso de las producidas por *Thermotoga thermarum* activas a temperaturas entre 80 – 100°C. (Sunna y Antranikian, 1997)

Las endoxilanasas de un mismo microorganismo pueden diferir en el grado de hidrólisis del heteroxilano, aparentemente como consecuencia del tamaño de los sitios de unión al sustrato, refiriéndose al tamaño del sitio de unión como el mayor o menor número de subsitios en la molécula de proteína, en cada uno de los cuales puede unirse un residuo xilanopiranosil de la cadena principal de xilano, teniendo un sitio catalítico cada cierto número de subsitios, dependiendo de la enzima,

Enzimas con sitios de unión más grandes (mayor número de subsitios) requieren una cadena más larga de xilano no sustituido que las enzimas con sitios de unión pequeños (menos número de subsitios). A consecuencia, las enzimas con sitios de unión mayor hidrolizan en menor grado al heteroxilano y muestran mayor afinidad por xilooligosacáridos lineales que las enzimas con sitios de unión pequeños (Biely, 1992).

Distribución de las xilanasas

Las xilanasas son producidas por numerosos organismos tanto eucariotes como procariotes, entre los que se encuentran protozoarios, insectos, plantas, caracoles, hongos y bacterias, debido a la amplia distribución de los xilanos en la naturaleza.

No obstante los organismos productores más estudiados han sido bacterias y hongos, debido al potencial de aplicación que tienen las xilanasas producidas por ellos en diversos procesos industriales como el biopulpeo y bioblanqueo, el tratamiento de desechos agrícolas, el mejoramiento de la calidad nutricional de alimentos para animales y de las propiedades de diversos productos de panadería. Por otro lado se ha otorgado gran interés a las xilanasas con un amplio intervalo de estabilidad a pH y temperatura dadas las condiciones a las que se llevan a cabo ciertos procesos en la industria (Mendicuti, 1996).

Tabla 2. Hongos y bacterias productores de enzimas xilanólíticas

| Microorganismo | Tipo de xilanasas producida |
|-----------------------------------|---|
| BACTERIAS | |
| <i>Bacillus sp.</i> | Endoxilanasas |
| <i>B. polymixa</i> | β -(1,4)-xilanhidrolasa |
| <i>B. stearothermophilus</i> | endo(1,4)- β -xilanasas |
| <i>B. subtilis</i> | endo(1,4)- β -xilanasas |
| <i>Cellulomonas sp.</i> | β -xilosidasa |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | β -xilosidasa |
| <i>Thermoactinomyces sacchari</i> | endoxilanasas, arabinofuranosidasa |
| <i>T. vulgaricus</i> | endoxilanasas, arabinofuranosidasa |
| HONGOS | |
| <i>Saccharomyces cyaneus</i> | Endoxilanasas, arabinofuranosidasa |
| <i>S. lividans</i> | endoxilanasas, arabinofuranosidasa |
| <i>Actinomadura sp.</i> | endoxilanasas, arabinofuranosidasa |
| <i>Aspergillus awamori</i> | (1,4)- β -arabinoxilanasarabinofuranohidrolasa, (1,4)- β -D-xilosidasa, endo-(1,4)- β -xilanasas |
| <i>A. fumigatus</i> | endo-(1,4)- β -xilanasas, β -D-xilosidasa |

Fuente: Modificada de Mendicuti, 1996.

Aplicaciones de las xilanasas

La aplicación de enzimas xilanólíticas se da en una variedad de procesos industriales.

Industria del papel

La industria del papel y la pulpa está interesada en la aplicación biotecnológica de enzimas para la sustitución de blanqueadores químicos como el cloro en el proceso de blanqueo de pulpa tradicional. (Durán, 1994). Esto no solo resulta en la reducción de costos del uso de químicos, sino que reduce problemas ambientales causados por los subproductos generados:

sustancias orgánicas cloradas, ya que son tóxicas, mutagénicas y bioacumulables, lo que puede causar disturbios en los sistemas biológicos. (Mendicuti, 1996, Beg *et al.*, 2001).

Existen otras opciones para el blanqueo de la pulpa como son el uso de ozono, peróxido de hidrógeno o dióxido de cloro, pero su uso implica mayores costos (Beg *et al.*, 2001).

Las enzimas más importantes en el blanqueo de papel son las endoxilasas, pero el uso de otras enzimas xilanolíticas han mostrado también ser efectivas (de Vries, 2001). El mecanismo por el cual las xilasas facilitan el blanqueo aún no se ha entendido por completo. Es posible que las xilasas hidrolicen los cromóforos asociados a los carbohidratos. O que se hidrolice la porción del complejo carbohidrato-lignina, produciendo moléculas de lignina de menor tamaño que son más fácil de remover (Beg *et al.*, 2001).

Mejoramiento de alimentos para animales

El mejoramiento de las características del alimento para animales también se puede lograr con un tratamiento con xilasas. Las dietas de aves de corral y cerdos se basan frecuentemente en cereales ricos en arabinoxilanos, tales como el trigo y el centeno. Algunas investigaciones han establecido que suplementando tales alimentos con xilasas se puede llevar a cabo una degradación parcial de los arabinoxilanos en el sistema digestivo de los animales. Esto permite una mejor y más completa absorción de nutrientes como almidón, proteínas y lípidos, reduciendo problemas digestivos y de parto comunmente encontrados en tales dietas (Bedford, *et al.*, 1992; Van Paridon, 1992).

Desde el punto de vista de la complejidad de la composición y variabilidad del alimento de animales y del hecho de que algunos animales quizá bajo ciertas condiciones, sean deficientes en la producción de enzimas endógenas, la dieta basada en materiales tratados o acondicionados con xilasas y productos multienzimáticos constituyen gran ayuda. La aplicación de tales productos en alimentos para aves otorga en costos efectividad de la conversión del alimento y por tanto mejora en el crecimiento de los animales (Biely, 1992). Además, problemas de ovoposición son eliminados frecuentemente y la variación dentro del

grupo de aves es reducida. En la cría de cerdo una mejora substancial en la producción es también observada, así como menor variación entre los animales. Además, la aparición de desórdenes digestivos normalmente se reduce.

Las enzimas para aplicación comercial en alimentos para animales necesitan cumplir ciertos requisitos como: Ser estables para su almacenamiento y procesamiento, ser estables en el pH intestinal del hospedero, resistentes a las proteasas del hospedero y ser activas contra los componentes del alimento a tratar.

Numerosos métodos de producción y estabilización enzimática han sido y están siendo desarrollados para cubrir estos requerimientos.

Otros aplicaciones en donde los sistemas xilanólicos se han utilizado es en la clarificación de jugos y la producción de xilosa, xilobiosa y cadenas de xilosas: éstos son utilizados como aditivos en la industria alimentaria en donde actúan como endulzantes (de Vries, 2001).

Industria de la panificación

Otra área en donde son utilizadas las xilanasas es en la Industria de la panificación, cuya función es la de hacer una hidrólisis parcial de los xilanos de la harina de trigo para mejorar las características de la masa y el pan.

Como se ha mencionado uno de los principales polisacáridos que constituyen la pared celular de los cereales son los xilanos, particularmente los arabinoxilanos. En el trigo el arabinoxilano representa de 2 - 3% (peso húmedo) en la harina completa, apareciendo tanto en forma soluble como insoluble, de esto alrededor del 0.5 - 0.8% es soluble en agua. El interés de los arabinoxilanos en panadería radica principalmente en su gran capacidad de retener agua, se ha encontrado que este polisacárido absorbe alrededor de la 3ª parte del agua adicionada en la elaboración de masa. Un rompimiento enzimático parcial de los arabinoxilanos por enzimas xilanólicas de *Aspergillus niger* libera agua. Si esta liberación sucede en el momento adecuado

en el proceso de homeado se puede reducir la dureza y compactación del migajón, mejorando su estructura, así mismo se puede incrementar el volumen del pan.

Por otra parte, al trabajar con preparaciones comerciales de α -amilasa se ha observado que mejoran las características del pan, ésto debido a la fracción xilanolítica de la preparación. Las xilanasas presentes eran: endo- β -D-xilanasas y α -L-arabinofuranosidasas. Estas enzimas solubilizan la mitad de la fracción de la pared celular presente en la harina, liberando 75% de arabinoxilanos insolubles. El residuo insoluble es rico en glucano y su capacidad de retener agua (CRA) no cambia. Sin embargo, la CRA de la fracción que contiene las paredes celulares en la masa se reduce aproximadamente un 50% (Morales, 1999).

En los trabajos de Maat, *et al.* (1992), se encontró una β -1,4 xilanasas producida por *Aspergillus niger var awamori* muy efectiva para incrementar el volumen del pan sin producir efectos colaterales en la calidad del mismo.

Enzimas en la industria de la panificación

La seguridad en el consumo de los alimentos y aditivos alimentarios es controlada por la legislación de cada país y por tanto cada gobierno tiene su plan regulatorio para el uso de enzimas en panificación.

Por ejemplo, en Francia se tiene una lista aprobada de aditivos a utilizar, en la que se permite el uso de enzimas como α -amilasa de *Aspergillus niger*. En Alemania, España y Portugal las enzimas son consideradas como aditivos, aunque en los dos últimos países se requiere de autorización gubernamental para su uso. En lugares como Inglaterra solo son utilizadas enzimas cuando la necesidad tecnológica es probada. En México las enzimas son consideradas como aditivos. Solo las enzimas llamadas de grado alimenticio, provenientes de cepas microbianas reconocidas como seguras son aceptadas.

Las enzimas usadas en panificación son consideradas como ingrediente de apoyo en el proceso o como aditivos. Los productores de mejoradores de pan argumentan que las enzimas son usadas para acondicionar la masa y que durante la cocción del producto son inactivadas.

Éstas son consideradas como ingredientes de apoyo en el proceso y en contraste con los aditivos no necesitan registrarse en el producto final (Tucker, *et al.*, 1995).

El uso de enzimas en la industria de la panificación

La industria de la panificación ofrece preparaciones enzimáticas específicas para diferentes aplicaciones. Las principales actividades enzimáticas encontradas en estas preparaciones comerciales son de amilasas, proteasas y pentosanasas. Su aplicación se discute a continuación.

Amilasas

Las amilasas en el proceso de panificación producen diferentes efectos:

1. Mezclado: La amilolisis, provoca pérdidas del agua recién ligada por el almidón de la harina, cuando esto sucede, un ablandamiento en la masa ocurre, lo cual puede ser considerado como positivo, aunque una pérdida mayor de agua, con la producción elevada de dextrinas produce una masa pegajosa.
2. Fermentación: Dependiendo del tipo de amilasas utilizadas, diferentes cantidades de maltosa, glucosa y dextrina se usan durante la fermentación.

La maltosa y la glucosa son importantes en el metabolismo de las levaduras ya que de ello dependerá que se lleve a cabo la fermentación anaerobia con la producción de etanol y CO₂. De lo anterior dependerá la formación de celdillas de gas en la masa y la calidad del producto final.

La producción de suficientes cantidades de glucosa pueden obtenerse agregando glucoamilasa, lo cual da ventajas debido a que la glucosa es fermentada a mayor velocidad que la maltosa. Así, las glucoamilasas pueden ser utilizadas para activar la fermentación y reducir el tiempo de ésta.

3. Cocción: En el horno la viscosidad de la masa disminuye, permitiendo mayor actividad enzimática y a partir de 56°C se inicia la gelatinización del almidón lo que lo hace más susceptible a la amilolisis.

La β -amilasa del trigo desempeña solo una pequeña parte en esta etapa ya que se inactiva rápidamente a 60°C. La α -amilasa de trigo es más estable y es capaz de generar glucosa y dextrinas de una forma más accesible del almidón gelatinizado.

La hidrólisis del almidón gelatinizado permite la formación de dextrinas y la liberación de agua, lo cual puede contribuir a tener una miga no pegajosa y al aumento de color de la costra, mejorando el esponjado y aumentando el volumen de la hogaza (una sobredosis genera dextrinas y lleva a una miga pegajosa).

4. Calidad del producto final: Las características indicativas de una buena calidad del pan son el volumen, el color de la costra y una larga vida de anaquel.

Una buena fermentación y la acción enzimática en el horno provocan un aumento en el volumen de la hogaza.

El efecto de las amilasas en el color de la costra no es muy claro. Se sabe que esto es resultado de las reacciones de Maillard, a mayor concentración de oligosacáridos producidos por la glucoamilasa incrementa el color (Tucker y Woods, 1995).

Por otro lado, entre más tiempo se tenga el pan fresco y suave se vende mejor y por tanto se le relaciona con una mayor calidad.

El endurecimiento del pan, al menos en sus fases iniciales, resulta de la asociación de moléculas de amilosa. El endurecimiento que se produce a lo largo de un periodo de tiempo amplio incluye también la asociación de las ramas más largas de amilopectina.

Las enzimas amilolíticas están relacionadas con lo anterior, debido a la generación de dextrinas de almidón gelatinizado, ya que pueden interferir en la cristalización del almidón. Por lo que se considera a las dextrinas como agentes capaces de retardar el endurecimiento.

La adición de α -amilasa bacterianas y fungales provocan la formación de polímeros con un grado de polimerización de 19 a 24 unidades, éstos se retrogradan a una menor velocidad y disminuyen la velocidad de endurecimiento.

Los efectos de endurecimiento pueden ser invertidos en el pan por calentamiento. La energía disponible, más la lubricación debida a la humedad presente, permite el movimiento térmico de las moléculas, restaurando así parcialmente una estructura más amorfa y por tanto más tierna. (Fennema, 1993; Tucker y Woods, 1995)

Proteasas

Las enzimas proteolíticas existen en estado nativo en el trigo y sus productos: harina blanca e integral, sin embargo las enzimas proteolíticas exógenas son las utilizadas en la industria de la panificación. Éstas son útiles para corregir y modificar las propiedades de la matriz proteínica del gluten, hidrolizando enlaces peptídicos. La velocidad de hidrólisis de la gliadina y la glutenina por proteasas es muy diferente. Esto dependerá del tipo de enzima utilizada ya que llevará a cabo la catálisis dependiendo de los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes y del tipo de harina/gluten utilizado. (Stauffer, 1991; Tucker y Woods, 1995).

Durante el mezclado de la harina fresca, ésta es ligeramente hidrolizada y en la fermentación la proteasa actúa en el gluten. La suavidad producida en el gluten será efecto de la cantidad de enzima agregada, del tiempo que se le permita a la proteasa actuar y de condiciones como temperatura y pH produciendo efectos como el aumento en la extensibilidad y viscosidad de la masa.

Una proteólisis extensa no es deseada por que puede debilitar la red del gluten y provocar una textura en la miga de baja calidad (poros no uniformes) y un bajo volumen. Por ello es importante agregar pequeñas cantidades de proteasa (Stauffer, 1991; Tucker y Woods 1995). La velocidad de catálisis de las proteasas es baja, sin embargo actuará hasta que se haya desnaturalizado (usualmente en el horno).

Xilanasas

Las xilanasas no son usadas comercialmente como aditivos para harina en panificación, lo cual puede ser debido a que las preparaciones con actividad xilanasa no están disponibles actualmente ya que las ventajas no han sido suficientes para garantizar que su uso traerá suficientes beneficios.

Algunas compañías encargadas de la producción de enzimas pueden asegurar que la actividad de las xilanasas es una actividad colateral, lo que hace a las preparaciones de enzimas comerciales exitosa.

La acción mejoradora de las xilanasas recae en la destrucción de la capacidad de enlace del agua con los xilanos de la harina de trigo, liberando agua y provocando una mayor suavidad de la masa. Cuando esto ocurre, puede provocar un incremento en el volumen (Tucker y Woods, 1995).

Niveles de xilanasa purificada inferiores al óptimo agregada a harina de trigo genera un incremento en el volumen de la hogaza de un 10%, pero la masa se vuelve ligeramente pegajosa; niveles de xilanasa superiores al óptimo da una masa laxa, disminuye el volumen de la hogaza y se tiene una textura de baja calidad.

En harinas con alto contenido de fibra, la adición de xilanasas mejoran la costra, la textura de la hogaza y el volumen; la absorción de agua en la masa disminuye en cierto modo, pero el contenido de humedad en el pan no se altera (Stauffer, 1991)

Se sugiere que la asociación glutenina-xilanos puede obstruir la formación de la red de proteína del gluten. Es posible que esto pueda extenderse al sistema de panificación, en cuyo caso, las xilanasas pueden tener una acción específica en la velocidad de formación y en la calidad del gluten.

Otro posible efecto de las xilanasas es el de compensar los efectos negativos de los xilanos insolubles presentes en la harina, ya que tienen un efecto negativo en el volumen de la hogaza y en la estructura de la miga (Tucker y Woods, 1995).

Lipasas

La mayor parte de las lipasas endógenas están presentes en el germen de trigo el cual es removido en los primeros estadios de la molienda. Sin embargo, lipasas y esterases endógenas han sido objeto de estudio y poco es sabido acerca de la acción de las lipasas y esterases exógenas. El uso de enzimas lipolíticas exógenas ha sido de importancia en panificación.

Al ser considerada la masa como una espuma, hablando fisicoquímicamente: una espuma estabilizada por lípidos, el número de enlaces aumenta entre las moléculas de gluten, formando uniones suplementarias a los puentes disulfuro lo que provoca obtener una masa más fuerte (Montor, 1986; Tucker y Woods, 1995).

La modificación de lípidos por enzimas puede tener un efecto positivo en las propiedades de los lípidos que estabilizan la espuma debido a la formación de un mono o diglicérido a partir de un triglicérido resultando una masa de mayor volumen y completamente desarrollada, no obstante, la oxidación de los lípidos provoca efectos negativos en las características sensoriales del pan: ranciedad. A pesar de lo anterior, se sabe que la retrogradación del almidón se retrasa por la formación de complejos amilasa-lípidos (Tucker y Woods, 1995).

Oxidoreductasas

Durante el desarrollo de la masa, los procesos oxidativos son de extrema importancia.

En el mezclado, ocurre la despolimerización y repolimerización del polímero de glutenina, provocando la oxidación de los grupos sulfhidrilo.

Lipooxigenasas, glucosaoxidasas y algunas otras peroxidasas son de valor potencial en el reemplazo de agentes oxidantes como mejoradores de pan.

Se ha observado que las lipooxigenasas mejoran el volumen de la miga. El mecanismo de acción en la masa es complejo, se considera que involucra la formación de peróxidos y/o

radicales libres. Lo anterior está relacionado con la pérdida de grupos tiol y la formación de puentes disulfuro, lo que incrementa la fuerza masa.

Por su parte, la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* actúa a través de la oxidación de la glucosa a ácido glucónico, acompañada de la formación de peróxido de hidrógeno. Esta reacción necesita de oxígeno y por ello es que toma lugar durante el mezclado de la masa. La glucosa oxidasa actúa a través del peróxido de hidrógeno en las propiedades de la masa.

La sulfhidrioxidasa también puede obtenerse de *Aspergillus niger*, esta enzima actúa directamente en la formación de puentes disulfuro entre proteínas, ya que oxida los grupos sulfhidro libres. La sulfhidril oxidasa también genera peróxido de hidrógeno (Tucker y Woods, 1995).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las xilanasas extracelulares producidas por cepas de *Aspergillus* en diferentes fuentes de carbono, compararlas con enzimas comerciales y evaluar su efecto en panificación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la producción de enzimas xilanolíticas, pectinolíticas y amilolíticas extracelulares en cuatro fuentes de carbono: Xilanos de abedul, desechos de tamarindo, olote de maíz y salvado de trigo.
- Identificar la cepa con mayor producción de enzimas xilanolíticas
- Caracterizar las preparaciones crudas de las enzimas con mayor actividad xilanolítica obtenidas y compararlas con las propiedades de enzimas comerciales utilizadas en panificación.
- Evaluar el efecto de las preparaciones crudas de enzimas y de las enzimas comerciales sobre pan.
- Identificar el sistema enzimático con las mejores características para ser utilizado en panificación.

HIPÓTESIS

Si los sistemas enzimáticos de *Aspergillus* sp contienen xilanasas con características de actividad y estabilidad a valores neutros de pH e inestabilidad a temperaturas por encima de los 50°C entonces al adicionarlos a la masa de pan modificarán la estructura de los xilanos presentes, lo que alterará su capacidad para absorber agua, de modo que parte del agua no absorbida por estos polisacáridos se redistribuirá entre los demás constituyentes de la masa y provocará un incremento en el volumen del pan, modificará la apariencia de la corteza y miga del pan y no se obtendrán efectos residuales indeseables ya que las enzimas se inactivarán durante el horneado.

METODOLOGÍA

Microorganismos

Se eligieron cuatro cepas tropicales de *Aspergillus*, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos de la Facultad de Química de la UNAM tomando en cuenta la capacidad de producir sistemas enzimáticos xilanolíticos de estudios anteriores.

Cada cepa se siembran en agar papa dextrosa (PDA) a 37°C y se incuban durante 3 a 4 días. Al término de este período de crecimiento y esporulación de cada cepa, se procede a la cosecha de esporas.

La preparación de PDA se lleva a cabo disolviendo PDA Sigma en agua destilada. Se esteriliza a 121°C y 15 lb/in² durante 20 minutos. Cuando el medio se encuentra a aproximadamente 45 °C, se vierte en cajas petri de plástico (10 x 15 cm), y se deja gelificar.

Ajuste de inóculo

Para obtener la suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) se llevan acabo los siguientes pasos:

- a) Cosecha de esporas: En condiciones de esterilidad, se vierte de 8 - 10 mL de Solución Salina-Tween (ST) estéril sobre la placa, se raspan las esporas utilizando un asa microbiológica estéril. Con una pipeta estéril, se pasa la suspensión a un tubo estéril.

Para preparar la solución salina tween se disuelve tween 80 hasta obtener una concentración de 0.05% y se agrega NaCl para obtener una concentración 0.9%.

- b) Cuenta de esporas: Se prepara una dilución 1:20, para determinar la concentración de esporas en la suspensión. La cuenta de esporas se realiza en una cámara de Newbauer, con ayuda de un microscopio. El inóculo se ajusta a 1×10^6 esporas/mL, ésta será la suspensión de esporas estándar, en donde se tendrá una por cada cepa.

Crecimiento en medio líquido

Se hizo una fermentación en medio líquido utilizando un medio basal adicionado con las siguientes fuentes de carbono: 1. tamarindo al 3% (Se utilizó semilla y bagazo de tamarindo secos, molidos hasta la obtención de un polvo fino y homogenados) 2. Olote de maíz al 3% (Fue utilizado olote seco, molido y homogenado) 3. Xilano de abedul al 1% 4. Salvado de trigo comercial (All bran, Kellog's) 3%.

El medio basal se compone de K_2HPO_4 al 0.2 %, KH_2PO_4 al 0.2 % y $NH_4(SO_4)$ al 0.4%, ajustando a un pH de 5.

Los medios se esterizaron a $121^\circ C$ y 15 lb/in^2 durante 20 minutos, se inoculó cada matraz con suspensión de esporas suficiente para tener en el medio 1×10^6 esporas/mL. La incubación se llevó a cabo en una agitadora a $37^\circ C$ y 200 rpm durante 72 horas. Se tomaron muestras al tiempo 0, 24, 48 y 72 horas para medir pH, crecimiento (sólo donde son utilizados los xilanos de abedul como fuente de carbono), grupos reductores y actividad xilanolítica.

Obtención de las preparaciones crudas de enzimas.

Al término de la incubación, el medio obtenido con el microorganismo crecido se filtró (Papel filtro Whatman cualitativo) y el filtrado crudo fue almacenado en envases pequeños a temperatura de congelación para su posterior liofilización, resuspensión, caracterización y uso.

Caracterización de enzimas xilanolíticas

Para la caracterización se evaluaron reductores directos, actividad xilanolítica, estabilidad a pH y temperatura, perfiles de proteína por SDS-PAGE y geles de actividad "in situ" (zimogramas).

Medición de reductores directos

La cuantificación de azúcares reductores se realizó a los filtrados extracelulares libres de células por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). La mezcla de reacción contenía: 0.1 mL de filtrado enzimático, 0.9 mL de agua y 1 mL de DNS. Se colocó en un baño de agua en ebullición durante 5min, se le agregaron 10 mL de agua destilada, se agitó y se midió la absorbancia a 575 nm en espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch and Lomb). Se construyó una curva patrón de xilosa de 0.1 a 1mg/mL.

Medición de actividad por reductores

Medición de actividad xilanolítica

La actividad xilanolítica se determinó mediante la producción de azúcares reductores, los cuales se cuantificaron por el método del DNS (ver párrafo anterior). Como sustrato se utilizó una solución de xilanos de abedul al 1%. La mezcla de reacción contenía 0.5 mL de sustrato, 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 0.1M a pH de 5, se preincubó a 50°C por 5 min e inmediatamente se le agregó 0.1 mL de filtrado enzimático y se incubó por 20 min. La reacción se paró agregándole 1 mL del reactivo de DNS y se colocó en un baño en ebullición por 5 min. Fueron agregados 10 mL de agua destilada, se agitó y se determinó la absorbancia a 575 nm. Se construyó una curva patrón de xilosa de 0.1 a 1 mg/mL. Una unidad de actividad xilanolítica se definió como la cantidad de enzima que catalizó la formación de un μmol de xilosa en el tiempo de incubación bajo las condiciones de ensayo.

Medición de actividad amilolítica

La actividad amilolítica producida se midió cualitativamente usando el método de tinción de yodo (Anexo I), utilizando geles ultradelgados a pH 5 con agar bacteriológico al 1% y almidón como sustrato específico al 0.1%, revelando a las 24 h de incubación con una solución de lugol al 4%.

Medición de actividad exopectinolítica

Esta actividad también se evaluó por el método colorimétrico del DNS. Se utilizó como sustrato 0.5 mL de pectina al 1% mezclados con 0.4 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 N a pH de 5 y 0.1 mL de filtrado enzimático. La mezcla se preincubó durante 5 min a 45°C y después se incubó a la misma temperatura durante 20 min. Se construyó una curva patrón de ácido galacturónico de 0.1 a 1 mg/mL. Una unidad de actividad exopectinolítica se definió como la cantidad de enzima que catalizó la formación de 1 μmol de ácido galacturónico durante 20 minutos a 45°C.

Electroforesis (SDS- PAGE)

La electroforesis en SDS-PAGE se realizó de acuerdo a Laemmli (1970).

El gel contiene acrilamida al 10% y bis-acrilamida al 2.7%. La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel y en el buffer de corrimiento. Las muestras a utilizar fueron sometidas a ebullición durante 60 segundos en el buffer de muestra (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% buffer Tris-HCl 125mM a pH 6.8 y azul de bromofenol 0.005%).

Se emplearon 200 µg de proteína, de cada muestra para realizar la electroforésis, la cual se llevó a cabo a 60 mA corriente constante, de 3-4 h, a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm de grosor. Los geles fueron teñidos con una solución que contiene azul de Coomassie R-250 al 0.125% durante 1h, metanol al 50% durante 30 min y ácido acético al 10% hasta la desaparición del color azul y observación clara de las bandas de proteína.

Geles de actividad xilanolítica "in situ"

Después de llevar a cabo la SDS-PAGE, los geles se lavaron en solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM a pH 7.5 por 30 min a 37 °C y 1 rpm, se cambió el buffer tantas veces como fue necesario hasta que se eliminó el colorante del frente de corrida, se decantó. Se agregó una solución de sustrato de xilano de avena al 1% pH 5 en solución amortiguadora de acetatos, se incubó a 37°C por 1 h, se decantó y eliminó grumos de xilanos. Se agregó una solución rojo congo al 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente y se decantó. Posteriormente se adicionó una disolución de NaCl 1M y se mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente para al final ser decantado. Una solución de ácido acético 1M se agregó y mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente, el cual finalmente fue decantado. El gel se mantuvo en agua para su estudio.

Determinación del pH y temperatura de máxima actividad xilanolítica

Para determinar el pH óptimo de las enzimas contenidas en el filtrado se determinó la actividad xilanolítica a pHs de 3 a 9. La mezcla de reacción fue la misma utilizada que al medir actividad xilanolítica solo que las soluciones amortiguadoras que se utilizaron son las que a continuación se describen: solución de acetato de sodio 100mM a pH de 3 a 6 y solución Tris-HCl 100 mM a pH de 7 a 9. Para determinar la temperatura óptima del ensayo la mezcla de reacción se incubó

durante 20 min a temperaturas desde 30°C hasta 91°C; con la misma mezcla de reacción utilizada al medir actividad xilanolítica.

Determinación de la estabilidad enzimática a diferentes valores de pH y temperatura

Para determinar la estabilidad de la enzima frente al pH se utilizaron las soluciones amortiguadoras siguientes: amortiguador de acetatos 50 mM a pH de 3 a 6 y amortiguador Tris-HCl 50 mM a pH 7 para incubar, así como amortiguador de acetatos 200 mM a pH de 5 para realizar el ensayo y medir actividad xilanolítica. La enzima se colocó en cada una de las soluciones amortiguadoras a los diferentes pHs y se incubaron a temperatura de 2 y 30°C por 24 h. Después de este tiempo se tomó una alícuota de 0.1 mL y se midió la actividad xilanolítica residual, en las condiciones antes descritas. Para la determinación de la estabilidad de las xilanasas a diferentes temperaturas se incubó la enzima en solución amortiguadora de acetatos 100mM a pH 5 durante 120 min a temperaturas de 30, 50, 77 y 91°C. Después de esta incubación se les determinó la actividad xilanolítica a 50°C, según el método para la actividad xilanolítica y se comparó con un control sin tratamiento térmico.

PRUEBAS DE PANIFICACIÓN

Dosificación

Las muestras comerciales: Harizyme (Enmex, S.A. de C.V.) y Ban 800 (Novoenzymes) se resuspendieron en agua y adicionaron en una concentración de 200 μ L/K de harina (200 ppm).

Las dosis de filtrado enzimático se establecieron con respecto a la actividad xilanolítica máxima obtenida por las dos enzimas comerciales utilizadas, la cual fue Ban 800 de Novoenzymes con 185 U/ 200 ppm. Así, se adicionaron en una concentración de 50, 100 y 200 ppm con respecto a Ban 800, es decir, 46.25, 95.5 y 185 U, respectivamente.

Elaboración de los panes

La formulación se muestra en la siguiente tabla:

| Textura de la miga | Color de la miga |
|---|-------------------------|
| 9. Muy buena Celdas pequeñas y uniformes | 9. Acremada |
| 8. Buena Presencia de celdas grandes | 8. Café crema |
| 7. Regular Celdas grandes y chicas, distribución no uniforme | 7. Café |
| 6. Pobre Celdas grandes con desgarraduras y compactación en algunas zonas | |

Características externas del pan

Después de 24 h de elaborado el pan, se evaluó el color de la corteza y la apariencia general de acuerdo con la siguiente escala:

| Color de la corteza | Apariencia general |
|------------------------------|---------------------------|
| 5. Muy dorada | 9. Muy buena |
| 4. Dorada | 8. Buena |
| 3. Ligeramente dorada | 7. Regular |
| | 6. Suficiente |

Comparación de enzimas obtenidas con enzimas comerciales

Las enzimas comerciales fueron caracterizadas determinando actividad xilanolítica, pectinolítica y amilolítica, actividad máxima y estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura y por patrón electroforético en SDS-PAGE. También se probó el efecto de dichas enzimas sobre el pan.

La metodología utilizada fue como anteriormente se describió, solo que en lugar de utilizar filtrado enzimático se utilizó una suspensión de enzimas comerciales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CRECIMIENTO

Con el fin de determinar el crecimiento de las cepas de *Aspergillus* FP-60, FP-440, FP-470 y FP-520 y su producción de enzimas, se realizaron fermentaciones en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo con xilanos de abedul, salvado de trigo y desechos agroindustriales de tamarindo (bagazo y semilla) y maíz (olote) utilizados como fuente de carbono.

En la figura 1 se muestra el crecimiento de las cuatro cepas utilizadas, incubadas en xilanos de abedul como fuente de carbono. El crecimiento (determinado como incremento en peso seco) presentó una fase de latencia en donde las 4 cepas fueron adaptándose al medio de cultivo hasta las 48 h de incubación, después del cual la población fungal aumentó regularmente y se mantuvo así hasta las 72 h (fase exponencial). No se observó fase estacionaria en el periodo estudiado.

El mayor crecimiento lo tuvo la cepa 60 con un valor de 2.87 mg de peso seco/mL de medio de cultivo, seguida de la 520, 470 y la 440 con 2.3 mg de peso seco/mL, 1.86 mg de peso seco/mL y 1.06 mg de peso seco/mL, respectivamente (Figura 1).

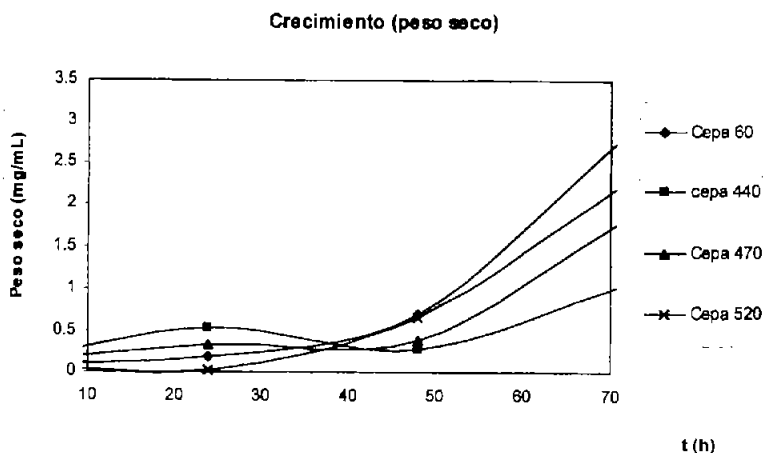


Figura 1 Crecimiento de *Aspergillus* sp cultivado a 37°C, 200 rpm durante 72 h, en xilanos de abedul al 1%.

AZÚCARES REDUCTORES

La acumulación de azúcares reductores está relacionada con la capacidad de los microorganismos para degradar a los polisacáridos en monosacáridos los cuales son utilizados para llevar a cabo la glucólisis y obtener la energía necesaria para crecer (Camacho, 2000). Así, al medirse azúcares reductores en la fermentación, en donde se utilizaron xilanos de abedul como fuente de carbono, se observó que en las 4 cepas, al tiempo cero (t_0) había una cantidad de 0.2060 a 0.4460 mg de azúcares reductores /mL aumentando al tiempo 24 h hasta 3.6 mg de azúcares reductores/mL debido quizá a la degradación del sustrato por xilanasas constitutivas. Posteriormente al tiempo 48 h y 72 h disminuyó por el uso de éstos por el microorganismo.

En relación con la producción de azúcares reductores en residuos agroindustriales, se sabe, que en los medios que se utiliza xilano puro o residuos ricos en xilano como fuente de carbono se obtienen unidades de xilosa, xilobiosa, xilooligosacáridos, heterosacáridos de xilosa, glucosa y los isómeros correspondientes; ya sea por la acción de enzimas xilanolíticas constitutivas o por enzimas inducibles que son producidas y secretadas al medio (Kulkarni, 1999; Beg, *et al.*, 2001). Para el caso del uso de desechos de tamarindo como fuente de carbono (Figura 2.a), al to de la fermentación se obtuvieron de 1.48 a 1.65 mg de azúcares reductores/mL, la cantidad de éstos disminuyó proporcionalmente hasta las 48 h y posiblemente fueron degradándose hasta las 72 h y disminuir de 0.10 a 0.60 mg/mL.

Los azucare reductores medidos usando olate de maíz y salvado de trigo (Figura 2.b y 2.c) usados como sustrato en la fermentación presentaron una misma tendencia de aumento a las 24 h y descenso hasta las 72 h que al usar xilanos de abedul (Figura 2.d), para el caso de las cepas 60, 440 y 470. En el caso de la cepa 520, los azúcares medidos al usar salvado de trigo y olate como fuente de carbono, tuvieron una tendencia a disminuir desde el inicio de la fermentación, de forma similar a lo obtenido en desechos de tamarindo.

ACTIVIDAD XILANOLÍTICA, PECTINOLÍTICA Y AMILOLÍTICA

En la figura 3 se observa la actividad xilanolítica que produjeron a lo largo de la fermentación

las distintas cepas. Cuando las cepas se incubaron con xilanos de abedul (Figura 3.a), la actividad xilanolítica a las 24h, fue apenas detectable para la cepas 60 y 440 y aumentó de manera a las 48h hasta las 72h.

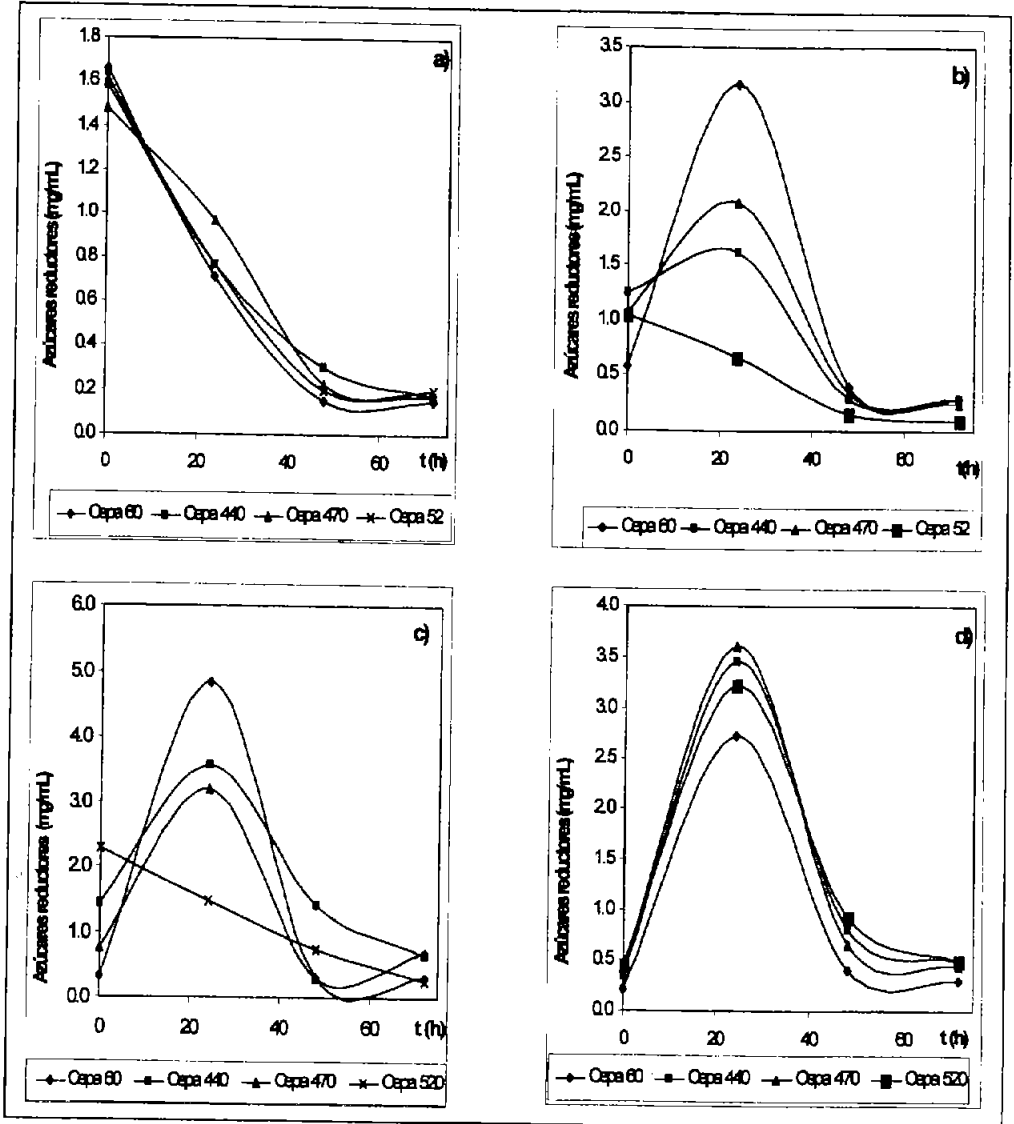


Figura 2 Producción de azúcares reductores por las cuatro cepas de *Aspergillus* durante la fermentación. La fuente de carbono en donde crecieron fue: a) Desechos de tamarindo b) Olote de maíz c) Salvado de trigo d) Xilanos de abedul.

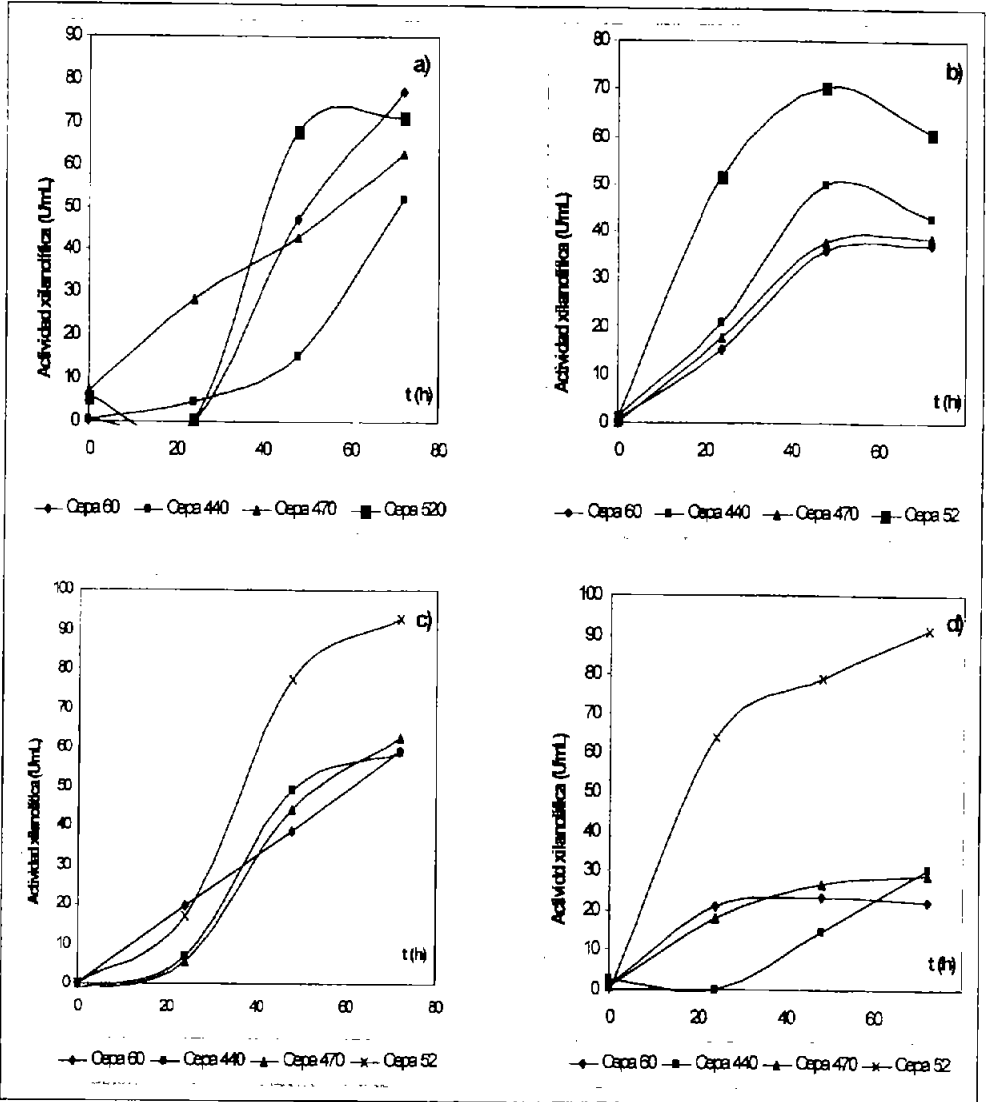


Figura 3. Actividad xilanólítica producida por las cuatro cepas de *Aspergillus* durante la fermentación. La fuente de carbono en donde crecieron fue: a) Xilanos de abedul b) Desechos de tamarindo c) Olote de maíz d) Salvado de trigo.

Al haber utilizado desechos de tamarindo (Figura 3.b), para todas las cepas presentó un comportamiento de aumento de actividad xilanolítica a partir de las 24 h hasta las 48h, sin embargo a las 72h disminuyó. En el medio con olote (Figura 3.c) hubo un aumento de actividad continuo hasta las 72h y para salvado de trigo (Figura 4.d) un aumento considerable presentó a las 24 h, aunque se mantuvo casi la misma actividad hasta las 72 h para el caso de las cepas 440, 470 y 60; la cepa 520 aumentó su actividad desde las 48 h a las 72 h.

Es importante observar que la cepa 520 al haber utilizado desechos de tamarindo (figura 3.b) y salvado de trigo (figura 3.d) mostró mayor actividad xilanolítica que las otras cepas a partir de la 24 h. En salvado de trigo, se detectó mayor incremento en la actividad de la cepa 520 con respecto a las cepas 60, 440 y 470 a las 24, 48 y 72 h con un máximo de actividad al último tiempo de 91 U/mL. También al usar olote de maíz, la cepa 520 tiene una actividad xilanolítica mayor a partir de las 48 h, con respecto a las otras cepas probadas con un máximo de actividad a las 72 h de 93 U/mL.

Se ha reportado que los desechos agroindustriales representan una buena fuente para la producción de xilanasas. Gomes (1994) planteó que las fuentes insolubles son mejores inductores de las xilanasas ya que no ejercen represión catabólica por la presencia de sustancias solubles. Lo anterior se pudo comprobar con la alta producción de actividad xilanolítica en olote de maíz con 93 U/mL para la cepa 520, 63 U/mL para la cepa 470 y 59 U/mL para la cepa 440 (Figura 4).

En la figura 4 se observa que la cepa 60 desarrolla mayor actividad en xilano de abedul con 77 U/mL y la cepa 520 también tiene una actividad alta en salvado de trigo con 91 U/mL. Además, la cepa que muestra mayor actividad en las distintas fuentes de xilanos es la 520, excepto en xilanos de abedul en cuyo caso es la cepa 60.

Aún cuando los xilanos de abedul provienen de madera dura, la cual contiene un porcentaje mayor de xilanos solubles que de insolubles, 80 y 19% respectivamente, el salvado de trigo contiene cerca del 90% de xilanos insolubles lo que permitiría una mayor inducción de xilanasas

por parte de este último sustrato. Sin embargo, la actividad en salvado de trigo es menor, representando un 27, 54 y 50% con respecto a la actividad en xilanos de abedul. Lo anterior pudo deberse a la gran cantidad de grupos fenólicos y de ácido urónico que contiene el salvado de trigo, lo que lo hace menos susceptible a la degradación enzimática por la gran cantidad de ramificaciones y es consecuentemente más resistente al ataque microbiano (Voragen A., et al., 1992).

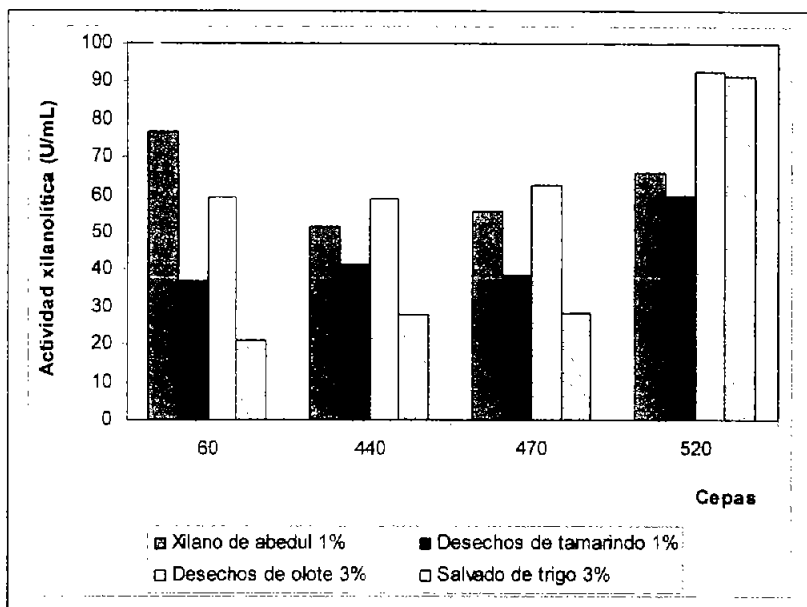


Figura 4. Actividad xilanólítica en las distintas fuentes de xilanos de *Aspergillus* sp.; FP-60, FP-440, FP-470 y FP-520 cultivado a 37°C a 200 rpm. Datos obtenidos a las 72 h de cultivo.

La actividad xilanólítica al utilizar salvado de trigo disminuyó con respecto al uso de desechos de tamarindo, esto puede deberse por la composición del salvado, el cual tiene una mayor cantidad de celulosa que los desechos de tamarindo.

Por lo descrito anteriormente, la cepa 520 crecida en olote de maíz y la cepa 60 crecida en xilano de abedul son las mayores productoras de actividad xilanolítica con 93 U/mL y 77 U/mL, respectivamente.

Muchos microorganismos xilanolíticos producen actividades enzimática relacionadas con la composición de la fuente de carbono donde se hacen crecer (Riou *et al.*, 1991), por lo anterior, se determinaron las actividades pectinolítica y amilolítica en los filtrados extracelulares de *Aspergillus* producidos por las diferentes cepas en las distintas fuentes de xilano.

La actividad amilolítica producida por las cepas de *Aspergillus* sp (60, 440, 470 y 520) se determinó como se indica en la metodología. Los filtrados obtenidos de las cepas crecidas en xilanos de abedul puros, no produjeron actividad. Aunque, al emplear salvado de trigo sí se encontró actividad amilolítica, esto probablemente debido a residuos amiláceos los cuales pudieron haber provocado la inducción de enzimas amilolíticas. Lo anterior parece también ser el caso al utilizar desechos de tamarindo como fuente de carbono donde también produjeron actividad amilolítica, puede pensarse que en este sustrato quedaron residuos amiláceos los cuales indujeron la producción de enzimas. En olote de maíz sí hubo actividad. Las cepas que mostraron actividad fue la cepa 60, 440 y 470 al usar desechos de tamarindo desde las 24 horas de fermentación. La cepa 520 en olote desarrolló actividad a partir de las 24 horas y en salvado de trigo solo a las 72 horas de la fermentación.

En la figura 5 se resumen las actividades pectinolíticas que produjeron las cepas de *Aspergillus* sp (60, 440, 470 y 520) en las diferentes fuentes de carbono, como puede observarse, la capacidad de producir pectinasas en olote y salvado es menor que en tamarindo y xilanos de abedul.

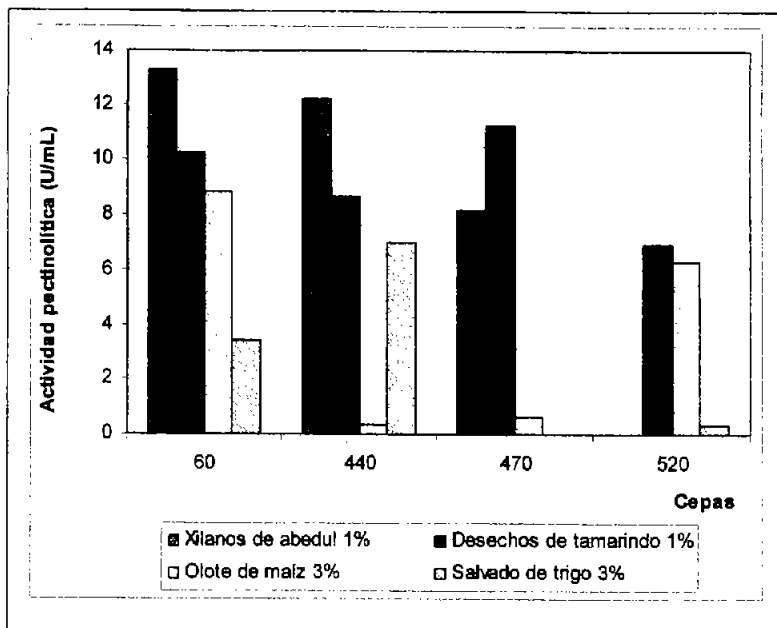


Figura 5. Actividad pectinolítica en las diferentes fuentes de xilanos de *Aspergillus* sp FP-60, FP-440, FP-470 y FP-520, cultivado a 37°C, 200 rpm. Datos obtenidos a las 72 h de cultivo.

Para poder comparar el perfil de proteínas extracelulares producidas por las cuatro cepas de *Aspergillus* en las cuatro fuentes de carbono se realizó un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes.

Como se observa en la figura 6, los filtrados de cada cepa, en las dos fuentes de carbono presentan el mismo perfil protéico, también en desechos de tamarindo y xilanos de abedul se mostró este perfil (gel no mostrado). Por otro lado, en todos los carriles de los filtrados de la cepa 60, 440 y 470 se observaron bandas con el mismo Rf, que corresponden a proteínas con un peso molecular de 22, 24, 27, 30 y 66 KDa, lo que mostró la similitud en la producción enzimática entre las tres cepas blancas utilizadas. Para los filtrados de la cepa 520, se observan bandas a la misma distancia de corrimiento, aún al haberlos obtenido de distintas fuentes de carbono, presentando en todos los casos proteínas

de un peso molecular mayor a 33 kDa, en este caso hay una diferencia de perfil protéico con las cepas anteriores debido al uso de una cepa negra.

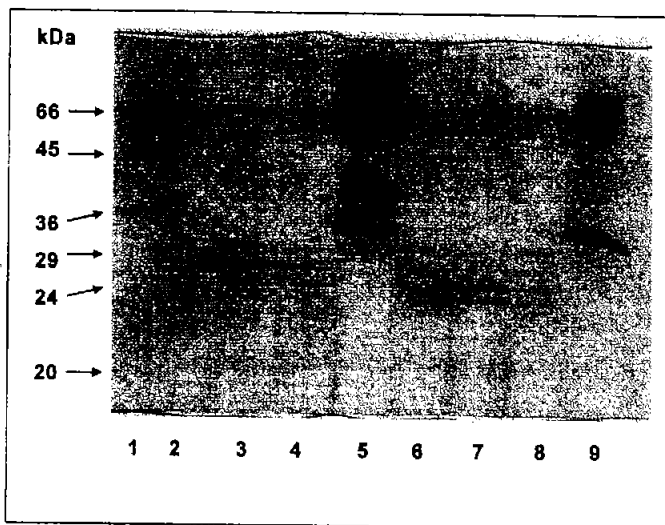


Figura 6. SDS-PAGE al 10%, de las proteínas de los filtrados enzimáticos. Los filtrados fueron obtenidos al crecer las distintas cepas utilizando olote (Carril 2-5) y salvado de trigo (Carril 6-9), como fuentes de carbono: Carril: 1. Marcadores de peso molecular 2. Cepa 60 3. Cepa 440 4. Cepa 470 5. Cepa 520 6. Cepa 60 7. Cepa 440 8. Cepa 470 9. Cepa 520

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LAS MUESTRAS COMERCIALES

Se determinó la actividad xilanolítica y pectinolítica de las muestras comerciales a una concentración de 100 mg/mL, obteniéndose lo mostrado en la tabla 1.

La actividad amilolítica se determinó de la misma forma que para los filtrados enzimáticos.

Las enzimas comerciales se utilizaron en una concentración de 10 mg/mL y en ambas se encontró actividad amilolítica.

Tabla 1. Actividad xilanolítica y pectinolítica de las preparaciones comerciales

| Muestra comercial^a | Actividad xilanolítica (U/mL) | Actividad pectinolítica (U/mL) |
|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Hartzyme | 42 | 3 |
| Ban 800 | 77 | 5 |

^aSe utilizó una concentración de la preparación enzimática comercial de 100 mg/mL.

CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD DE *Aspergillus* CEPA FP-60 Y FP-520 EN OLOTE DE MAÍZ Y DESECHOS DE TAMARINDO

La industrialización de alimentos genera gran cantidad de desechos que pueden terminar en varios destinos: contaminando el medio ambiente o bien aprovechándose para la producción de productos de alto valor agregado.

La utilización de residuos agroindustriales como olate de maíz y desechos de tamarindo como material de inicio de una fermentación, permite la producción de compuestos de interés para su posterior uso, éste es el caso de enzimas xilanolíticas producidas por hongos.

Una vez establecida la opción del uso de residuos generados después del procesamiento de alimentos como es el caso del tamarindo y del maíz y que la cepa 520 y la cepa 60 son las mayores productoras de actividad xilanolítica, aunque en diferentes sustratos, se realizó una fermentación en las mismas condiciones de éstas dos cepas en olate de maíz y en desechos de tamarindo, con el fin de obtener una cantidad considerable de filtrado extracelular para su uso posterior.

De esta fermentación a las 72 h la actividad xilanolítica obtenida fue de 44 U/mL y 16 U/mL para la cepa 60 crecida en olate de maíz y en desechos de tamarindo, respectivamente, y de 60 U/mL y 27 U/mL para la cepa 520 crecida en olate y desechos de tamarindo, respectivamente.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS FILTRADOS ENZIMÁTICOS PRODUCIDOS POR *Aspergillus* CEPA 60 Y 520 Y DE LAS PREPARACIONES COMERCIALES.

EFEECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD XILANOLÍTICA

Para obtener la mayor actividad xilanolítica de los filtrados enzimáticos es preferible hacerlo en sus condiciones óptimas de reacción; también, es necesario conocer su estabilidad, con el fin de determinar las mejores condiciones de almacenamiento.

Los sistemas enzimáticos producidos por la cepa 60 y 520 en desechos de tamarindo y olote tuvieron la máxima actividad a una temperatura de 50°C (Figura 7); éste dato coincide con el obtenido de xilanasas como las producidas por *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans* CECT 2544 crecida a 37°C, *Penicillium purpurogenum*, *Bacillus* sp. C-125 crecido a 37°C y *Clostridium* sp. SAIV (Sunna y Antranikian, 1997). Debido a que solo se presentó una temperatura máxima de actividad sin variación, podría inferirse la acción de un mismo tipo de xilanasa presente en los 4 filtrados enzimáticos.

La temperatura de máxima actividad para Ban 800 fue de 50°C (Figura 7) y de 60°C para la preparación enzimática de Harizyme. Microorganismos como *Aspergillus* sp., *Bacillus* sp. cepa K-1 y *Streptomyces* sp EC 10 (Beg, et al., 2001; Wong, et al., 1988) producen xilanasas cuya temperatura óptima corresponde a 60°C, la cual coincide con la temperatura de máxima actividad que mostró Harizyme.

A 30°, temperatura más baja de incubación, fueron determinados bajos porcentajes de actividad con respecto a la máxima, como es observado en la figura 7; del 3% para la cepa 60 crecida en olote y del 11% en desechos de tamarindo y del 26% y 61% para la cepa 520 crecida en olote y desechos de tamarindo, respectivamente.

Y 91°C, temperatura más alta de incubación ya no se detectó actividad en los filtrados enzimáticos, mientras que para las enzimas comerciales a la misma temperatura la actividad residual es del 14.4% para Harizyme y de 0.4% para Ban 800

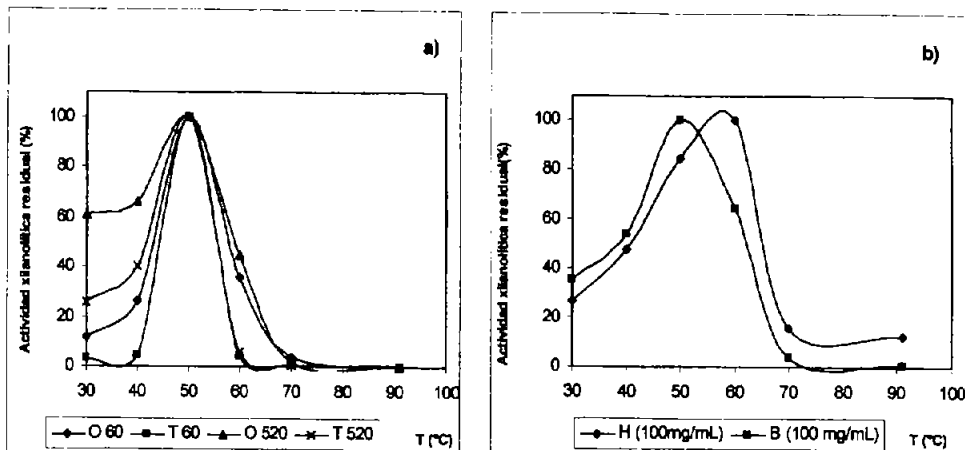


Figura 7. Efecto de la temperatura de ensayo sobre la actividad de las xilasas. a) Filtrados enzimáticos obtenidos de la fermentación de la cepa de *Aspergillus* 60 en olote (O60), cepa 60 en desechos de tamarindo (T60), cepa 520 en olote (O520) y cepa 520 en desechos de tamarindo (T520). b) Enzimas comerciales: Harizyme (H) y Ban 800 (B). La determinación se realizó de 30°C a 91°C.

Se analizó la termoestabilidad de los filtrados a diferentes temperaturas durante 120 minutos y se encontró que al medir la actividad como se indica en la metodología, los filtrados de la cepa 60 presentaron los más altos porcentajes de actividad residual con un porcentaje del 140% a 75 minutos (Figura 8.a) del filtrado obtenido al crecer a la cepa en desechos de tamarindo y del 152% a 90 y 105 minutos (Figura 8.b) del filtrado obtenido al crecer a la cepa en olote de maíz.

El hecho de tener altos porcentajes de actividad residual a tiempos intermedios puede explicarse, recordando que se tiene un sistema de diferentes enzimas xilanolíticas. Algunas de ellas tendrán la capacidad de degradar el sustrato inicial formando oligómeros de distinto peso molecular, los cuales podrían ser un sustrato con mayor facilidad de ser hidrolizado, ya sea por el mismo u otro grupo de enzimas, formando a un mayor tiempo un gran número de moléculas de menor peso molecular. Comparando con el poder reductor inicial, éste fue mayor a tiempos específicos como se explica en el párrafo anterior.

De las tres temperaturas utilizadas, la menor estabilidad para el sistema enzimático producido por la cepa 60 es a 77°C (Figura 8) ya que a los 15 min prácticamente se pierde toda la actividad.

Con respecto a la termoestabilidad de las xilanasas de la cepa 60, las de la cepa 520 mostraron mayor estabilidad a temperatura de 30, 50 y 77°C (Figura 9), aunque desde los primeros minutos a 91°C perdió su actividad.

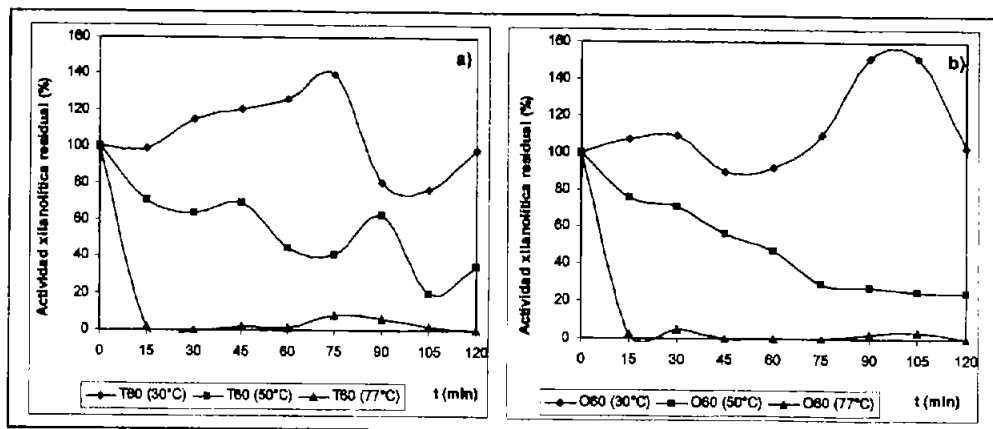
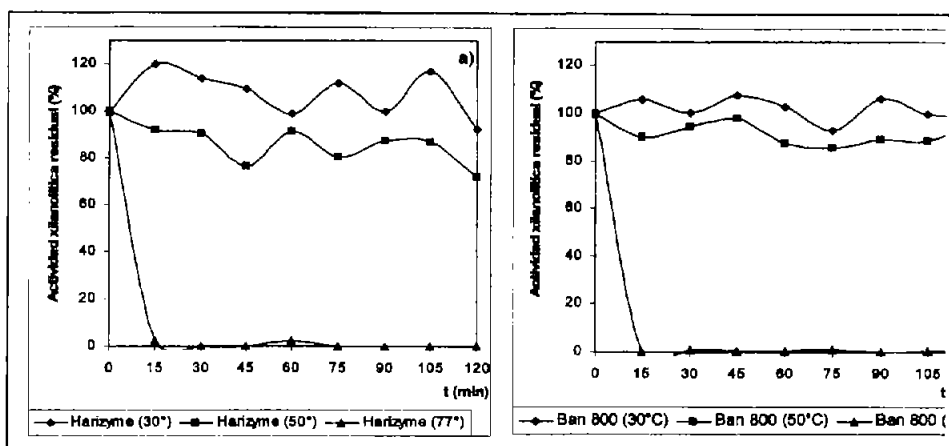
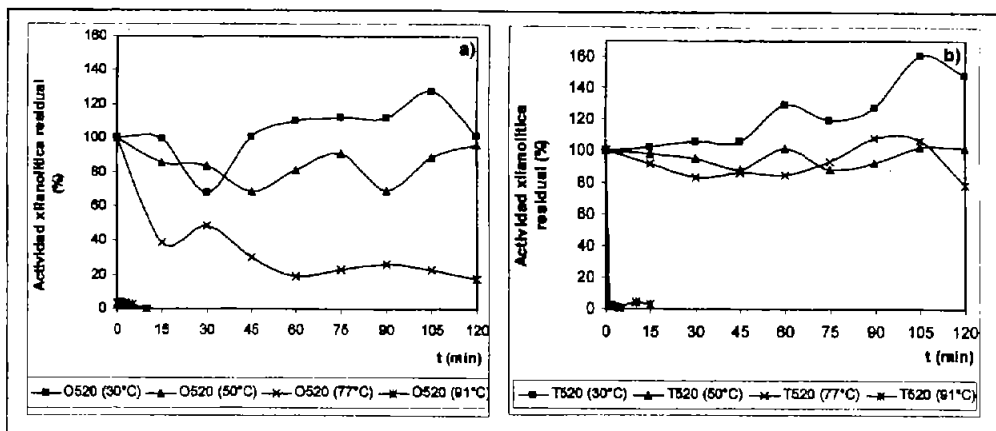


Figura 8. Termoestabilidad del sistema enzimático producido por la cepa 60.

a) Filtrado enzimático producido en desechos de tamarindo (T). b) Filtrado enzimático producido en okra (O). La determinación se realizó al incubar por distintos tiempos los filtrados enzimáticos a temperatura de 30°C, 50°C y 77°C.

En el caso de las enzimas de las muestras comerciales al ser incubadas a 77°C a partir de 15 minutos su actividad disminuye considerablemente, esto les permite tener una característica conveniente para ser usadas en panificación, ya que su actividad desaparecerá cuando la masa con estas mezclas de enzimas sean sometidas a altas temperaturas en el horno (Figura 10), de 200 a 220 °C, aproximadamente.



EFFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD XILANOLÍTICA

La actividad de los filtrados enzimáticos fue evaluada de pH 3 a pH de 9 a 50°C. El pH de

máxima actividad de los filtrados enzimáticos fue de 4, con excepción de los filtrados de la cepa 60 crecida en olote que tuvo un pH de máxima actividad de 5, lo que difiere de lo encontrado en tamarindo para el filtrado de la misma cepa (Figura 11)

Al estimar el pH de máxima actividad de ensayo de las enzimas comerciales se observó que para Harizyme y Ban 800 fue de 6 (figura 11). El manejo de estas enzimas puede darse de pH 5 a pH 7 sin perder más del 60% de actividad.

Xilanasas de *Geotrichum candidum* y *Trichoderma reesei* presentaron un pH óptimo de 4; *Aspergillus sojae* y *Trichoderma harzianum* un pH óptimo de 5, los cuales coinciden con los pHs de máxima actividad de los sistemas enzimáticos producidos. Y una β -xilosidasa de *Bacillus thermantarcticus*, xilanasas de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 y *Aspergillus fischeri* presentaron el mismo valor de pH de máxima actividad que las enzimas comerciales. La mayoría de las xilanasas de origen fungal presenta un pH óptimo de entre 4 y 6.5, como las xilanasas de *Aspergillus* sp con pH óptimo de 4 a 6.5. (Beg, et al., 2001; Lama, et al., 2004).

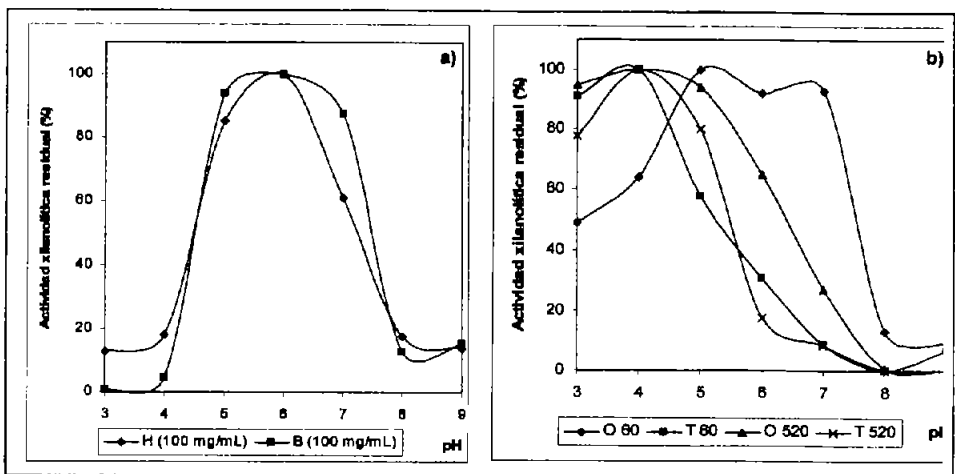


Figura 11. pH de máxima actividad de ensayo de xilanasas. a) Enzimas comerciales: Harizyme (H) y Ban 800 (B). b) Filtrados enzimáticos obtenidos de la fermentación de cepas de *Aspergillus* 60 crecidas en olote (O60), cepa 60 crecida en desechos de tamarindo (T60), cepa 520 crecida en olote (O520) y cepa 520 crecida en desechos de tamarindo (T520). Se utilizaron soluciones amortiguadoras de acetatos 100 mM de pH 3 a 6 y solución amortiguadora Tris-HCl 100mM de pH 7 a 9. La determinación se realizó en solución amortiguadora de acetatos 100mM pH 5.

El efecto del pH en la estabilidad de las enzimas xilanolíticas fue determinado a 2°C y 30°C, incubando los filtrados enzimáticos durante 24 h a diferentes valores de pH.

Al medir la actividad residual se obtuvo lo siguiente:

Las enzimas comerciales mantuvieron su estabilidad de un 80 a un 100% en el rango de pH de 3 a 7 a las dos temperaturas de incubación (Figura 12).

La actividad residual del sistema xilanolítico de las cepa 60 crecida en olote, después de mantenerse durante 24 h a diferentes valores de pH, presentaron la misma tendencia a las dos diferentes temperaturas. Lo mismo sucedió para el filtrado de la misma cepa crecida en desechos de tamarindo excepto por la actividad residual medida a pH de 4 al haberse incubado a 30°C, en donde tuvo un incremento considerable de la actividad. El comportamiento mostrado por el filtrado obtenido de la cepa 520 indica que al incubarse a 2°C se tiene menor actividad residual que a 30°C a pH de 7.

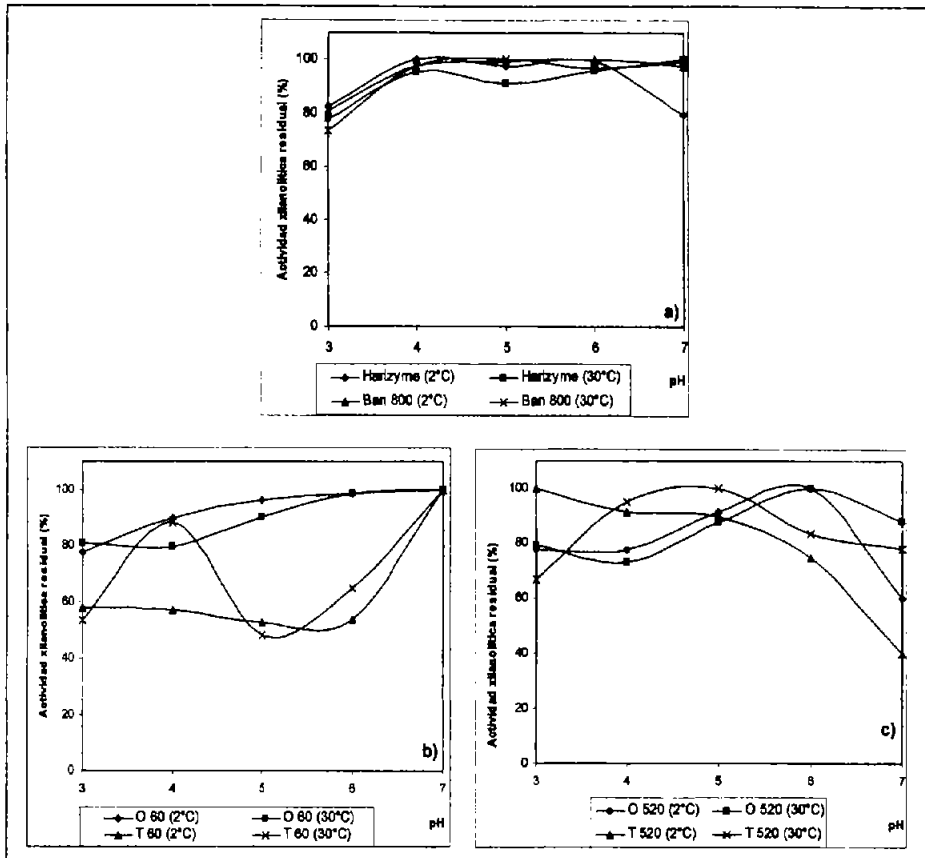


Figura 12. Estabilidad al pH de xilanasas. a) Enzimas comerciales a concentración de 20 mg/mL. b) Sistemas xilanólíticos producidos por la cepa 60 en desechos de tamarindo (T60) y olote de maíz (O60) a dos diferentes temperaturas. c) Sistemas xilanólíticos producidos por la cepa 520 en desechos de tamarindo (T520) y olote de maíz (O520). Las enzimas se incubaron durante 24 h a temperatura de 2°C y 30°C, a diferentes pHs, usando una solución amortiguadora de acetatos a 50mM de pH de 3 a 6 y solución amortiguadora tris-HCl 50 mM a pH 7. La determinación se realizó en solución amortiguadora de acetatos 50 mM.

Con el fin de observar el peso molecular y verificar la presencia de xilanasas en los filtrados y en las preparaciones comerciales se elaboraron geles de proteínas y de actividad "in situ" (Figura 13).

El perfil de proteínas de la cepa 520 en las dos fuentes de carbono presentan mayor número de bandas entre las que sobresalen las de 26, 30, 38, 40 y mayor a 51 kDa. Las proteínas con

cuando no se observaron bandas en el gel de proteínas a pesos moleculares más bajos, en el gel de actividad pudieron distinguirse xilanasas de un tamaño de 28 kDa para Harizyme y de 24 kDa para Ban 800, por los halos de hidrólisis registrados.

PRUEBAS DE PANIFICACIÓN

Para evaluar el efecto de los filtrados y de las muestras comerciales en panificación, primero se decidió elegir el tipo de harina a utilizar, probando la influencia que tenían harinas con diferente cantidad de pentosanos, en respuesta al volumen (Tabla 2).

| Tipo de harina | Cantidad de pentosanos en harina | |
|----------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Blanca | 1-2% | Kihlberg, I. <i>et al.</i> , 2003 |
| Integral | 2-3% | Morales, 1999 |

Se elaboraron panes como se describe en la metodología con 100 g de harina: 100% blanca, 100% integral y 50% blanca-50% integral.

Los resultados muestran como menciona Kihlberg I., *et al.* (2003), el uso de harina integral disminuye el volumen de la miga, aunque incrementa el valor nutricional. El pan que tuvo un mayor volumen fue el de harina 100% blanca, seguido del 50%blanca-50%integral y del 100% integral. Y en el mismo orden se obtuvo la textura de la miga (Figura 14).

Ya que el pan elaborado con harina blanca e integral dio un volumen y textura de la miga de mayor calidad al 100% integral, se decidió utilizar esta formulación para evaluar el efecto tanto de los filtrados enzimáticos como de las enzimas comerciales en la producción de pan.

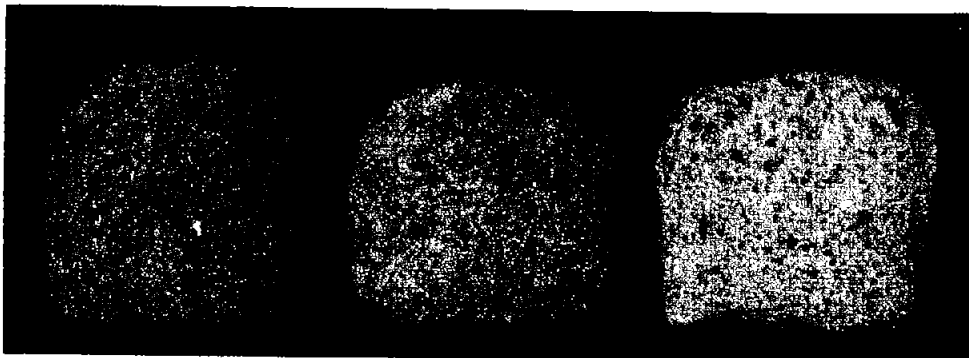


Figura 14. Textura del pan. Panes elaborados con distintos tipos de harina como se describe en la metodología a. Harina 50% integral-50% blanca, marca Tres estrellas. b. Harina 100% integral, marca Tres estrellas. c. Harina 100% blanca, marca Tres estrellas.

Primero se probaron los filtrados en una cantidad de 200 ppm con respecto a la actividad de Ban 800, para elegir cual de ellos producía mayor volumen para su posterior uso a diferentes dosis.

Los formulación tomada fue aquella con 100 g de harina 50% integral- 50% blanca.

Se detectó que los filtrados obtenidos al usar olote como fuente de carbono son los que permitieron el mayor incremento del volumen del pan con respecto al control (pan sin enzima), ver figura 15.

De acuerdo a lo anterior, las enzimas comerciales y los filtrados enzimáticos de ambas cepas crecidas en olote se evaluaron realizando una prueba de dosis-respuesta. Las dosis que se probaron en los filtrados enzimáticos crudos fueron de 50, 100 y 200 ppm (para los filtrados la dosis agregada fue con base a la actividad de Ban 800).

El volumen del pan se midió de acuerdo a lo descrito en la metodología. Los panes elaborados con los filtrados y las muestras comerciales presentaron incrementos y decrementos de volumen con respecto al control, lo cual se observa en la figura 16.

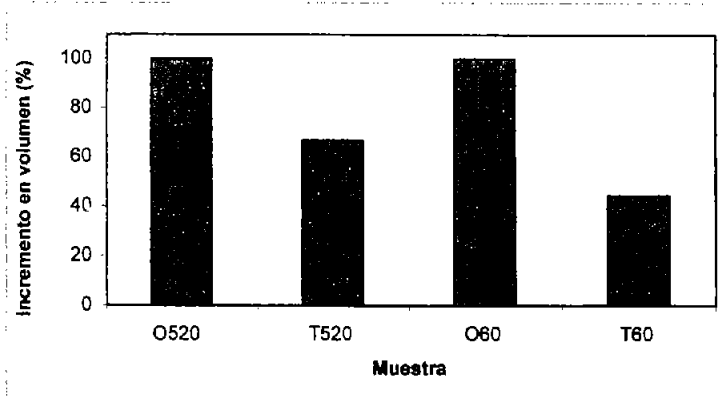


Figura 15. Efecto provocado en pan, por la adición de enzimas a una concentración de 200 ppm. Los panes fueron elaborados como se describe en la metodología con una mezcla de harina integral y blanca en proporción 50/50 (p/p). Filtrados enzimáticos obtenidos de: cepa 520 crecida en olote (O520), cepa 520 crecida en desechos de tamarindo (T520), cepa 60 crecida en olote (O60) y cepa 60 crecida en desechos de tamarindo (T60). Se tomó como 100% el máximo incremento para cada cepa solo para fines de comparación.

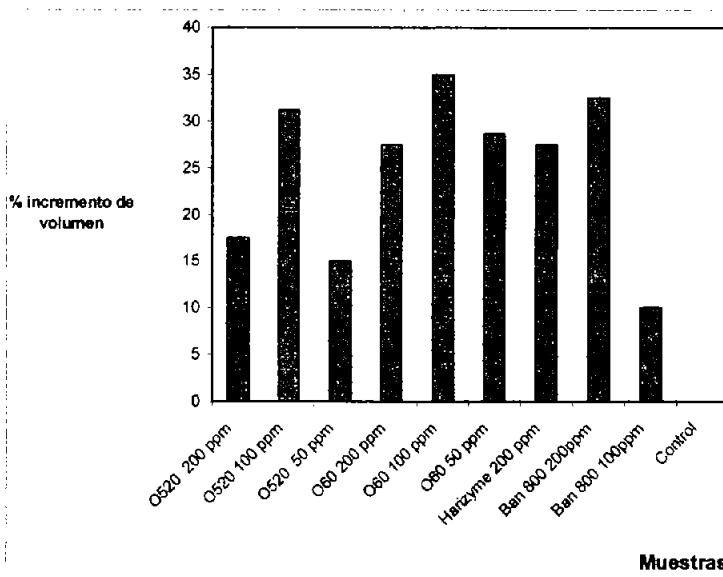


Figura 16. Incremento de volumen en los panes elaborados con los filtrados enzimáticos y las preparaciones comerciales

Al agregar enzimas a bajas dosis: 100 ppm, el volumen de los panes mejoró. Este comportamiento se ha descrito anteriormente en los trabajos de Monfort *et al.* (1996) donde mencionan que las xilanasas a dosis altas producen un excesivo ablandamiento en las masas, con una disminución en el volumen del pan.

Los panes se evaluaron sensorialmente. Las calificaciones dadas para cada dosis y cada muestra enzimática se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis sensorial de los panes, adicionados con distintas dosis de filtrado enzimático y de las muestras comerciales.

| Muestra | Dosis (ppm) | Color de la corteza ¹ | Color de la miga ² | Textura de la miga ³ | Apariencia general ⁴ |
|----------|-------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| O520 | 200 | 5 | 8 | 9 | 9 |
| O520 | 100 | 4 | 8 | 9 | 9 |
| O520 | 50 | 3 | 8 | 9 | 8 |
| O60 | 200 | 5 | 8 | 9 | 9 |
| O60 | 100 | 4 | 8 | 8 | 9 |
| O60 | 50 | 5 | 8 | 9 | 9 |
| Harizyme | 200 | 4 | 8 | 9 | 9 |
| Harizyme | 100 | 4 | 8 | 7 | 7 |
| Ban 800 | 200 | 5 | 7 | 6 | 6 |
| Ban 800 | 100 | 4 | 8 | 7 | 8 |
| Control | - | 4 | 8 | 9 | 8 |

¹ 5: muy dorado, 4: dorada, 3: ligeramente dorada.

² 9: cremada, 8: café crema, 7: café.

³ 9: muy buena, 8: buena, 7: regular, 6: pobre.

⁴ 9: muy buena, 8: buena, 7: regular, 6: suficiente.

La homogeneidad de la miga está relacionada con el incremento de volumen y en este caso se observó que el filtrado obtenido de la cepa 520 crecida en olote a cualquiera de las dosis ensayadas, si se da esta relación.

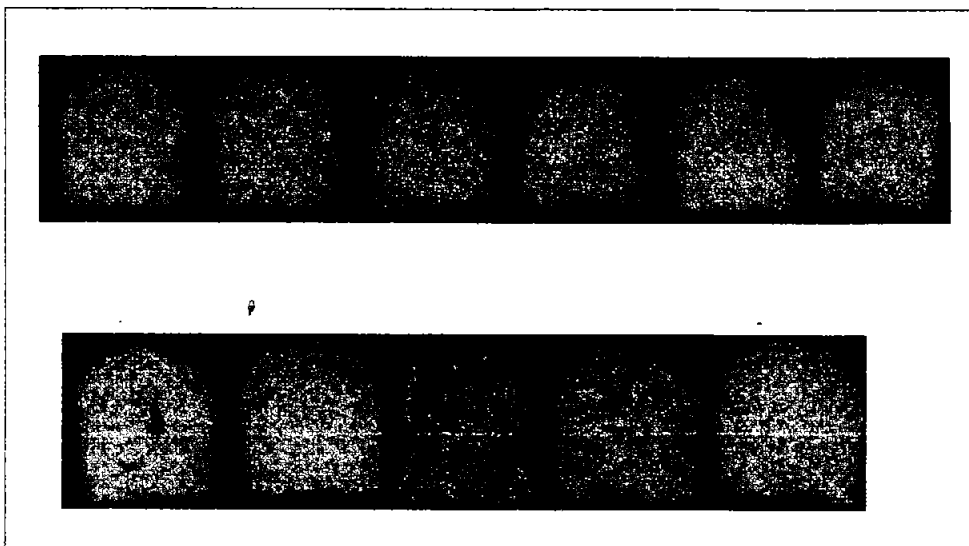


Figura 18. Textura de la miga. La enzima la cual se adicionó a cada pan se describe a continuación.

A: Filtrado de la cepa 520 crecida en olote: 200 ppm. **B:** Filtrado de la cepa 520 crecida en olote: 100 ppm. **C:** Filtrado de la cepa 520 crecida en olote: 50 ppm. **D:** Filtrado de la cepa 60 crecida en olote: 200 ppm. **E:** Filtrado de la cepa 60 crecida en olote: 100 ppm. **F:** Filtrado de la cepa 60 crecida en olote: 50 ppm. **G:** Harizyme: 200 ppm. **H:** Harizyme: 100 ppm. **I:** Ban 800: 200 ppm. **J:** Ban 800: 100 ppm. **K:** Control: sin enzima.

Si se considera como Kihlberg I., al volumen del pan como una medida de calidad en panificación entonces los panes elaborados con los filtrados son los de mejor calidad, sobre todo los adicionados 100 ppm, al compararlos con Harizyme a 200 ppm y con Ban 800 a 100 ppm.

No solo debe tomarse en cuenta el incremento del volumen como parámetro de calidad ya que la aceptación de los consumidores no solo depende de ello, sino también es importante la evaluación sensorial para determinar la calidad global del pan.

Los resultados obtenidos, muestran que la aplicación de los sistemas xilanólíticos producidos y la adición de enzimas comerciales a la formulación del pan produce modificaciones. Estas modificaciones pueden atribuirse a la degradación de los xilanos, lo cual produce una disminución en la capacidad de absorber agua, provocando con esto, que el agua no absorbida se redistribuya en los demás componentes del "sistema" masa. Sin embargo, tales cambios en la masa no son consecuencia únicamente de la hidrólisis de los xilanos debida a la acción de las xilanasas de los filtrados enzimáticos o de las preparaciones comerciales, ya que la consistencia de la masa depende de la concentración de todos sus componentes y de las interacciones que pueden producirse entre ellos.

CONCLUSIONES

- * Las cepas de *Aspergillus* FP-60, FP-440, FP-470 y FP-520 crecieron y produjeron mayor actividad xilanólítica en olote de malz.
- * La producción de sistemas enzimáticos tanto de xilanasas, pectinasas y amilasas, está relacionado estrechamente con la composición y estructura de la fuente de xilanos.
- * Las cepas blancas presentan el mismo perfil proteínico en SDS-PAGE, pero no un igual balance de actividades.
- * La características bioquímicas de estabilidad a pH y temperatura de la cepa 60 y 520 crecidos en olote y desechos de tamarindo resultaron adecuadas para su uso en panificación.
- * Las características sensoriales (color de la corteza, color de la miga, textura de la miga y apariencia general) de los panes de las masas adicionados con los filtrados enzimáticos obtenidos de la cepa 60 y 520 fueron iguales o mejores que los panes elaborados con las preparaciones comerciales. Excepto para el color de la corteza que dio el filtrado de la cepa 520 crecida en olote a 50 ppm y para la textura de la miga dada por el filtrado de la cepa 60 crecida en olote, que tuvieron una calificación menor.

ANEXO I

Fundamentos del método de tinción de yodo

Al preparar un gel con agar bacteriológico al 1% y almidón como sustrato específico al 0.1% para las enzimas amilolíticas y ser revelado con una solución de lugol (Mezcla de yodo y disolución de yoduro de potasio para la formación del triyoduro: complejo soluble) se espera que al agregarla y esperar el tiempo de incubación descrito en la metodología se forme un halo de degradación en el pozo donde se agregó la preparación enzimática cruda, si es que existe actividad amilolítica ya que las enzimas habrán hidrolizado el almidón presente en el gel o un color azul en caso de no presentar esta actividad. Lo anterior es debido a que el almidón imparte un color azul a una disolución que contenga una traza de ion triyoduro.

El yodo es retenido como un complejo de adsorción dentro de la cadena helicoidal de la macromolécula de α -amilosa, el cual da la coloración. Por tanto al no haber actividad amilolítica el color dado por el complejo I₂-almidón permanece (Skoog, 1970).

BIBLIOGRAFÍA

- Bastawde, K.B., (1992), "Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 353-368
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., (2001), "Microbial xylanases and their industrial applications: a review", *Applications of Microbiology and Biotechnology*, 56 (1), 326-338
- Biely P., Vrsanka M., Kucar S., (1992), "Identification and mode of action of endo-(1-4)- β -xylanases", *Xylans and xylanases*, J. Visser: Elsevier Science Publishers, 81- 95
- Bedford M.R. and Classen H.L., (1992), "The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chicks", *Xylans and Xylanases*, J. Visser: Elsevier Science Publishers, 361- 370
- De Vries, R.P. and Visser, J., (2001), "*Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides", *Microbiology and molecular biology reviews*, 65 (4), 497-552
- Duran N., (1994) "*Aspergillus* sp 2M1 xylanase: Production, characterization and application in the pulp and paper industry", *Advances in Bioprocess Engineering*, 489-494
- Gomes, D., Gomes, J., and Steiner, W., (1994), "Factors influencing the induction of endoxylanase by *Thermoascus aurantiacus*", *J. Biotechnology*, 33, 87-94
- Kihlberg, I., Johansson, L., Kohler, A., Risvik, E., (2003), "Sensory qualities of whole wheat pan bread-influence of farming system, milling and baking technique" *Journal of cereal science*, 39, 67-84.
- Fennema, O. R., (1993), "Química de alimentos", ED. Reverté, 134-135
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., (1999), "Molecular and biotechnological aspects of xylanases" *Microbiology reviews*, 23 , 411-459.

- Laemli, V.K. (1970), "Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage", *Nature*, 227(4), 680-685
- Lama L., Calandrelli, V., Gambacorta, A., Nicolaus, B., (2004), "Purification and characterization of thermoestable xylanase and b-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarticus*", *Research in Microbiology*, 155(4), 283-289
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos Da Silva M.J., Bosse, M., Egmond, M.R. and Hagemans, M.L.D., (1992), "Xylanases and their application in bakery", *Xylans and xylanases*, J. Visser: Elsevier Science Publishers, 349 - 360
- Mendicuti Castro, L.P., (1996), "Caracterización parcial de las xilanasas de la cepa termotolerante *Aspergillus* MGM-470 producidas a 37° y 45° C", Tesis Licenciatura, UNAM.
- Miller, G.L., (1959), "Use of dinitrosalisilic acid reagent for the determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, 31, 426-428
- Montor Herrera, O., (1986), "Aditivos usados en los procesos de panificación", Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Morales Rivera, P.F., (1999), "Utilización de xilanasas de *Aspergillus sp.*, FP-470 para el mejoramiento de la calidad de panes elaborados con harinas de bajo potencial de panificación", Tesis Maestría, UNAM.
- Stauffer, Clyde E., (1991), "Functional additives for bakery foods", Van Nostrand Reinhold, 136-151
- Skoog, Douglas and West, Donald N., Tr. Bermejo M.,F., (1970), "Fundamentos de Química Analítica". ED. Reverté, S.A., V. 2, 537-538
- Sunna, A. And Antranikian, G., (1997), "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria", *Critical reviews in Biotechnology*, 17, 39-67.
- Tucker, G.A. and Woods, L.F.J., (1995), "Enzymes in food processing" Chapman and Hall, 2nd edition, 190-221.

- Turnbull, K.M. and Rahman, S., (2002), "Endosperm texture in wheat", *Journal of cereal science*, 36, 327-337
- Van Paridon, P.A., (1992). "The application of fungal endoxylanase in poultry diets, Xylans and Xylanases, J. Visser, Elsevier Science Publishers, 371 – 378
- Wong, K.K., Tan, L.U., and Saddler, J.N., (1988), "Multiplicity of b-1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications", *Microbiological reviews*, 52 (3), 305-317