



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE RESIDUOS DE TAMARINDO COMO
FUENTE DE CARBONO PARA LA PRODUCCIÓN DE
ENZIMAS POR CEPAS DE
Aspergillus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:
MARÍA ELENA ÁLVAREZ ARRIAGA



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

m. 345423



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	EDUARDO BARZANA GARCÍA
Vocal	RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
Secretario	JOSÉ GUILLERMO DE J. AGUILAR OSORIO
1er suplente	ADRIANA CAMACHO VILLANUEVA
2do suplente	LUCIANO HERNÁNDEZ GOMEZ

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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 O.

Asesor del tema:

JOSÉ GUILLERMO DE J. AGUILAR OSORIO



Supervisor técnico:

BLANCA TREJO AGUILAR



Sustentante:

MARÍA ELENA ÁLVAREZ ARRIAGA



AGRADECIMIENTOS

Gracias.....

A Dios por acompañarme y guiarme en la vida

A mis padres Lupe y Casto por la paciencia, apoyo, comprensión, por sus consejos, ayuda y cariño que siempre me han brindado y que gracias a ellos me es posible terminar una carrera universitaria.

A mis hermanos Gra y Lalo por ayudarme, apoyarme, aconsejarme y por el cariño que me brindan.

A mis cuñados Lupe y Vidal y sobrinos Cas, Karla, Jos, Mel y Rebe por formar parte de un núcleo familiar que es de suma importancia en mi vida.

Al Dr. Guillermo Aguilar y Blanca Trejo por aceptarme en el grupo de trabajo, ayudarme, enseñarme, apoyarme y por la confianza que me brindaron en la elaboración de este proyecto y sobre todo por ayudarme a crecer.

A mis compañeros de grupo Carlos, Kari, Perlita, Irene, Melissa y Auro, por su compañía, apoyo, ayuda, críticas, la amistad brindada y por hacer un ambiente de trabajo muy agradable permitiendo así que compartiéramos buenos momentos juntos.

A mis amigos Lore, Shingú, Perla y Arturo, por escucharme, darme ánimos, ayudarme, por compartir valiosos momentos juntos tanto de estudio como de chorcha y sobre todo ofrecerme su amistad a lo largo de todo este tiempo.

A mis compañeros Hilda, Alicia, Carlos, Rene, Paco, Paty, Tania, Claudia Ahn, Dany boy, Lore Borja, Carlos Ferreira y todos aquellos con los que interactué de alguna manera pero no recuerdo en este momento ya que su presencia hizo que la estancia en la facultad fuera especial tanto en clase como fuera de clase.

A David por estar ahí cuando lo necesite, por los triunfos compartidos, su amistad y cariño brindados, por escucharme y apoyarme durante toda esta etapa de mi vida.

A mis maestros ya que gracias a su conocimiento compartido permitieron y ayudaron en mi formación académica.

A Eduardo Barzana y Raquel Ortega por su tiempo y revisión del presente trabajo.

A la UNAM y especialmente a la Facultad de Química (mi segundo hogar) por la facilidades otorgadas para la culminación de este proyecto.

Se agradece al Programa de Becas para la elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Probetel) y así mismo se agradece al apoyo parcial por los proyectos DGAPA-UNAM IN-207603 y IN-219604.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Residuos de frutas y verduras	2
II.2 Tamarindo	3
II.2.1 Descripción	3
II.2.2 Cosecha	4
II.2.3 Composición	4
II.2.4 Usos alimenticios	5
II.3 Polisacáridos de la pared celular de plantas	7
II.3.1 Celulosa	8
II.3.2 Xilano	9
II.3.3 Xiloglucano	11
II.3.4 Pectina	15
II.4 Bio-degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas	17
II.4.1 Enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular de plantas	17
II.4.2 <i>Aspergillus</i>	21
II.5 Aplicaciones industriales de las enzimas	
II.5.1 Aplicaciones de enzimas xilanolíticas	24
II.5.2 Aplicaciones de enzimas pectinolíticas	26
II.5.3 Aplicaciones de otras enzimas	28

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1	Residuos de tamarindo	30
III.2	Microorganismo	30
III.3	Selección	30
III.4	Preparación de inóculo	30
III.5	Medios de cultivo	31
III.6	Determinación de azúcares reductores	32
III.7	Determinación de actividades enzimáticas	32
III.8	Cromatografía en capa fina (TLC)	34
III.9	Purificación parcial del xilogucano de tamarindo	35
III.10	Electroforesis (SDS-PAGE) y Zimogramas (Actividad <i>in situ</i>)	35

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1	Selección	37
IV.2	Evaluación de la forma de esterilizar la fuente de carbono	44
IV.3	Evaluación de la fuente de nitrógeno	47
IV.4	Evaluación de la concentración de la fuente de carbono	50
IV.5	Degradación de otros fragmentos de la pared celular de enzimas producidas en residuos de tamarindo	52

V. CONCLUSIONES 63

VI. REFERENCIAS 65

I. 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, como materia prima para la producción de energía y producción química (colorantes, ácido orgánicos, enzimas, saborizantes, etc) (Blandino et al, 2001).

En este contexto la industrialización de frutas; constituidas por hidratos de carbono; que incluye almidones, pectina, azúcares y otros polisacáridos; poca cantidad de proteínas y grasas, algunas vitaminas, minerales y agua; generan desechos que bien pueden aprovecharse para la producción de productos de alto valor agregado por vía microbiana.

La utilización de frutas o sus residuos como material de inicio de una fermentación, permite la producción de compuestos de interés para su uso posterior, a través de un proceso más limpio y con menor agresividad para el medio ambiente. Entre estos compuestos destacan las enzimas.

Entre las enzimas de interés se encuentran las proteasas, lipasas, amilasas, así como también las enzimas que degradan polisacáridos de la pared celular de plantas como son: celulasas, pectinasas, xilanasas, entre otras. Las polisacaridas pueden ser producidas por bacterias, levaduras, hongos, protozoarios, insectos, nematodos y plantas (Parenicová, 2000). Pero para propósitos industriales los hongos son preferidos porque en un 90% las enzimas pueden ser excretadas al medio de cultivo. Específicamente, el genero *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Trichoderma* son las principales fuentes para la producción de sistemas enzimáticos que degradan los polisacáridos de la pared celular de plantas (Blandino et al, 2001).

El interés de las polisacaridas radica en la utilización de éstas en la industria de los alimentos para consumo humano y animal; en bebidas permiten que aumenten los rendimientos, mejore la licuefacción, clarificación y filtración de jugos y vinos, maceración y extracción de tejidos de plantas (Parenicová, 2000).

Se ha reportado que las síntesis de estas enzimas se ven fuertemente influenciadas por los componentes presentes en el medio de cultivo, particularmente la fuente de carbono. Otro factor importante para la síntesis de estas enzimas es la presencia de inductores en el medio de cultivo (Blandino et al, 2001).

El presente estudio tendrá como propósito evaluar la semilla y bagazo de tamarindo como fuente de carbono para el crecimiento de cinco cepas tropicales autóctonas de *Aspergillus* y determinar la capacidad

de cada cepa para producir enzimas que degraden los polisacáridos presentes (pectina, celulosa, xiloglucano, ramnogalacturonano, xilano, etc.).

II. ANTECEDENTES

II.1. Residuos de Frutas y Verduras

Grandes cantidades de desperdicios líquidos y sólidos son producidos anualmente en el procesamiento de muchas y diferentes tipos de frutas y verduras. Más de 80 billones de galones de agua de desperdicio y 9 millones de toneladas de residuos sólidos se generan anualmente por la industria de frutas y verduras procesados solamente en los Estados Unidos. Aproximadamente el 79% de los residuos sólidos de frutas y verduras es usado como alimentos para ganado y el 21% es tratado como residuo en este país. Aunque no en todos los países se hace uso de los residuos generados por el procesamiento de frutas y verduras.

Dentro del procesamiento de los residuos de las frutas y verduras los principales puntos que contribuyen al agua y sólidos de desecho son: lavar, pelar, cortar, rebanar, generación de pulpa, prensado, cocinar, enlatado y limpieza de la planta (Chambers, 2000).

Para reducirse la carga de la contaminación del procesamiento de frutas y verduras, se puede empezar desde la planta, a través del desarrollo y mejora de los métodos de procesamiento a través del tratamiento y re-uso en la planta; o bien se les puede dar uso a los desechos (Chambers, 2000).

La mayoría de los residuos de frutas y verduras son ricos en materia orgánica biodegradable y la eliminación de estos materiales pueden causar problemas de contaminación ambiental. Afortunadamente existen alternativas de uso para este tipo de materiales. Por ejemplo:

- a) Alimento para ganado. La mayoría de los residuos sólidos generados del procesamiento de frutas y verduras se usan para alimento para ganado. Pueden ser consumidos frescos, como forraje o como sólido seco.
- b) Ingredientes alimenticios naturales. A partir de los residuos de frutas y verduras se pueden aislar compuestos como: pectina, celulosa, xilano, xiloglucano, galactomananos, etc.
- c) Biocombustible. Se puede generar a partir de los residuos por vía fermentación microbiana biocombustibles como son: metano, etanol, etc.

- d) Enzimas. Las enzimas de importancia comercial pueden ser extraídas directamente de los residuos de frutas y verduras, o bien pueden ser utilizados como fuente de carbono para la producción de enzimas vía fermentación microbiana (Chambers, 2000).

El tratamiento de los residuos por vía microbiana se basa en la biodegradación de las sustancias orgánicas presentes en estos y trae consigo varias ventajas como son: 1) disminución en el volumen de residuos orgánicos, 2) el peligro biológico ambiental es controlado y puede ser compatible con otros sistemas (Llyn et al, 2004).

El tamarindo es una de las frutas que se utiliza para el procesamiento de diversos productos y genera como residuos: fibras, semillas de tamarindo, la membrana que cubre las semillas, cáscaras y pulpa. Los cuales bien pueden ser utilizados para su uso en producción de enzimas por vía microbiana gracias a su composición rica en carbohidratos, proteínas y lípidos.

II. 2. Tamarindo

El Tamarindo (*Tamarindus indica L.*) pertenece a la familia de las leguminosas. Es probablemente nativa del Este de África y fue introducida en la India, donde fue rápidamente adoptado y cultivado. Crece abundantemente en los campos secos en el sur y centro de la India y también en los países del sureste de Asia. En México existen cerca de 4,400 hectáreas de tamarindo, la mayoría se encuentran en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Oaxaca y Veracruz (Morton, 1987; Salunkhe and Kadam, 1995).

II. 2.1 Descripción



Fig. II.1. Tamarindo (vainas, semillas, pulpa, jugo) (Gunaseena, 2004)

Los frutos son irregularmente curvados y abultados (Fig. II.1), crecen en gran abundancia en las ramas y tienen un largo entre 5 –17.8 cm y un diámetro de 2 – 3.2 cm. Las vainas maduras son de color café-canela o café grisáceo externamente y la pulpa es ácida y color café o café-rojizo. Los frutos pueden contener de 1-12 semillas, las cuales son duras, café-brillantes, algo cuadradas en la forma,

con diámetro de 1.1 – 1.25 cm y cada una esta rodeada de una membrana (Morton, 1987).

II. 2.2 Cosecha

Un árbol maduro (las semillas comienzan a producirse del 4º al 5º año según sean las condiciones climáticas y de suelo) puede producir anualmente entre 150-225 Kg. de fruta (Morton, 1987).

II. 2.3 Composición

Las vainas de tamarindo contienen: entre 30-55% de pulpa, 11-30% de cáscara y fibra y entre 33-40% de semillas. La composición química de la fruta de tamarindo se muestra en la tabla II.1.

II. 2.3.1 Pulpa

La composición de la fruta es variable y depende de la localidad. El tamarindo tiene un bajo contenido de agua y un alto nivel de carbohidratos (60-72%) y minerales. El contenido de sólidos solubles varía de 54 – 69,9º Brix.

Tabla II.1 Composición Química de la fruta de tamarindo

Componente	Cantidad (por 100g)
Agua	17.8 – 35.8 g
Proteína	2 – 3 g
Grasa	0.6 g
Carbohidratos	41.1 – 61.4 g
Fibra	2.9 g
Cenizas	2.6 - 3.9 g
Calcio	34 - 94 mg
Fósforo	34 - 78 mg
Hierro	0.2 - 0.9 mg
Tiamina	0.33 mg
Riboflavina	0.1 mg
Niacina	1.0 g
Vitamina C	44 mg

(Coronel, 1991; Feungchan et al, 1996)

La pulpa contiene aceite, que es líquido a temperatura ambiente. La principal característica del tamarindo es su acidez y esto es debido principalmente a su contenido de ácido tartárico que varía de 12.2 – 23.8 %, lo que es 12.2 – 23.8 %, lo que es poco común en otras plantas. En general, la pulpa de tamarindo seca contiene 8 – 18% de ácido tartárico (como bitartrato de potasio) y 25 – 45% de azúcares reductores de los cuales 70% es glucosa y 30% fructosa (Gunasena, 2004).

II. 2.3.2 Semilla

La semilla comprende la cubierta o testa (20– 30%) y la semilla o endospermo (70 – 75%). La semilla completa es rica en proteína (13 – 20%), y la cubierta de la semilla es rica en fibra (20%) y en taninos (20%) (Tabla II.2). El 20% de los azúcares solubles son pentosas; principalmente manosa (17-35%) y glucosa (11.80%) (Gunasena, 2004).

Tabla II.2. Composición de la semilla de tamarindo, endospermo y testa (%)

Componente	La semilla entera	Endospermo de la semilla	Testa
Humedad	9.4-11.3	11.4-22.7	11.0
Proteína	13.3-26.9	15.0-20.9	
Grasa/ aceite	4.5-16.2	3.9-16.2	
Fibra cruda	7.4-8.8	2.5-8.2	21.6
Carbohidratos	50-57	65.1-72.2	
Cenizas totales	1.6-4.2	2.4-4.2	7.4
Azúcares reductores	7.4		

(Anon, 1976; Morad et al, 1978; Ishola et al, 1990; Bhattacharyya et al, 1994)

II. 2.4 Usos alimenticios

El tamarindo es una fruta versátil que puede ser usada para muchos propósitos. Su peculiar sabor dulce/ácido de la pulpa es popular para cocinar y dar sabor.

II. 2.4.1 Pulpa

El valor de la fruta y pulpa de tamarindo radica en su uso en una gran variedad de propósitos tanto domésticos como industriales. Comúnmente la fruta es removida de la vaina y es usada para preparar jugo,

mermeladas, jarabes, dulces y salmueras. También es usada como ingrediente favorito en preparaciones culinarias como: curries, salsa, chutney (salsa tipo aderezo), helado y para sazonar arroz cocido, carne, pescado y salsas para el pato.

En la India, el jugo es usado para preservar el pescado cuando se mezcla con ácido acético, permitiendo que la vida de anaquel alcance los 6 meses. En varios países a través del mundo se utiliza la pulpa de tamarindo para preparar una bebida refrescante. La mayoría de los países que manufacturan bebidas comercialmente, a veces usan el jugo de tamarindo para fermentarlo y producir una bebida alcohólica como es el vino.

Industrialmente se manufacturan diversos productos como: jugo de tamarindo concentrado, pulpa de tamarindo en polvo, ácido tartárico, tartratos y alcohol (Gunasena, 2004).

II. 2.4.2 Semilla

Las semillas de tamarindo son un subproducto de la utilización comercial de la fruta, sin embargo esta tiene varios usos. En el pasado, la semilla era desperdiciada. En 1942, dos científicos hindúes Ghose, T.P y Krishna, S., anunciaron que la semilla decortificada contenía una sustancia que formaba geles (46 –48%). Lo llamaron jelliosa o poliosa. La sustancia gelifica con concentrados de azúcar sin adición de ácido e incluso agua y leche (Savur,1948). Es recomendado como estabilizador de helado, mayonesa, queso y como ingrediente en un gran número de productos farmacéuticos (Morton, 1987). En la actualidad, se conoce cual es el carbohidrato presente en la semilla de tamarindo y se trata del xiloglucano, este polisacárido ahora es conocido comercialmente como goma de semilla (Fry, 1989).

Las semillas también pueden ser ingeridas después de la remoción de la testa ya sea tostándolas o cocidiéndolas, también son utilizadas en forma de harina como adulterante de café y ocasionalmente para hacer pan (Purseglove, 1987). La proteína de la semilla de tamarindo muestra un alto nivel de digestibilidad *in vitro* y es rica en algunos amino ácidos esenciales, por lo que puede ser un buen suplemento de cereales y legumbres. Por lo tanto la semilla podría ser usada como una fuente barata de proteína para aminorar la malnutrición de proteína, la cual es muy común en países poco desarrollados (Sidduraju et al, 1995).

También son usadas como alimento para ganado. Sin embargo es difícil de degradar principalmente por la testa, por lo que es necesario removerla. Aunque para los pollos no es recomendable, porque no logran asimilar este alimento por la presencia del xiloglucano en la semilla; pero para los puercos si se recomienda.

Industrialmente la semilla se usa para manufacturar el polvo de semilla de tamarindo (TKP) el cual mezclado con agua que contiene ácido bórico y fenol sirve como adhesivo para papel. También de éste se hace la

extracción de xiloglucano; y se usa para la producción microbiana de lípidos y como fuente de extracción de taninos (Gunasena, 2004).

II. 3. Polisacáridos de la pared celular de plantas

La pared celular de las plantas esta compuesta predominantemente de polisacáridos, los cuales son los componentes orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza y por ende se encuentran en los desechos generados en el procesamiento de frutas y verduras. Estos se dividen en 3 grupos principalmente: celulosa, hemicelulosa y pectina (Fig. II. 2).

La celulosa es el principal constituyente de la pared celular. Se trata de un polímero lineal de residuos de 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.

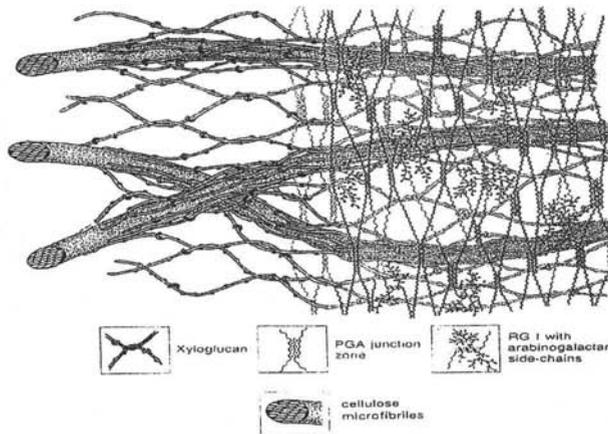


Fig. II.2. Estructura de la pared celular de la mayoría de las plantas. Las microfibrillas de la celulosa están intercaladas con polímeros de xiloglucano envueltos en una matriz de polisacáridos pecticos, ácido poligalacturónico y ramnogalacturonano (Parenicová, 2000)

La hemicelulosa es el polisacárido más heterogéneo y es la segunda estructura más abundante en la pared celular y se encuentra almacenado en las semillas (Bastwade, 1992). Su composición química consta de pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (glucosa, manosa, y galactosa), ácidos urónicos (galacturónico y

glucorónico) y algunos desoxiazúcares (Hernández, 1995). El principal polímero de hemicelulosa en cereales es el xilano; heteropolisacárido constituido por unidades de D-xilosa, unidas por enlaces β -1,4, que puede estar sustituido por residuos de L-arabinosa, D-galactosa, acetilos, ácido glucurónico, ferúlico y p-cumarílico. El segundo polímero más importante encontrado en la hemicelulosa es el glucomanano, que consiste de unidades de D-manosa y D-glucosa, unidas por enlaces β -1,4 y sustituidas con residuos de D-galactosa (De Vries, 1999). Otro componente hemiceluloso es el xiloglucano, constituido por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 y sustituidas por unidades de D-xilosa. Pueden estar unidos a la xilosa residuos de L-arabinosa y D-galactosa y se han detectado algunos residuos de L-fucosa en la galactosa (De Vries and Visser, 2001).

Las sustancias pécticas forman otro grupo de heteropolisacáridos, constituidos por una cadena de residuos de ácido D-galacturónico, unidos por enlaces β -1,4 y residuos de ramnosa unidos por enlaces α -1,2 (De Vries, 1999).

II. 3.1 Celulosa.

II. 3.1.1 Estructura

La celulosa es un agregado de polímeros lineales de residuos D-glucopiranosil en forma de cadena, los cuales están unidos en una configuración β -1,4 (Fig. II.2). Esta configuración resulta en una estructura lineal rígida de celulosa. La abundancia de los grupos hidroxil permite que se formen puentes de hidrógeno tanto inter- como intramoleculares lo que contribuye a la agregación lineal y a la resistencia de este polisacárido. Así mismo contribuye en la insolubilidad de la celulosa con solventes comunes, particularmente agua. El grado de polimerización (DP) de la celulosa varía según la fuente de extracción, pero va desde 300 en el algodón purificado hasta 6500 en el revestimiento de algodón. Aun cuando la celulosa es un polímero muy ordenado, existen zonas amorfas en las cuales los grupos hidroxilo reaccionan con mas facilidad que en las zonas cristalinas (Coffey, 1995; De Vries and Visser, 2001).

II. 3.1.2 Aplicaciones

Actualmente la celulosa es la base de muchos productos de interés industrial (papel, fibras, aditivos, aplicaciones energéticas, etc); así como la materia prima para los derivados de esta. Los derivados celulósicos

constituyen uno de los grupos poliméricos más utilizados en las industrias de cosmética, alimentación, farmacéutica y textil, así como en las industrias de fabricación de acetatos, pinturas, embalajes o ceras. Se pueden encontrar en el mercado dentro de una gran variedad de productos con un amplio margen de propiedades fisicoquímicas. Destacan entre otras, la utilización de estos como: 1) componente de pastillas (aglomerantes, material de relleno, etc.); 2) reguladores de viscosidad en preparados semisólidos y en fórmulas en suspensión (cremas, geles, lociones, suspensiones, champús, acondicionadores de cabello, productos alimenticios, pinturas, tintas, ceras y barros especiales, etc.); 3) agentes enmascaradores de sabores y olores; 4) portadores para cosméticos y formulaciones tópicas; 5) materia prima para la fabricación de plásticos, hilos o ropa (Barba, 2002).

Entre los éteres de celulosa el más importante es la carboximetilcelulosa (CMC), es soluble en agua y su producción anual mundial en el 2000 se calcula en 277,000 toneladas. Esta tiene usos en la industria de la construcción, detergentes, industria papelerá, agricultura, adhesivos, cosméticos, industria textil, industria farmacéutica, alimentos, etc. (Barba, 2002).

Dentro del área de los alimentos es utilizada como agente auxiliar en el batido de helados, cremas y natas, como auxiliar para formar geles en gelatinas y pudines, como espesante en aderezos y rellenos, como agente suspensor en jugos de frutas, como coloide protector en emulsiones y mayonesas, como agente protector para cubrir la superficie de las frutas y estabilizador en productos listos para hornear. La CMC tiene la propiedad de no causar sinéresis del agua a temperaturas de congelación, por lo que se utiliza como estabilizador en alimentos congelados (mezcla de carnes, pescado y vegetales). La CMC para evitar la cristalización es utilizada en la fabricación de helados y productos derivados del azúcar como mieles. Debido a que la CMC no es metabolizada por el cuerpo humano ha sido aprobada su utilización en alimentos bajos en calorías (Barba, 2002).

II. 3.2 Xilano.

II. 3.1.1 Estructura

El xilano es un heteropolímero que consiste principalmente de D-xilosa como unidad monomérica y trazas de L-arabinosa y ácido glucurónico. En plantas, el xilano se encuentra situado entre la lignina y por debajo de las fibras de celulosa; y parece estar entrelazado y covalentemente unido a varios puntos con la lignina, mientras produce una capa alrededor de la celulosa vía puentes de hidrógeno. Al parecer con estas interacciones el

xilano puede ser importante para mantener la integridad de la celulosa y ayuda a proteger las fibras en contra de la degradación de celulasas (Beg et al, 2001).

La estructura del xilano difiere fuertemente dependiendo del origen, pero siempre tiene una cadena principal de residuos de D-xilosa unidos por enlace β -1,4. El xilano de cereales contiene grandes cantidades de L-arabinosa y por lo tanto se refieren a este como arabinoxilano, mientras que el xilano de madera dura se le refiere como glucuronoxilano debido a la gran cantidad de ácido glucurónico que esta unido a la cadena principal (Fig. II.3).

La arabinosa en el arabinoxilano esta conectada a la cadena del xilano vía enlace α -1,2 o α -1,3 ya sea como un solo residuo o en una cadena corta, con una incidencia de aproximadamente un 12% en los residuos de xilosa. Estas cadenas laterales también pueden contener xilosa unida a la arabinosa por enlace β -1,2 y galactosa que también puede estar unida a la arabinosa pero por enlace β -1,5 o por β -1,4 a la xilosa. También se han encontrado residuos aromáticos (feruloil y p-coumaroil) unidos en el O-5 de los residuos terminales de arabinosa (De Vries, 1999).

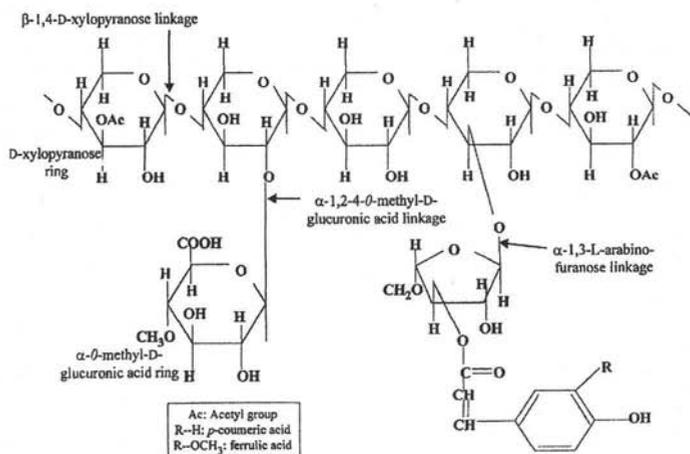


Fig. II.3. Una estructura hipotética del xilano de las plantas mostrando diferentes grupos sustituyentes con los sitios que atacan las xilanasas microbianas. (Beg et al, 2001)

En el glucuronoxilano el ácido glucurónico y su 4-O-metil éter están unidos al xilano por enlace α -1,2 y se presenta en la xilosa cada 10 residuos. Este tipo de xilanos están altamente acetilados y esta acetilación es más frecuente en el C-3 que en el C-2. La presencia de estos grupos acetil son los responsables de la solubilización parcial del xilano en H₂O y pueden ser removidos cuando el xilano esta expuesto a una extracción con álcali (Beg et al, 2001).

II. 3.2.2 Aplicaciones

Actualmente, los principales productos finales del xilano de importancia son el furfural y el xilitol. La producción del furfural es a partir de residuos de agricultura , mientras que el xilitol es obtenido a partir de residuos de madera. Los productos de hidrólisis del xilano (xilosa y oligosacáridos) tienen posibles aplicaciones en la industria de alimentos como espesante o como sustituto bajo en calorías y como aditivos anticongelantes en alimentos. En la industria farmacéutica el xilano es apropiado para usar como agente directo para tabletas y en combinación con otros componentes, puede ser usado en tabletas de liberación prolongada. Los productos de hidrólisis pueden ser a su vez ser convertidos en combustible líquido, solventes y edulzantes artificiales de bajo contenido calórico (Kulkarni et al, 1999).

II. 3.3 Xiloglucano.

II. 3.3.1 Estructura

El xiloglucano (XG) es el componente hemicelulósico mayoritario en dicotiledóneas y en monocotiledóneas no-gramináceas de la pared celular de plantas y constituye entre 20-25% del peso seco de la pared con un peso molecular de 115,000 a 2,500,000 Da. Está presente uniformemente a través de el grosor de la pared primaria y lamina media (Fry, 1989). La estructura química y la distribución molecular de las cadenas de XG varía entre los diferentes tejidos y especies de las plantas (Pauly et al, 1999). Pero su estructura general consiste en una cadena principal químicamente idéntica a la celulosa; una cadena polimérica de β -1,4-glucano. Se ha reportado que la longitud de las cadenas de XG de dicotiledóneas es de 0.15-1.5 μ m de largo, cada residuo de glucosa contribuye 0.5 nm de largo (O'Nelly and Selvendran, 1983). Los residuos de glucosa se encuentran parcialmente sustituidos (entre 60 a 75%) por residuos de α -D-xilopiranososa en el O-6. Alrededor del 30-50% de los residuos de xilosa están β -D-galactosilados en el O-2, aunque en algunas

ocasiones están sustituidos por residuos de L-arabinofuranosa por un enlace α -1,2 y esta a su vez puede estar sustituida por un residuo de L-arabinosa por un enlace α -1,3 (Fry, 1989; York and Eberhard, 2004). La L-arabinosa ocasionalmente también puede estar unida a la cadena principal de glucosa con el mismo tipo de enlace que a la xilosa (De Vries and Visser, 2001). También se ha encontrado que en algunos residuos de galactosa tienen unido por enlace α -1,2 una L-fucopiranososa o un residuo de galactosa. Así mismo se ha observado la presencia de grupos acetilo que pueden estar en galactosa ya sea uno o dos en posición 6,3 o 4; pero si el XG es extraído por álcali no presentara ninguno (Fry, 1989; De Vries and Visser, 2001; York and Eberhard, 2004).

G = -4)- β -D-Glcp-(1-

X = α -D-Xylp-(1-6)- β -D-Glc-(1-

L = β -D-Galp-(1-2)- α -D-Xylp-(1-6)- β -D-Glc-(1-

S = α -L-Araf-(1-2)- α -D-Xylp-(1-6)- β -D-Glc-(1-

F = α -L-Fucp-(1-2)- β -D-Galp-(1-2)- α -D-Xylp-(1-6)- β -D-Glcp-(1-

T = α -L-Araf-(1-3)- α -L-Araf-(1-2)- α -D-Xylp-(1-6)- β -D-Glc-(1-

J = α -L-Galp-(1-2)- β -D-Galp-(1-2)- α -D-Xylp-(1-6)- β -D-Glc-(1-

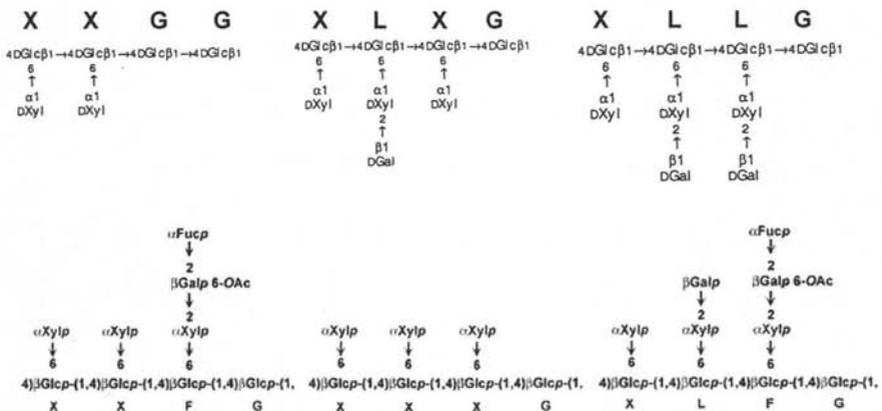


Fig. II.4. Tipos de unidades de los oligosacáridos estructurales del Xiloglucano presentes en la pared celular de las plantas (York and Eberhard, 2004; Marry et al, 2003, Fry et al, 1993).

Se han identificado varias unidades estructurales del xiloglucano, por análisis de oligosacáridos del XG que son generados a través de la digestión del polímero con endoglucanasa. Las principales unidades son de dos tipos: XXXG y XXGG (Fig. II.4). Para simplificar la manera de nombrar las cadenas laterales del XG se usa una sola letra (Nomenclatura Fig. II.4) (Fry et al, 1993; York and Eberhard, 2004):

El XG más caracterizado es el de la semilla de tamarindo, el cual es conocido comercialmente como goma de semilla (Grant and Edwards, 1995). Este xiloglucano presenta oligosacáridos de tipo XXXG, XLXG, XXLG y XLLG (Marry et al, 2003; Sulová et al, 2001), se observa que el XG de la semilla de tamarindo no presenta residuos de fucosa, mientras que el XG de residuos de manzana si los presenta (Vincken et al, 1997; Watt et al, 1999).

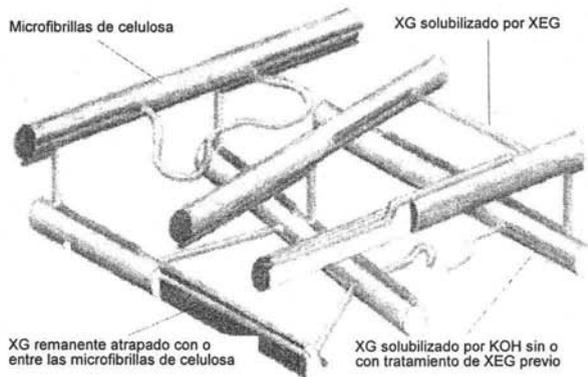


Fig. II.5. Modelo que muestra los tres dominios del XG de acuerdo a su extracción de la red de XG/celulosa (Pauly et al, 1999)

El xiloglucano está fuertemente asociado con la celulosa, de tal manera que forma puentes de hidrógeno con las microfibrillas de celulosa, lo cual contribuye con la integridad estructural de la red de celulosa, (Coffey, 1995; Fry, 1989) y además hay una proporción de XG que esta covalentemente unida a la pectina (Thompson and Fry, 2000). Sin embargo, poco se sabe acerca de la organización macromolecular del XG en la pared celular. En tallos de chicharo existen modelos que predicen la presencia de 3 dominios del XG en la pared celular de plantas: (1) aproximadamente un 8% del peso seco de la pared celular consiste en XG que se obtiene en forma soluble por tratamiento con xiloglucan-endoglucanasa (XEG), lo que propone que este dominio forma entrecruzamientos entre las microfibrillas de la celulosa, (2) otro 10% de la pared celular corresponde al XG que puede ser solubilizado por KOH concentrado una vez que se ha tratado inicialmente la

pared celular con XEG; este segundo dominio se propone esta asociado no covalentemente a la superficie de las microfibrillas de la celulosa, (3) y otro 3% corresponde al XG que se libera por tratamiento con celulasa del material residual obtenido después de los tratamientos anteriores, se propone que este material de XG esta atrapado con o entre las microfibrillas de celulosa y es el tercer dominio (Fig. II.5) (Pauly M, et al., 1999).

Además de ayudar en la integridad de la pared celular, el XG también sirve como polisacáridos de reserva de algunas semillas (Edwards et al, 1985). Las semillas de estas plantas tienen una pared celular gruesa conteniendo una gran cantidad de XG, que normalmente en la pared celular de otras plantas esta en modestas cantidades. Por ejemplo: *Tropaeolum*, tamarindo, *Impatiens* y *Annona* (todas dicotiledóneas). Después de la germinación, el XG desaparece y la pared celular del cotiledón esta delgada (Fry, 1989).

II. 3.3.2 Aplicaciones

El polisacárido de la semilla de tamarindo tiene la habilidad de formar geles en presencia de azúcar o alcohol. En este contexto, tiene propiedades y características similares a los de la pectina de frutas, por lo tanto puede ser usado para hacer mermeladas (se ha visto que el XG al 2% puede sustituir el 1% de pectina), jaleas y conservas. Aunque a diferencia de la pectina, el XG también forma geles a pH neutro. Aparte de los productos mencionados, también se ha usado en confitería, aderezos salados, mayonesa y postres congelados como helado (Marathe et al, 2002)

El XG se disuelve en agua produciendo una solución altamente viscosa, pero la gelificación no se lleva a cabo a menos de que otra sustancia sea agregada; por ejemplo con la adición de etanol se forman geles termoreversible a bajas temperaturas. El XG degradado enzimáticamente forma geles cuando se ha removido aproximadamente un 50% de los residuos de galactosa, usando β -galactosidasa (Reid et al, 1988), aunque también se ha reportado que con aproximadamente 35% de residuos de galactosa removidos del XG de tamarindo usando una β -galactosidasa fúngica se encontraron dos puntos de transición solución-gel termoreversibles, uno a temperatura alta y otro a baja (Shirakawa et al, 1998).

El XG también puede ser utilizado como agente espesante o modificador de textura y como fuente de oligosacáridos biológicamente activos (Watt, D.K., et al., 1999).

Actualmente el único XG de semilla explotado comercialmente es obtenido de la semillas del árbol de tamarindo, que puede ser extraído con soluciones concentradas de hidróxido de sodio o potasio; pero el bajo contenido de celulosa permite que el XG presente en las semillas, sea fácilmente extraído con agua (Watt et

al, 1999). Es sabido que el polisacárido de la semilla de tamarindo tiene aplicaciones en el área de los alimentos, aunque en Europa y en Estados Unidos su uso no es muy común, probablemente debido a el incremento en la producción de las gomas de galactomananos. Sin embargo, en Japón si es usado en productos alimenticios (Grant and Edwards, 1995).

El XG de la semilla de tamarindo no ofrece mayores ventajas cuando se utiliza con otros polisacáridos que las que ofrece la goma guar. Sin embargo el precio en el mercado de la harina de goma de semilla de tamarindo es usualmente menor que la harina de la goma guar, indicando que un bioproceso para la degradación parcial del polisacárido de tamarindo podría ser comercialmente viable (Grant and Edwards, 1995).

II. 3.4 Pectina

II. 3.4.1 Estructura

La pectina es un heteropolisacárido que se encuentra en la lamina media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. La pectina funciona como pegamento que sostiene los otros polisacáridos de la pared celular, como la celulosa, hemicelulosa (ejemplo: xiloglucano o arabinoxilano) y proteínas como la glicoproteína rica en hidroxiprolina. La composición depende no solo de la especie sino también en el tejido, etapa de crecimiento, maduración y las condiciones de crecimiento. Las pectinas son muy heterogéneas tanto en la estructura química como en el peso molecular (Parenicová, 2000).

La pectina contiene dos diferentes regiones: la región lisa y la región peluda. La región lisa también llamada homogalacturonano (HG), consiste en una cadena principal de residuos de ácido D-galacturónico (GalA) unidos por enlace α -1,4, los cuales pueden estar acetilados en el O-2 o O-3, o metilados en el O-6. Típicamente las cadenas de HG están formadas por 100 – 200 unidades de GalA y es la región más abundante de la pectina. Una modificación que se puede encontrar en este dominio es la sustitución en C-3 del GalA con residuos de xilosa, produciendo xilogalacturonano (XGA). En la región peluda se han identificado dos regiones: el ramnogalacturonano I (RG I) y el ramnogalacturonano II (RG II). El RG I esta formado por unidades del disacárido (1 \rightarrow 2) α -L-ramnosa-(1 \rightarrow 4)-ácido α -D-galacturónico. Este disacárido está unido con unidades idénticas por enlaces α -1,4 formando cadenas de aproximadamente 100 unidades. En general, del 20 a 80% de los residuos de ramnosa pueden estar unidos cadenas largas (entre 50 o más residuos) de arabinano y

galactano al O-4. Las cadenas de arabinano consisten en una cadena de residuos de L-arabinosa unidos por enlace α -1,5, la cual a su vez puede estar sustituida por residuos de L-arabinosa unidos por enlace α -1,3 y residuos feruloil unidos al O-2 de la arabinosa. Las cadenas laterales de galactano contienen residuos de D-galactosa unidos por enlace β -1,4, los cuales pueden estar sustituidos por residuos feruloil en el O-6. El RG II también es una región ramificada, formada por residuos de GalA unidos en α -1,4, substituidos con cadenas heteropoliméricas que contienen hasta 11 diferentes azúcares incluyendo apiosa, 2-O-metil-xilosa, 2-O-metil-fucosa, ácido acerínico y ácido 2-ceto-3-dosoxi-D-mano-octulosónico. Al parecer tanto el RG I y el RG II están unidas al HG (Willats et al, 2001; De Vries and Visser, 2001).

II. 3.4.2 Aplicaciones

Actualmente, las principales fuentes comerciales para la extracción de pectina son los residuos de manzana y cáscaras de cítricos. Esta es extraída con agua acidificada caliente y seguida de un proceso químico o enzimático (usando pectinasas). Las pectinas son usadas en muchas industrias por su habilidad de formar geles. Sus aplicaciones van desde agente gelificante, espesante, modificador de textura, emulsificante, estabilizador, azúcar sustituto en alimentos de bajas-calorías y como componente en varias medicinas.

El grado de polimerización (DP) y el grado de metilesterificación (DE) determina las condiciones de uso. El DP de la molécula de pectina varía de unos cuantos cientos a 1000 unidades de sacáridos, lo que corresponde a un peso molecular de entre 50,000 a 150,000. De acuerdo al grado de metilesterificación de los residuos de ácido galacturónico, la pectina se clasifica de bajo (25-50%) y alto (50-80%) metoxilo. La pectina de bajo metoxilo (LM) se obtiene a partir de la de alto metoxilo (HM), usualmente con un tratamiento en condiciones ligeramente alcalinas o ácidas. En el caso de que se use amonio, la pectina de bajo metoxilo puede contener algunos grupos amida en el C-6 de las unidades de GalA. El grado de metilación determina las propiedades para formar geles de la pectina. La pectina de bajo metoxilo forma geles en presencia de Ca^{2+} , en un amplio rango de pH (1.0-7.0 o más alto). La pectina de alto metoxilo requiere de la presencia de sacarosa a una concentración mayor a 55% en peso y un rango de pH estrecho (alrededor de 3.0), para la formación de geles (Parenicová, 2000).

Aproximadamente 80% de la producción de pectina de alto metoxilo en el mundo se utiliza para la manufactura de mermeladas y jaleas. Otras aplicaciones son en bebidas concentradas de frutas y jugos de fruta. La pectina de HM previene la formación de grumos de caseína en lácteos acidificados. La pectina de LM

en combinación con carragenina se usa para hacer mermeladas bajas de azúcar y preparaciones de fruta para yogurt para los diabéticos (Parenicová, 2000).

II. 4. Bio-degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas

La degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas es llevada a cabo por microorganismos, que o bien se encuentran libres en la naturaleza o como parte del tracto intestinal de animales. Debido a la heterogeneidad en la composición y estructura de estos polímeros se requiere de una amplia variedad de enzimas que trabajen sinérgicamente. Estas enzimas han sido purificadas de varios microorganismos, pero especialmente de especies de *Aspergillus*.

II. 4.1 Enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular de plantas.

Las enzimas son catalizadores biológicos, tienen velocidades de reacción muy elevadas aunque depende de la reacción que se lleve a cabo, sus condiciones de reacción más suaves y su especificidad de reacción es mayor (Voet & Voet, 1990).

La producción de enzimas por medio de fermentación fue un negocio establecido antes de la biotecnología microbiana moderna. Sin embargo, la metodología de DNA recombinante fue adecuada para mejorar la tecnología de producción de enzimas. Las enzimas industriales han alcanzado un mercado de 1.6 billones de dólares anuales. Entre las enzimas importantes se encuentran: proteasas, lipasas, carbohidrasas, chimosina recombinante para la manufactura de queso y lipasa recombinante para su uso en detergentes (Demain, 2000).

II. 4.1.1 Degradación de la cadena principal de celulosa

Cuatro clases de enzimas están involucradas en la biodegradación de la celulosa: Endoglucanasa (EC 3.2.1.4) hidroliza la celulosa en glucoolisacáridos; Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) libera celobiosa de la celulosa cristalina; β -Glucosidasa (EC 3.2.1.21) degrada los oligosacáridos a glucosa y Exoglucanasas que genera glucosa a partir de celulosa y glucooligosacáridos (De Vries and Visser, 2001).

II. 4.1.2 Degradación de la cadena principal de xilano

La degradación de la cadena de xilano depende de dos clases de enzimas. Las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) son capaces de romper la cadena de xilano en pequeños oligosacáridos, los cuales después pueden ser degradados a xilosa por las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37). Estas últimas son bastante específicas por oligosacáridos de xilosa (con grado máximo de polimerización de 4) y su acción resulta en la producción de xilosa. Algunas de las endoxilanasas cortan aleatoreamente entre los residuos de xilosa no sustituidos, mientras que la actividad de otras depende de los sustituyentes en los residuos de xilosa vecinos a los residuos atacados. Otra distinción entre las endoxilanasas es que se dividen en dos grupos: aquellas que no liberan L-arabinosa (la enzima no actúa cuando tiene como sustituyente la L-arabinosa) y aquellas que si la liberan (De Vries and Visser, 2001; Parenicová, L., 2000). Otra enzima que actúa en el xilano es la acetil xilan esterasa, libera los grupos acetilo que estén presentes en los residuos de xilosa (Beg et al, 2001).

II. 4.1.3 Degradación de la pectina

Las pectinasas muestran especificidad dependiendo del sustrato, pero básicamente se clasifican en dos grupos: el grupo del homogalacturonano y el grupo del ramnogalacturonano.

1) Enzimas que degradan el Homogalacturonano

En la parte del homogalacturonano de la pectina participan enzimas como: la pectin metil- y acetil- esterasa (EC 3.1.1.11 y EC 3.1.1.6), endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67), pectato liasa (EC 4.2.2.2), y pectin liasa (EC 4.2.2.10). La pectin liasa utiliza como sustrato la pectina metilesterificada, que genera el pectato (pectina de bajo metoxilo) que son sustrato para las poligalacturonasas y la pectato liasa (Parenicová, 2000).

a) Poligalacturonasas

Se dividen en tres grupos. Endopoligalacturonasas que atacan enlaces glucosídicos α -1,4 al azar de la cadena del polisacárido generando oligómeros de ácido galacturónico; exopoligalacturonasa tipo I, hidroliza GalA del extremo no reductor, exopoligalacturonasa tipo II libera digalacturonato del extremo no reductor del ácido poligalacturónico (Parenicová, 2000).

b) Pectin y pectato liasas

Las liasas catalizan la eliminación del enlace glucosídico α -1,4 entre los residuos del GalA en la pectina o pectato para dar oligosacáridos insaturados entre el C-4 y C-5 del extremo no reductor del producto (Parenicová, 2000).

c) Pectin metil- y acetil- esterases

La pectin metil esterasa remueve el grupo metoxilo del grupo carboxilo de las unidades de galacturonato de la pectina y la acetil esterasa remueve los grupos acetilos del C-2 o C-3 en el galacturonato produciendo un alcohol y un acetato respectivamente (Parenicová, 2000).

2) Enzimas degradadoras del Ramnogalacturonano I

En estas enzimas se encuentran la ramnogalacturonano hidrolasa, ramnogalacturonano liasa, exogalacturonasas, ramnogalacturon ramnohidrolasa, ramnogalacturonano galactohidrolasa y α -ramnosidasa (Parenicová, 2000).

II. 4.1.4 Degradación del xiloglucano

Para la completa degradación de la molécula de xiloglucano teóricamente se requiere de la actividad enzimática de cuatro enzimas como mínimo: la cadena principal del xiloglucano se hidroliza con endoglucanasas (endo-(1-4)- β -D-glucanasa) para romper los enlaces internos de la cadena de glucano y una β -D-glucosidasa, para completar la hidrólisis de los pequeños fragmentos de oligoglucano. Mientras que para las cadenas laterales se requiere de: una β -D-galactosidasa para remover los residuos terminales de D-galactosa y una α -D-xilosidasa para remover los residuos terminales y no reductores de xilosa (Grant and Edwards, 1995).

Adicionalmente se ha identificado una enzima que muestra una absoluta especificidad por el xiloglucano y se nombró específica a este sustrato; xiloglucan-endo-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucanasa, se ha encontrado que la acción primaria es la transglicosilación, y de acuerdo a estudios de la secuencia de aminoácidos se encontró que no existe ningún parecido con las endo (1 \rightarrow 4)- β -D-glucanasas, por tanto el nombre más adecuado es el de xiloglucan-endo-transglicosilasa. Esta enzima fue detectada en el cotiledón de *Tropaelum* por su gran habilidad de catalizar una rápida disminución en la viscosidad del xiloglucano de la semilla de tamarindo,

debido a la endo-depolimerización de la molécula. Se sabe que también las endo (1 → 4)-β-D- glucanasas (incorrectamente llamadas celulasas) de origen fúngico, bacterial y de plantas, catalizan la endo-depolimerización del xiloglucano. Las celulasas también reconocen y rompen los enlaces β-1-4 de la cadena de glucano, pero su acción en el XG se ve limitada por el alto grado de sustitución de la cadena de glucanos (Grant and Edwards, 1995).

La α-xilosidasa no es una enzima general, desde que esta no cataliza la hidrólisis de sustratos como p-nitrofenil-α-D-xilosa. Esta es activa contra el disacárido isoprimeverosa (α-D-Xyl-(1-6)-D-Glc), el cual esta presente en el XG (Grant and Edwards, 1995). Aunque se ha reportado que algunas enzimas de origen fúngico si son capaces de utilizar como sustrato el p-nitrofenil-α-D-xilosa (Yoshikawa et al, 1993, De Vries and Visser, 2001).

II. 4.1.5 Enzimas accesorias involucradas en la degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas.

Las enzimas accesorias actúan en los sustituyentes o en las cadenas laterales de los polisacáridos de la pared celular. Algunas de estas enzimas actúan en los enlaces entre el residuo de la cadena principal y el sustituyente, mientras que otras enzimas rompen los enlaces internos o terminales de las cadenas laterales.

- a) α-L-arabinofuranosidasas y arabinoxilan arabinofuranohidrolasas. Los residuos de arabinosa pueden ser removidos por la α-L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) y arabinoxilan arabinofuranohidrolasas y la diferencia entre estas radica en la especificidad del sustrato.
- b) Endo y exoarabinasas. Las endoarabinasas (EC 3.2.1.99) hidroliza los enlaces α-1,5 del arabinano, que esta presente en las cadenas laterales de la pectina. Además algunas arabinofuranosidasas son capaces de hidrolizar arabinano polimérico.
- c) α- y β-D-galactosidasas. Para remover los residuos de D-galactosa de los polisacáridos de la pared celular de plantas requiere de la acción de α-galactosidasas (EC 3.2.1.22) y β-galactosidasas (EC 3.2.1.23). Las β-galactosidasas liberan los residuos de galactosa del galactano de las cadenas laterales de la pectina y del

XG. Las α -galactosidasas están involucradas en la degradación de galacto(gluco)manano, removiendo la galactosa de los residuos de manosa de la cadena principal.

- d) α -glucuronidasas. Los residuos de ácido glucurónico y su 4-O-metil éter puede ser removido de la cadena de xilano por α -glucuronidasas (EC 3.2.1.131). La enzima es solo activa principalmente en pequeños xilooligómeros.
- e) Feruloil y p-coumaroil esterasas. Liberan los grupos fenólicos presentes en la estructura del xilano (De Vries and Visser, 2001; De Vries, 1999).

Para conseguir una degradación eficiente de los polisacáridos presentes en la pared celular de las plantas requiere de la cooperación o interacciones sinérgicas entre las enzimas responsables de los diferentes enlaces.

II. 4.2. *Aspergillus*

Las especies de *Aspergillus* pertenecen a los primeros hongos que fueron cultivados en medios artificiales y estudiados por sus propiedades bioquímicas (Harvey and McNeil, 1994). Además de ser los que se presentan en mayor distribución geográfica, encontrándose desde regiones árticas hasta el Ecuador. Son de los hongos más omnívoros que existen, capaces de asimilar como alimento una enorme variedad de sustancias debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas (Hernández, 1995).

Varios de los productos producidos por algunas especies (ejemplo *Aspergillus niger*) de *Aspergillus* han obtenido el grado GRAS (Generally Regarded As Safe), lo que permiten que sean usados en alimentos de consumo humano y animal. Entre otras características que han hecho que los arpergillos sean utilizados en alimentos, son: sus buenas capacidades fermentativas y altos niveles de secreción de proteína (pueden excretar hasta un 90% de las enzimas al medio de cultivo (Blandino et al, 2001)). Particularmente el amplio rango de enzimas producidas por *Aspergillus* para la degradación de polisacáridos de la pared celular de plantas (De Vries and Visser, 2001).

Actualmente, *Aspergillus* es utilizado en diversos procesos industriales para la elaboración de diversos productos que abarcan desde ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos y alimentos fermentados de varias clases (Hernández, 1995).

II. 4.2.1 Taxonomía y Morfología

El género *Aspergillus* es un grupo de hongos filamentosos que tienen un gran número de especies. En 1926 la primera clasificación de estos hongos fue propuesta describiendo 11 grupos dentro del género (Thom and Church, 1926). Una reexaminación del género *Aspergillus* fue publicada por Thom y Raper (Thom and Raper, 1945), identificando 14 grupos distintos. Algunos de estos grupos son hongos patógenos (ejemplo: *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. parasiticus*), pero para fines de aplicación industrial son más importantes los miembros del grupo del aspergillo negro (*A. niger* y *A. tubingensis*). Adicionalmente de las técnicas morfológicas tradicionales, las nuevas técnicas moleculares y bioquímicas se han usado en la reclasificación de este grupo de aspergillo. Estos análisis resultaron en la clara distinción de 8 grupos del aspergillo negro (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. carbonicus*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. heteromorphus* y *A. ellipticus*) (De Vries and Visser, 2001)

Las especies de *Aspergillus niger* pertenecen a la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina (Hongo imperfecto), que comprenden a los hongos cuya reproducción es solamente asexual por medio de conidias. Dentro de Deuteromycotina, esta especie pertenece a la clase Hyphomycetes, la cual produce conidióforos en algunas partes del micelio (Parenicová, 2000).

A pesar de las técnicas nuevas tanto moleculares y bioquímicas, las estructuras morfológicas siguen siendo una importante característica para la clasificación de *Aspergillus* (Harvey and McNeil, 1994). *Aspergillus* se caracteriza por una estructura morfológica típica: un conidióforo, que incluye un tallo y una cabeza conidial, que surge de la especialización de una estructura micelial llamada célula pie (Fig. II.6). Los conidióforos no son septados, se ensanchan hacia la punta y terminan en una estructura globosa, de incolora a amarillenta (vesículas).

Las vesículas tienen una superficie total de alrededor de 10 a 15 μm de largo. Las conidias son producidas sucesivamente desde las puntas de las fialides, formando así cadenas no ramificadas y cada cadena contiene

más de 100 conidias o esporas. Las conidias son más o menos globosas y tienen 4-5 μm de diámetro pero ocasionalmente son más pequeñas (Parenicová, 2000).

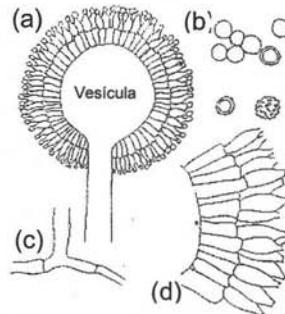


Fig. II.6. Morfología de *Aspergillus*. a) cabeza conidial, b) conidia o espora, c) célula pie, d) métula y filáides (de izquierda a derecha) (Parenicová, 2000)

II. 4.2.2 Fisiología

Los miembros del género *Aspergillus* lo conforman una gran variedad de habitantes. Algunos de estos saprofitos viven en tierra, otros en alimentos almacenados, y otros en vegetación en descomposición. Junto con *Penicillium*, son los géneros dominantes en productos almacenados, siendo capaces de crecer en situaciones de baja a_w y altas temperaturas (Harvey and McNeil, 1994).

a) Disponibilidad del agua

Las especies de *Aspergillus* difieren entre sí en sus requerimientos de a_w y por lo tanto la presencia de algunas especies en particular en alimentos es frecuentemente un buen indicador de condiciones de almacenamiento.

La a_w acuosa puede afectar en la germinación de diferentes maneras:

- 1) La mínima a_w para la germinación
- 2) El tiempo de la etapa de latencia (fase lag) antes de la germinación
- 3) La velocidad del túbulo germinal

La germinación puede ocurrir a a_w baja pero sin crecimiento del micelio. Con el descenso de a_w , el tiempo de etapa de latencia antes de la germinación se incrementa. Los túbulos de germinación se elongan rápidamente a una alta a_w (Harvey and McNeil, 1994).

b) Temperatura

La mayoría de los hongos son mesófilos, siendo su rango de temperatura de 10 – 40 °C. El género *Aspergillus* crece con facilidad a temperaturas entre 15 – 30 °C. Sin embargo, algunas especies crecen a temperaturas fuera de este rango; por ejemplo *A.niger* puede crecer de 9 – 60 °C y siendo su temperatura óptima de 17 – 42 °C.

Por otro lado, las especies de *Aspergillus* pueden sobrevivir a 4 °C por lo que pueden ser conservados en refrigeración, con lo que respecta a temperaturas de congelamiento se ha reportado que *Aspergillus* es capaz de sobrevivir a estrés causado por este fenómeno (Harvey and McNeil, 1994).

c) pH

El nivel de pH es difícil de controlar, desde que el hongo crece por si mismo resulta en un cambio de pH por el sustrato. Estos cambios pueden estar directamente afectados por lo procesos metabólicos modificando los límites de a_w a la cual la germinación sucede.

A. niger puede crecer en un rango de pH de 1.5 – 9.8, *A. candidus* entre 2.1 – 7.7 a una a_w de 1.0. Otros estudios han mostrado que algunas especies de *Aspergillus* con una a_w baja pueden crecer a pH de 7.0 mejor que a pH 3.0 y 5.0 (Harvey and McNeil, 1994).

II. 5. Aplicaciones Industriales de las enzimas

Gran parte de la biomasa utilizada en el procesamiento de diversas frutas y verduras se compone de la pared celular de las plantas, y generalmente el primer paso en tales procesos incluye la degradación (parcial) de fracciones poliméricas. Por lo tanto es obvio que las enzimas capaces de degradar la pared celular de plantas pueden ser aplicadas en muchos de estos procesos y proveer una buena alternativa para el procesamiento químico. Dentro de las enzimas previamente mencionadas las que tienen mas aplicaciones industriales son la enzimas xilanólíticas y pectinolíticas.

II. 5.1 Aplicaciones de enzimas xilanolíticas.

Las enzimas xilanolíticas de microorganismos han atraído mucha atención en las últimas décadas, particularmente por su gran potencial biotecnológico en diversos procesos industriales como son: alimentos de consumo humano y animal, pulpa y en la industria de papel. Las xilanasas han mostrado un inmenso potencial para incrementar la producción en varios productos útiles en el ámbito económico (Beg et al, 2001). Entre las aplicaciones de estas se encuentran las siguientes:

- 1) Actualmente, la aplicación de las xilanasas más prometedora es el preblanqueado de pulpas de madera. La aplicación de enzimas mejora la fibrilación de la pulpa y la retención de agua, la restauración de enlaces y aumento de libertad en fibras recicladas y la extracción selectiva del xilano de pulpas disueltas. El uso de xilanasas permite que exista una reducción del uso de químicos tóxicos para el medio ambiente que están hechos a base de cloro e hidrosulfito de sodio; además permite una blancura más brillante en el papel.

Las enzimas principales que se requieren para la delignificación de pulpa son: la endo- β -xilanasa, mananasa, lipasa y α -galactosidasa; y es importante señalar que no se deben ocupar celulasas (Beg et al, 2001; Kulkarni et al, 1999).

- 2) La incorporación de xilanasas en la dieta basada en centeno para pollos, resulta en la reducción de la viscosidad intestinal, lo que mejora tanto el peso ganado de los pollos y la eficiencia de conversión del alimento. Esto puede ser extrapolado no solamente para pollos y no solamente centeno, sino para cualquier material derivado de las plantas (Beg et al, 2001).
- 3) La eficiencia de xilanasas en el mejoramiento de la calidad del pan, se ha observado con incremento del volumen del pan, mejora de la textura y la vida de anaquel, esto debido a que las xilanasas ayudan a solubilizar la fracción de arabinoxilano en la masa del pan y la redistribución del contenido de agua en el mismo. Esto se amplifica cuando la amilasa es usada en combinación de las xilanasas (Beg, et al, 2001; Kulkarni et al, 1999).
- 4) El xilano esta presente en grandes cantidades en desperdicios de industrias agrícolas, de frutas y verduras. Debido a esto, las xilanasas son usadas en las conversión de xilosa a partir del xilano presente en las aguas de desperdicio. El desarrollo de la eficiencia de procesos de hidrólisis enzimática ofrece nuevos prospectos para el tratamiento de desperdicios hemicelulosicos (Beg et al, 2001).

- 5) Las xilanasas junto con celulosas y pectinasas se usan para la clarificación de mosto y jugos, en la licuefacción de frutas y verduras, y en el pretratamiento de semillas de forraje para mejorar la digestibilidad del alimentos de los rumiantes y facilitar la composta (Beg et al, 2001; Kulkarni et al, 1999).
- 6) Los alquil glicosidos son candidatos prometedores como nuevos surfactantes. Comercialmente se producen de azúcares monomericos como D-glucosa y alcohol graso. Pero la glicosilación directa usando polisacáridos es más viable para su producción industrial, porque la hidrólisis del polisacárido y pasos subsecuentes pueden ser omitidos. Por esto el uso de xilanasas en este proceso provee una oportunidad (Beg et al, 2001).
- 7) La α -L-arabinosidasa y β -D-glucosidasa se han empleado en procesos de alimentos para aromatizar mostos, vinos y jugo de frutas (Beg et al, 2001; Kulkarni et al, 1999).
- 8) La xilanasas en sinergismo con otras enzimas como: manasa, ligninasa, xilosidasa, glucanasa, glucosidasa, etc. Pueden ser usadas para la generación de combustibles biológicos, como el etanol y xilitol a partir de biomasa lignocelulosica. La producción biológica de etanol como combustible requiere de lignificación de la lignocelulosa para liberar a la celulosa y hemicelulosa de la lignina, seguido de la depolimerización de los polisacáridos para producir azúcares libres y finalmente la fermentación de una mezcla de pentosas y hexosas para producir etanol (Beg et al, 2001).
- 9) Las xilanasas también se utilizan para facilitar la extracción de sabores, pigmentos y aceites vegetales (Kulkarni et al, 1999).

II. 5.2 Aplicaciones de enzimas pectinolíticas

Las pectinasas son algunas de las primeras enzimas en ser usadas en casa. Su aplicación comercial fue observada en 1930 en la preparación de vinos y jugos de fruta. Esta se clasifican en pectinasas ácidas y alcalinas que hace referencia a su pH óptimo.

Las pectinasas ácidas se usan principalmente en la industria de jugos de fruta y en la elaboración de vino. Regularmente tiene origen fúngico, especialmente de *A. niger*.

La extrusión mecánica de las frutas ricas en pectina producen jugo de fruta con una alta viscosidad, en donde quedan restos de pectina unidos a la pulpa en forma de masa gelatinosa. Por tanto es difícil extraer este jugo por extrusión o usando otros métodos mecánicos. Con la adición de pectinasas la viscosidad de las gotas de jugo de fruta disminuye, la prensabilidad de la pulpa mejora, la estructura gelatinosa se desintegra y el jugo

de fruta es fácilmente obtenido y con alto rendimiento. Sin embargo el objetivo de adicionar enzimas pectinolíticas puede diferir según sea el tipo de jugo que se realiza.

- a) Jugos brillantes y claros. En este caso las enzimas se adicionan para incrementar el rendimiento del jugo cuando se prensa y se filtra; para remover la materia suspendida y producir jugos claros y brillantes.
- b) Jugos turbios (con pulpa). Las enzimas pectinolíticas ayudan a estabilizar la pulpa en jugos de cítricos, purés y néctares. Como es el caso de jugo de naranja, limón, mango, durazno, guayaba, puré de papaya y piña (Kashyap et al, 2001).

Algunos ejemplos del uso de pectinasas en la producción de diferentes jugos se citan a continuación:

- Jugo de manzana. El uso de pectinasas permite la producción de diversos tipos de productos, ejemplo: turbios, jugos claros, concentrados claros, etc. También son útiles para incrementar el valor del material de desecho. En la práctica, el tiempo total de la extracción de jugos es menor que en el proceso clásico. Las enzimas también ayudan en la producción de sidra y en este proceso las enzimas pectinolíticas ayudan a controlar y acelerar el mecanismo de formación de coágulo que es el que ayuda a eliminar el pectato, proteína y taninos del jugo.
- Jugo de pera. En el procesamiento de pera, las pectinasas como pectin liasa, poligalacturonasas, pectin metil esterasa y arabinasas mejoran la extracción del jugo. En el néctar mejoran la estabilidad de este y permite que la concentración del puré sea más fácil.
- Jugo y vino de uva. Incrementan la producción de jugo en la extracción y reducen la niebla en el jugo y vino.
- Jugo de fresa, frambuesa y zarzamora. Permiten que la extracción, filtración y concentración sea más fácil (Kashyap et al, 2001).

Las pectinas alcalinas se usa principalmente en la eliminación de gomas de la fibra de siembras y en el pretratamiento del agua de desperdicio de las industrias de jugos de fruta y en la extracción de aceite de semillas como: girasol, palma, oliva, etc., ayudando así a incrementar el rendimiento (Kashyap et al, 2001).

II. 5.3 Aplicaciones de otras enzimas

Las xiloglucanasas al igual que las pectinasas ayudan en la licuefacción del los jugos de fruta, permitiendo que exista un rendimiento mayor y posibilitando la recuperación de jugo sin una operación energética de prensado (Vicken et al, 1997). También estas enzimas encuentran aplicaciones para la formación de oligosacáridos de xiloglucano que pueden ser utilizados como sustitutos en alimentos de bajas calorías y como aditivos anticongelantes en alimentos.

Las α -galactosidasas son usadas para mejorar la capacidad de gelificación de los galactomananos, los cuales tienen aplicación en la industria de los alimentos, así como en la industria de los cosméticos y farmacéuticos. Adicionalmente estas reducen la concentración de rafinosa y otros oligosacáridos en leche de soya y jarabe de remolacha de azúcar. De igual manera las β -galactosidasas son usadas para mejorar la capacidad de formación de geles del XG, el cual tiene aplicaciones en el área de los alimentos (Grant and Edwards, 1995).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Producir enzimas extracelulares que degraden los polisacáridos presentes en semilla y bagazo de tamarindo; a partir de cepas tropicales autóctonas de *Aspergillus*, para su eventual aplicación en alimentos y/o farmacia.

Objetivos Específicos.

- Identificar que enzimas producen las cinco cepas evaluadas, utilizando como fuente de carbono: la semilla y bagazo; y únicamente semilla de tamarindo
- Extraer, purificar parcialmente el xiloglucano de la semilla de tamarindo: así como su utilización para medición de actividad.
- Elegir la(s) cepa(s) con mejores resultados en la producción de enzimas, al igual que el sustrato que favorezca dicha producción.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. 1. Residuos de Tamarindo

Los residuos de tamarindo fueron obtenidos del procesamiento del mismo para la elaboración de dulce de tamarindo de la planta Deritrop S.A. de C.V. Los desechos comprendieron: semillas y bagazo (cáscara, fibras membrana que recubre la semilla y parte de la pulpa remanente); fueron recolectados en bolsas de plástico y guardados a temperatura de congelación (-20°C) hasta su uso. Los residuos se secaron en una estufa a una temperatura de 50°C durante 24 hrs. y una vez seco el producto se molió hasta la obtención de un polvo. En el caso de solamente el uso de semilla, ésta se separó antes del secado.

III. 2. Microorganismo

Inicialmente se utilizaron 5 cepas (FP 60, FP 180, FP 440, FP 500, FP 520) tropicales autóctonas de *Aspergillus* provenientes del cepario del Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos (que fueron aislados de frutas en estado de descomposición) previamente seleccionadas en base a la capacidad de producir sistemas enzimáticos de estudios anteriores.

III. 3. Selección

De las 5 cepas utilizadas se llevó a cabo una etapa de selección, con base en las capacidades para producir enzimas xilanolíticas y pectinolíticas.

III. 4. Preparación del inculo.

En condiciones estériles los microorganismos fueron sembrados en placas de agar papa dextrosa (PDA 3.9% y agar bacteriológico 0.5%) e incubados a 37°C durante 72 h. Al término de este período de crecimiento y esporulación de cada cepa, se procedió a la cosecha de esporas. Las esporas se suspendieron en 10 mL de solución salina-tween y se contaron en una cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas. El inculo se ajustó a una concentración final en el medio de cultivo de 10⁶ esporas/mL y se guardó en refrigeración hasta su uso (el inculo utilizado no excedió a más de dos semanas desde su preparación).

III. 5. Medios de cultivo.

Diferentes medios de cultivo fueron preparados durante este estudio (Tabla III. 1):

Tabla III. 1. Diferentes composiciones del medio de cultivo líquido utilizados

Etapa	Medio Basal		Fuente de carbono ^a	Concentración de fuente de carbono	pH inicial ^b	Forma de esterilizar
	Sales	Fuente de nitrógeno				
Selección	K ₂ PO ₄ 0.2% KH ₂ PO ₄ 0.2%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5%	SB	3%	3.5	Seco
			S		5.0	
Efecto de la fuente de nitrógeno		(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5%	SB	3%	5.0	Seco
		NaNO ₃ 0.646%				
		Extracto de levadura 1.081%				
Efecto de la forma de esterilizar		(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5%	SB	3%	5.0	Seco
						Suspensión junto
						Suspensión separado
Efecto de la concentración de fuente de carbono		(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5%	SB	1%	5.0	Seco
				2%		
	3%					

^a SB = fracción semilla + bagazo, S = fracción semilla

^b El pH inicial se ajustó con NaOH y H₂SO₄ diluido

En la etapa de selección se usaron dos diferentes fuentes de carbono (SB y S) a dos pH's (3.5 y 5.0); con 5 cepas diferentes. Para determinar tanto la fuente de carbono y pH más adecuados, así como la selección de cepa (s).

En la evaluación del efecto de la fuente de nitrógeno, los porcentajes (w/v) de las diferentes fuentes de nitrógeno varían entre sí. Esto es debido a que se ajustó en relación a la cantidad de nitrógeno, lo que corresponde a 0.106 g de nitrógeno/ 100 mL.

En la evaluación de la forma de esterilizar es importante puntualizar a que se refiere cada una de las maneras en que se llevó a cabo la esterilización:

- a) Seco: la fuente de carbono seca, se esterilizó separada del medio basal

- b) Suspensión junto: se esterilizó la fuente de carbono junto con el medio basal
- c) Suspensión separado: se esterilizó el medio basal y separadamente la fuente de carbono con agua.

Todos los medios de cultivo se esterizaron a 121°C y una presión de 15 lb/in² durante 20 min.

La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo correspondiente, a una temperatura de 37°C y con agitación constante de 200 r.p.m. en una agitadora orbital (New Brunswick Sci; USA). Durante el transcurso de 4 días de la fermentación se tomaron muestras de 5 mL en un tubo de ensayo en condiciones estériles a las 0, 24, 48, 72 h. Después de tomadas las muestras se les midió el pH y se centrifugaron a 500 r.p.m. (centrífuga clínica SOLBAT C-300) y se mantuvieron a temperatura de congelación para análisis posterior.

III. 6. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron en los filtrados libres de células por el método de DNS (Miller, 1959). La mezcla de reacción consistió de: 0.1 mL de muestra + 0.9 mL de H₂O + 2 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS); la mezcla fue puesta en ebullición por 5 min., se le añadieron 5 mL de H₂O y se leyó a una $\lambda = 575$ nm en el espectrofotómetro (Spectronic 20). La concentración de azúcares reductores fue calculada utilizando una curva estándar de glucosa.

III. 7. Determinación de actividades enzimáticas

a) Actividad Pectinolítica

Se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados de pectina por el método de DNS utilizando una curva estándar de ácido galacturónico. El sistema de reacción consistió en 0.5 mL de pectina (de frutas cítricas, con un contenido de 85% de GalA y 10% de grupos metoxilo, Sigma) al 1% (w/v), con 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM a pH = 5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células a 45°C durante 20 min. Al término del tiempo se le adicionó 2 mL de DNS y se calentó la mezcla a ebullición por 5 min., se le añadió 5 mL de H₂O y se leyó a una $\lambda = 575$ nm en el espectrofotómetro. Una unidad (U) de actividad pectinolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de ácido galacturónico en 20 min. a 45°C y pH=5.0.

b) Actividad Xilanolítica

La actividad xilanolítica se determinó por la cuantificación de los azúcares reductores liberados del xilano por el método de DNS usando una curva de xilosa como patrón, obtenidos después de la incubación de: 0.5 mL de xilano de abedul (Sigma Chemical Co.) al 1% (w/v) + 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM a pH= 5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células a 50°C durante 20 min. Al término del tiempo se le adiciono 1 mL de DNS y se calentó la mezcla a ebullición por 5 min., se le añadieron 5 mL de H₂O y se leyó a una $\lambda = 575$ nm en el espectrofotómetro. Una unidad (U) de actividad xilanolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de xilosa en 20 min. a las condiciones de ensayo.

c) Actividad Celulolítica

La actividad celulolítica se determinó por la liberación de azúcares reductores de la celulosa por el método de DNS usando una curva patrón de glucosa. El sustrato fue 50 mg de papel filtro (Whatman No 4) en 0.9 mL de buffer de acetatos 100 mM a pH = 5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células llevándose el ensayo a una temperatura de 40°C y un tiempo de 3 h. Para detener la reacción se le agregó 2 ml de DNS y se colocó en un baño María en ebullición por 5 min., se le agregó 5 mL de H₂O y se leyó a una $\lambda = 575$ nm en el espectrofotómetro. Una unidad (U) de actividad celulolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de glucosa en 3 h a las condiciones de ensayo.

d) Actividad xiloglucanolítica

La actividad xiloglucanolítica se midió por la liberación de azúcares reductores del xiloglucano por el método de neocuproino usando una curva patrón de glucosa. El sistema de reacción consistió en: 0.5 mL de xiloglucano al 0.2% + 0.4 mL de buffer de acetatos 50 mM a pH= 5.0 y 0.1 ml de filtrado enzimático e incubado a 40°C durante 1 h (El tiempo de incubación se determinó a llevar a cabo la reacción en las mismas condiciones pero a tiempos de 0, 0.5, 5, 12, 18, 24 h). Concluido el tiempo se tomó una muestra de 50 μ l y se agregó a un tubo de ensayo con 2 mL de Na₂CO₃ 0.25 M + 50 μ l de H₂O para detener la reacción y se le adicionó 1 mL del reactivo de Neocuproino (0.4% de neocuproino (Aldrich Chem. Co) + 0.2% de CuSO₄ * 5H₂O (reactivo analítico, Mallinckrodt)) y se incubó a 65°C durante 12 min. y se leyó a una $\lambda = 435$ nm en el espectrofotómetro (Spectronic 21 D). Una unidad (U) de actividad xiloglucanolítica se define como la cantidad de enzima necesaria

para catalizar la producción de 1 μmol de glucosa en 30 min. a las condiciones de ensayo.

e) Actividad sustratos acoplados: β -glucosidasa

La actividad de β -glucosidasa se determinó por la liberación de *p*-nitrofenol (pnp) medido a una absorbancia de 405 nm, la concentración se calculó usando una curva patrón de pnp. El sistema de reacción consistió en 200 μl de *p*-nitrofenol- β -D-glucopiranosido (Sigma Chemical Co.) (1 mg/mL en buffer acetatos 50 mM a pH = 4.2) + 50 μl de filtrado enzimático, incubado a 40°C durante 15 min (Para determinar el tiempo de incubación se midió la actividad a diferentes tiempos de incubación: 0, 15, 30 y 60 min. en las mismas condiciones descritas). Transcurrido el tiempo se tomó una muestra de 50 μl y se adicionó a 650 μl de Na_2CO_3 0.13 M para detener la reacción. Una unidad de actividad β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por 15 min. a estas condiciones.

La actividad de β -galactosidasa, α -galactosidasa, β -xilosidasa, α -xilosidasa y α -arabinosidasa; se determinó usando pnp- β -D-galactopiranosido, pnp- α -D-galactopiranosido, pnp- β -D-xilopiranosido, pnp- α -D-xilopiranosido y pnp- α -L-arabinofuranosido como sustrato respectivamente (Sigma Chemical Co.) (De Vries, 1999).

III. 8. Cromatografía en capa fina (TLC).

Con el objeto de hacer un análisis de los productos de degradación del xiloglucano, se llevó a cabo una cromatografía de placa fina para la detección de los carbohidratos. Se utilizaron placas de (Cromatoplasca de aluminio TLC 20 x 20 cm Silicagel F₂₅₄, Merck) 5 x 10 cm. Las muestras utilizadas provinieron del ensayo de actividad xiloglucanolítica (ya descrito) pero incubadas a 0, 30 min., 5 h, 12 h, 18 h y 24 h. Las mezclas de reacción después de transcurrido el tiempo se centrifugaron a 500 r.p.m. (Microfuge E, Beckman) durante 5 min., se decantaron, congelaron y se liofilizaron (Liofilizadora Labconco Mod. Freezer Dry System). Una vez secas las muestras se resuspendieron en 20 μl de agua y se utilizaron 8 μl en cuatro aplicaciones dejando que se secase entre cada una. Se utilizaron estándares de: glucosa (2 μl de una solución de 10 mg/mL), xilosa (2 μl de una solución de 10 mg/mL), galactosa (2 μl de una solución de 10 mg/mL), ramnosa (6 μl de una solución de 50 mg/mL), lactosa (6 μl de una solución de 20 mg/mL) y arabinosa (2 μl de una solución de 10 mg/mL). La placa se irrigó dos veces con MeCN-EtOAc-1-propanol-agua (85:20:20:15, v/v/v/v) a temperatura ambiente. El

solvente subió hasta la punta de la placa y se dejó secar entre los dos ascensos. Los carbohidratos fueron visualizados usando AgNO_3 alcalino. La placa de TLC fue sumergida en una solución de AgNO_3 -acetona (1 mL de AgNO_3 saturado en 200 mL de acetona) por 5 min. y se dejó secar. Posteriormente se sumergió en una solución alcalina de MeOH (2 mL de NaOH al 40% (w/v) en 200 ml de MeOH) por 5 min. y se dejó secar y se sumergió en una solución que contenía $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1.5 M, Na_2SO_3 0.08 M y NaHSO_3 0.25 M. La placa fue después lavada por un 1 min. en agua corriente (Han, 1998).

III. 9. Purificación parcial del xiloglucano de tamarindo.

El xiloglucano fue preparado disolviendo 30 g de polvo de la semilla de tamarindo en 500 mL de H_2O . La solución fue incubada en agitación constante por 24 h a 4°C , se centrifugó a 8500 r.p.m (Beckman Mod. J2-MC) por 30 min., el material sólido se descartó. El polisacárido soluble se precipitó toda la noche a 4°C en 70% de etanol 2:1 ajustado a $\text{pH} = 4.0$ con HCl y se centrifugó a 8500 r.p.m por 30 min. El material sólido se resuspendió en 500 mL de H_2O , se precipitó con etanol y se centrifugó por segunda vez y el material sólido remanente fue resuspendido en el mínimo de agua, congelado y liofilizado (Marry, 2003).

III. 10. Electroforesis (SDS-PAGE) y Zimogramas (Actividad *in situ*).

La electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS se realizó de acuerdo a Laemmli (1970). El gel separador contiene acrilamida al 10% y bis-acrilamida al 2.7% (Bio-Rad Laboratories). Las muestras utilizadas fueron concentradas y resuspendidas en el volumen mínimo posible de buffer de corrimiento (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0.1%(Bio-Rad Laboratories)) y se adicionó un buffer de tratamiento desnaturalizante (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% buffer Tris-HCl 125mM a pH 6.8 y azul de bromofenol 0.005%).

Se emplearon 500 μg de proteína (determinada por el método de Lowry, utilizando albúmina de suero bovino como estándar) de cada muestra para realizar la electroforesis, la cual se llevó a cabo a corriente constante 50 mA, a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm migly Small SE-245 (Hoefer Sci. Ins. USA). Después de este tiempo los geles fueron teñidos con una solución que contiene azul de Coomassie R-250 al 0.125%, metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 1 hora y después se destiñieron con una solución de ácido acético al 10%.

La actividad *in situ* (zimograma) xilanolítica y pectinolítica, se determinó incubando el gel de acrilamida en buffer de renaturalización (Tris-HCl 10 mM pH 7.5) por 1 h a 1 r.p.m. a 37°C , con cambio de buffer a los 30 min., se decantó y se incubó en el sustrato correspondiente al 1% a pH de 5.0 con buffer acetatos (xilano de avena

(Sigma Chemical Co.) y pectina (Comercializadora Dantan, pectin MRS-351)) sin agitación a 37°C durante 1 h, se decantó y se eliminó el exceso del sustrato; posteriormente el gel se tiñó con solución de rojo congo al 0.1 % para xilano y rojo de rutenio 0.1% para la pectina durante 20 min. a temperatura ambiente. En el caso de la actividad xilanolítica se decantó y se le agregó NaCl 1M durante 15 min. a temperatura ambiente, se decantó y se le adicionó ácido acético 1M durante 15 min. a temperatura ambiente se decantó y se enjuagó. Mientras que para la actividad pectinolítica se decantó y se enjuagó con agua según fue necesario para eliminar el exceso de colorante.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. 1. Selección

El Laboratorio de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos de la UNAM cuenta con 54 cepas todas ellas pertenecientes al género *Aspergillus*, aisladas a partir de fuentes naturales en estado de descomposición. De estas cepas, se seleccionaron 5: FP 60, 180, 440, 500 y 520, en base a su capacidad de producir enzimas xilanolíticas y pectinolíticas en estudios previos (Hernández, 1995; Fabela, 2000; Orozco, 2003). Las cepas FP 60, 180, 440 y 500 corresponden a cepas blancas de *Aspergillus*, mientras que la cepa 520 es una cepa negra.

Se ha observado que la síntesis de enzimas extracelulares de hongos como *Aspergillus*, se ve fuertemente influenciada por los componentes del medio de cultivo, particularmente por la fuente de carbono (Blandino et al, 2001). En el caso particular de *Thermomyces lanuginosus* incluso se reportó que prefiere materiales naturales de plantas como fuente de carbono, en lugar de un componente individual aislado de estas (como puede ser pectina y xilano) para la producción de enzimas extracelulares (Puchard et al, 1999).

Dentro de las fuentes de carbono utilizadas para la producción de xilanasas se encuentran: mazorca de maíz, salvado de trigo, salvado de arroz, paja de arroz, tallo de maíz y bagazo de caña de azúcar entre otras (Kulkarni et al, 1999); mientras que la producción de pectinasas se ha reportado en fuentes de carbono como: pectina, pulpa de remolacha de azúcar, mazorca de maíz molida, paja de trigo y cáscara de arroz, (Olsson et al, 2003; Hanif et al, 2004; Puchard et al, 1999). Las ventajas que ofrecen estas fuentes de carbono, es que son materiales de desecho baratos y que incluso se puede ayudar a combatir la contaminación ambiental debida a estos mismos residuos. En este contexto, en este trabajo se evaluaron los residuos de tamarindo como fuente de carbono para la producción de enzimas extracelulares. Los residuos de tamarindo se componen de semillas y bagazo formado por cáscara, fibras, membrana que recubre la semilla y parte de la pulpa remanente; y son ricos en polisacáridos complejos.

Para conocer la capacidad de las cepas para asimilar esta fuente de carbono, se llevó a cabo una evaluación con dos pH's iniciales (5.0 y 3.5) y dos fuentes de carbono (únicamente la fracción semilla (S) y la fracción semilla + bagazo (SB)) y se determinó la actividad xilanolítica y pectinolítica.

Como se puede observar en la Fig. IV.2 y Fig IV.3, las 5 cepas utilizaron la fracción SB y la fracción S al 3% como fuente de carbono para su crecimiento, lo cual hacen a través de la secreción de enzimas que degradan el sustrato presente en el medio y por tanto hacen posible su utilización.

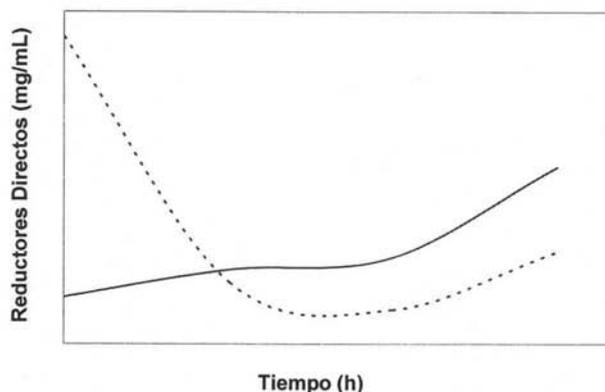


Fig. IV.1. Representación típica de comportamiento de grupos reductores en una fermentación utilizando la fracción semilla de tamarindo (—), fracción semilla + bagazo (---).

a) Actividad Xilanolítica

Cuando las 5 cepas crecieron en la fracción SB, se observó que la actividad xilanolítica a pH inicial de 5.0 para las cepas FP 60, 180 y 440, fue mucho menor en comparación de las cepas 500 y 520 a las 24h. Empero la actividad después se incrementó en todas las cepas (Fig.IV.2). Las diferencias a las 24 h pudieron deberse a: 1) los azúcares reductores en el medio de cultivo puede afectar de manera diferente a cada cepa, y 2) el pH en el medio de cultivo.

Al inicio de la fermentación la concentración de los azúcares reductores fue de 2.5 – 3.0 mg/mL, a estos valores todas las cepas blancas (60, 180, 440 y 500) los consumen hasta las 48 h obteniéndose una concentración de 0.4 – 0.6 mg/mL a este tiempo (Fig. IV.1), esto ocurre debido a que la velocidad de consumo es mayor a la velocidad de producción de monosacáridos. Sin embargo, llega un momento en el cual la velocidad de consumo es menor que la de producción de azúcares de bajo peso molecular, resultando así en una acumulación en la concentración de azúcares reductores (Fig. IV.1).

En el caso de la cepa negra (FP 520) los azúcares reductores son consumidos hasta las 24 h y aumentaron a las 48 h y nuevamente disminuyeron a las 72 h; esta diferencia con respecto a las cepas blancas, solo indica que la velocidad de consumo y producción de azúcares de bajo peso molecular es mayor para esta cepa a estas condiciones de crecimiento.

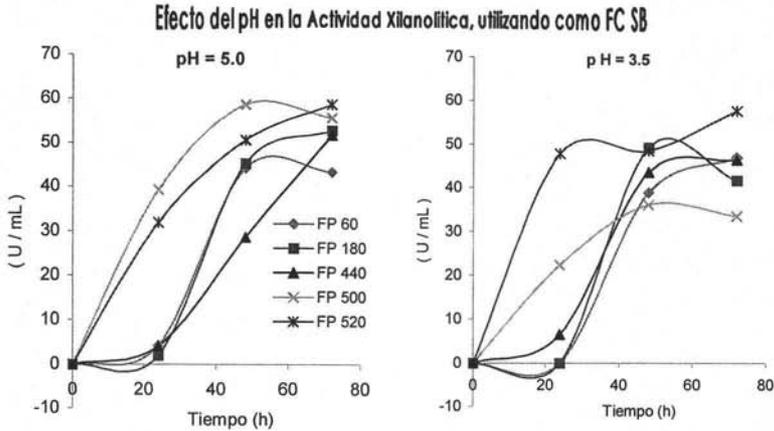


Fig. IV.2. Efecto del pH inicial (5.0 y 3.5) en la actividad xilanolítica, utilizando como fuente de carbono la fracción semilla + bagazo (SB) al 3% con 5 diferentes cepas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que la concentración de los azúcares de bajo peso molecular al inicio de la fermentación, afectó negativamente la síntesis de enzimas xilanolíticas para las cepas 60, 180 y 440.

Al estar presentes una mezcla de sustratos, estas cepas utilizaron primero la más simple para su crecimiento y la inducción de enzimas que degradan carbohidratos más complejos es nula o mínima, hasta que se ha agotado la fuente de carbono más fácil de metabolizar. No obstante, las cepas 500 y 520 no pareció afectarles de igual manera la presencia de los azúcares de bajo peso molecular a esa concentración, porque los valores de actividad son altos a las 24 h como ya se mencionó. Lo que sugiere que estas dos cepas se adaptaron mejor y más rápido a las condiciones de cultivo y/o podrían consumir más rápido los azúcares simples y/o son más resistentes a la represión catabólica. Se ha observado que la represión catabólica en el caso de la endo-(1,4)- β -xilanasa puede estar dada por glucosa y su inducción por xilano y fragmentos de bajo peso molecular de xilano los cuales incluyen: xilosa, xilobiosa, xilooligosacáridos, heterodisacáridos de xilosa y glucosa (Kulkarni et al, 1999; Wen Lui et al, 1999; Beg et al, 2001).

Este fenómeno de inducción / represión, parece depender de cada cepa y la concentración de los carbohidratos de bajo peso molecular, además de que en sustratos como éste, que son bastante heterogéneos y complejos, existen otros factores que pueden afectar en la expresión de xilanasas como son: la accesibilidad del sustrato,

velocidad y cantidad de oligosacáridos liberados y su naturaleza, y la cantidad de azúcares fáciles de metabolizar liberados que actúan como fuente de carbono y como inhibidor de la síntesis de estas enzimas (Kulkarni et al, 1999); sin descartar el pH, temperatura y agitación.

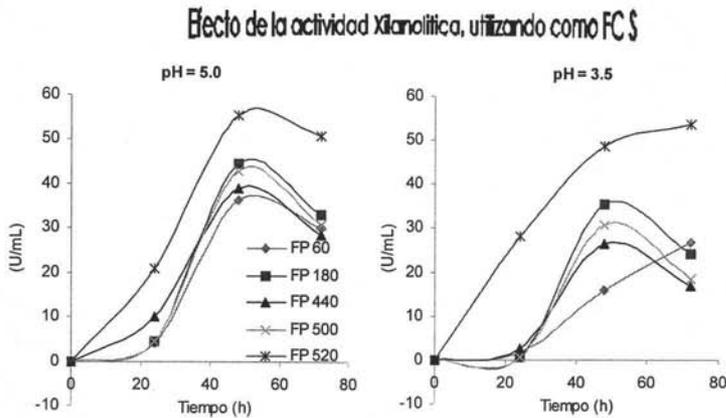


Fig. IV. 3. Efecto del pH inicial (5.0 y 3.5) en la actividad xilanolítica, utilizando como fuente de carbono semilla (S) al 3%, con 5 diferentes cepas.

En lo que respecta al pH durante la fermentación, se observó que a pH inicial (pHi) de 5.0 éste aumentó a las 24 h (5.1 – 5.7) para todas las cepas a excepción de la cepa 500 cuyo pH bajó (4.1). Posteriormente el pH bajó hasta valores de 3.0 – 3.5 en todas las cepas. La cepa 500 mostró un comportamiento diferente a las de las otras cepas blancas en la evolución del pH durante la fermentación. Esto probablemente explique el porque la actividad xilanolítica diferente a las 24 h y apoya la teoría de que esta cepa consumió más rápido los azúcares simples. Estos resultados indican que la cepa 500 se adaptó mejor a estas condiciones de crecimiento con respecto a las otras cepas blancas.

Cuando se llevó a cabo la fermentación a un pH inicial de 3.5 el perfil parece similar al del pH 5.0; ya que las cepas que presentaron poca actividad xilanolítica a las 24 h a ese pH. Sin embargo, se observan cambios en el transcurso de la fermentación debido al cambio del pHi. La cepa que presenta diferencias más notorias es la FP 500, en la cual los valores de actividad bajan en aproximadamente un 38% a un pHi de 3.5 con respecto al máximo de actividad alcanzada para esta cepa (Fig IV.2).

Al utilizar como fuente de carbono a un pH de 5.0 la fracción S, la actividad xilanólítica en función del tiempo presenta otro perfil (Fig. IV.3), se puede observar que la actividad xilanólítica alcanza su máximo a las 48 h, seguido de una disminución.

En este tipo de fuente de carbono los reductores directos al inicio de la fermentación fueron de 0.5 – 0.9 mg/mL, por lo que sugiere que los principales componentes presentes en el medio de cultivo son polisacáridos, por lo cual los microorganismos para poder alimentarse requieren de enzimas que los degraden.

Probablemente la disponibilidad del sustrato fue limitada y la acción de las enzimas no fue tan eficiente, ocasionando así que a las 24 h los reductores directos solo aumentaron ligeramente, a excepción de la cepa 520 en donde los reductores directos aumentaron hasta 2 mg/mL a este tiempo y disminuyeron subsecuentemente hasta valores de 0.6 mg/mL. Para el resto de las cepas (60, 180, 440 y 500) en el tiempo subsiguiente hubo una acumulación de los azúcares reductores en el medio de cultivo hasta valores de 1.8 – 2.2 mg/mL al tiempo 72 h (Fig. IV.2), lo que provocó que para estas cepas la inducción de xilanasas se vio reprimida y por ende disminuyó la actividad xilanólítica.

Al iniciar la fermentación a un pH de 3.5 usando como fuente de carbono la fracción S se observó que el pH afectó la producción de xilanasas, especialmente a las cepas blancas, ya que disminuyó la actividad en éstas y en la cepa 60 incluso afectó en la evolución de la actividad xilanólítica durante la fermentación; para la cepa 520 no le afectó considerablemente el cambio de pH, sugiriendo que esta cepa es capaz de adaptarse mejor que las otras, a este tipo de cambio en estas condiciones de crecimiento.

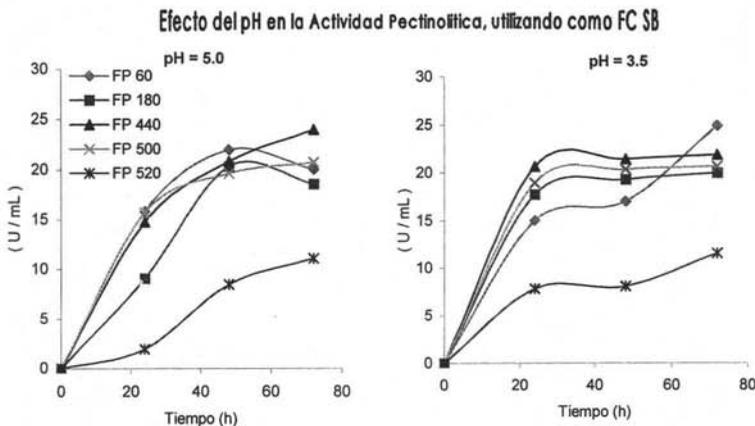


Fig. IV.4. Efecto del pH inicial (5.0 y 3.5) en la actividad pectinolítica, utilizando como fuente de carbono la fracción semilla + baazo (SB) al 3% con 5 diferentes cepas.

a) Actividad Pectinolítica

En la actividad pectinolítica al usar como fuente de carbono la fracción SB a un pH inicial de 5.0 (Fig. VI.4), se observó que entre las cepas blancas no hay diferencias significativas, pero con respecto a la cepa negra (FP 520) la actividad de éstas es mayor.

A diferencia de las xilanasas, la síntesis de pectinasas no parece afectarle a las 24 h por la concentración inicial de los reductores directos. Así mismo el cambio de pH tampoco afectó considerablemente la producción de pectinasas, ya que los valores de actividad entre cada condición difieren entre sí en ± 2 U/mL. No obstante en otros trabajos se ha observado que el pH es una variable importante en la secreción de enzimas pectinolíticas (Fabela, 2000).

Los resultados obtenidos al usar como fuente de carbono la fracción S a pH de 5.0 y 3.5 la actividad pectinolítica mostró una tendencia similar que al usar la fracción SB y de igual manera la cepa 520 es la que menor actividad pectinolítica presentó (Fig. IV.5).

Efecto del pH en la Actividad Pectinolítica, utilizando como FC S

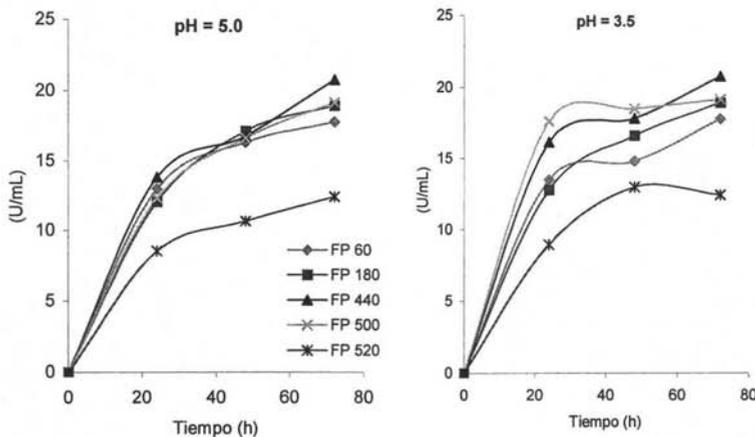


Fig. VI.5. Efecto del pH inicial (5.0 y 3.5) en la actividad pectinolítica, utilizando como fuente de carbono la fracción semilla (S) al 3%, con 5 diferentes cepas.

Con fines de comparar todas las variables presentadas anteriormente, se graficó la actividad xilanolítica y pectinolítica en las cuatro variables a las 72h (el 62.5% de las actividades máximas obtenidas tanto xilanolíticas como pectinolíticas fueron a las 72 h) Fig. IV.6. Entre lo más importante de esta figura destaca:

- Las condiciones de fuente de carbono y pH que favorecieron la síntesis de xilanasas en mayor proporción fue la fracción SB a pH inicial de 5.0 para todas las cepas a excepción de la cepa 60, la cual presentó su actividad máxima a pH de 3.5 en SB.
- La cepa 520 fue la cepa que mejores actividades xilanolíticas obtuvo en cualquier condición (55.22 ± 3.70 U/mL); lo cual indica que esta cepa se adaptó bien aun cuando existieron cambios de fuente de carbono y pH, ya que no afectaron en gran proporción esta actividad. En contraparte esta misma cepa fue la de los valores más bajos de actividad pectinolítica.
- Prácticamente el comportamiento de las cepas blancas fue el mismo en cada condición evaluada; en la actividad xilanolítica la desviación estándar en cada condición fue de $\pm 2 - 6$ U/mL; mientras que para la actividad pectinolítica en todas las condiciones es de ± 2 U/mL. Esto se explica porque las cepas blancas produjeron prácticamente las mismas proteínas e incluso poco efecto tuvo el pH de inicio de la fermentación y el cambio de fuente de carbono (fracción SB y fracción S) en la secreción de éstas, aunque si hubo diferencias en la concentración en que fueron producidas (Fig.IV.7)

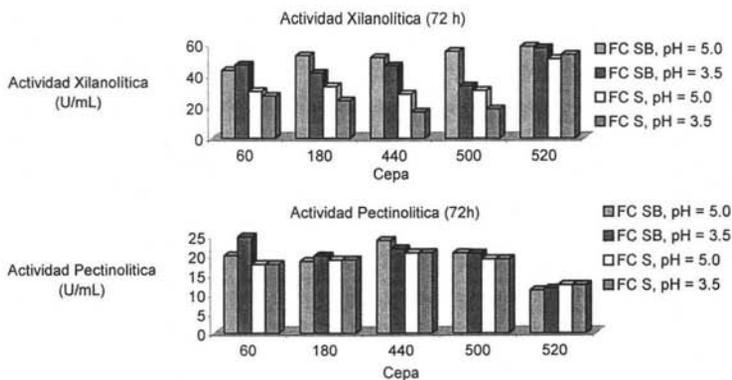


Fig. IV.6. Comparación de las actividades xilanolítica y pectinolítica a las 72 h entre las 5 cepas, en las cuatro condiciones utilizadas: Fuente de carbono (FC) SB a pH de 5.0 y 3.5 y FC S a pH de 5.0 y 3.5.

En la Fig. IV.7 se observa que el perfil de proteínas de la cepa negra (520) es muy diferente a las cepas blancas (60, 180, 440, 500). Esta cepa produjo más enzimas y esto explica porque su actividad fue mayor, no importando las condiciones utilizadas para la producción de enzimas xilanolíticas.

De los resultados anteriores se eligieron la fracción SB como fuente de carbono y un pHi de 5.0 para la producción de enzimas que degradan la pared celular de los desechos de tamarindo. Así mismo se eligieron dos cepas: 1) la cepa 520 por su gran capacidad de producir xilanasas, aun cuando su nivel de producción de pectinasas no fue el más alto; 2) la cepa 500 elegida porque a diferencia de las otras cepas presentó más resistencia a represión catabólica debida a la presencia de azúcares metabolizables en la síntesis de xilanasas; es la cepa que tuvo los valores más altos de actividad xilanolítica en las condiciones elegidas de fuente de carbono y pHi; porque al igual que las otras cepas blancas produjo buena actividad pectinolítica y aunado a que es una cepa de interés en el grupo de trabajo, ya que se están llevando a cabo más estudios para un conocimiento más amplio de esta cepa.

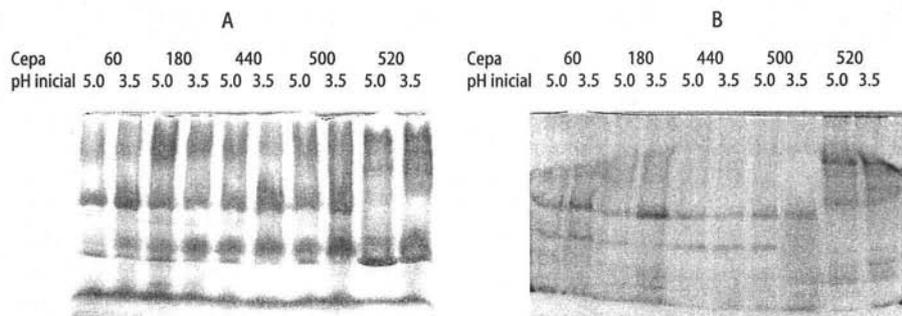


Fig. IV.7. Gel de proteína a las 72 h de la fermentación, utilizando como fuente de carbono la fracción SB (A) y la fracción S (B), pH 5.0 y 3.5, las cinco cepas.

IV. 2. Evaluación de la forma de esterilizar la fuente de carbono

En la etapa de selección se esterilizó la fuente de carbono (fracción SB) en seco debido a que este tenía una cantidad considerable de azúcares reductores al hidratarlo (los residuos de tamarindo tienen presentes monosacáridos como: glucosa, manosa, fructosa y disacáridos como xilobiosa, celobiosa, provenientes del remanente de la pulpa y semilla de tamarindo (Gunaseena, 2004.)). Por lo que se decidió evaluar la forma de esterilizar el sustrato para determinar si era la manera más conveniente de producción de enzimas xilanolíticas y pectinolíticas por las cepas 500 y 520.

Se utilizaron tres formas de esterilizar la fuente de carbono: Seco (SC): la fuente de carbono se esterilizó separado del medio basal como su nombre lo indica sin presencia de agua; Suspensión junto (SJ): se esterilizó la fuente de carbono junto con el medio basal; y Suspensión separado (SS): la fuente de carbono se esterilizó con una parte de agua separado del medio basal. Los resultados se muestran en la figura IV.8.

El cambio en la forma de esterilizar la fuente de carbono afectó la producción tanto de xilanasas como pectinasas. En el caso de la cepa 500 el valor máximo alcanzado de actividad xilanólítica es muy parecido al utilizar sustrato esterilizado en seco y en suspensión separado (Fig.IV.8). Sin embargo, esta actividad a las 24 h al esterilizar en SC es 18 veces mayor que al esterilizar en SS y 3.5 veces mayor a las 48h.

Para la cepa 520, la forma más apropiada para esterilizar la fuente de carbono fue en SC, ya que es en donde la actividad xilanólítica máxima fue mayor en aproximadamente un 18% con respecto a las otras dos formas de esterilizar la fuente de carbono.

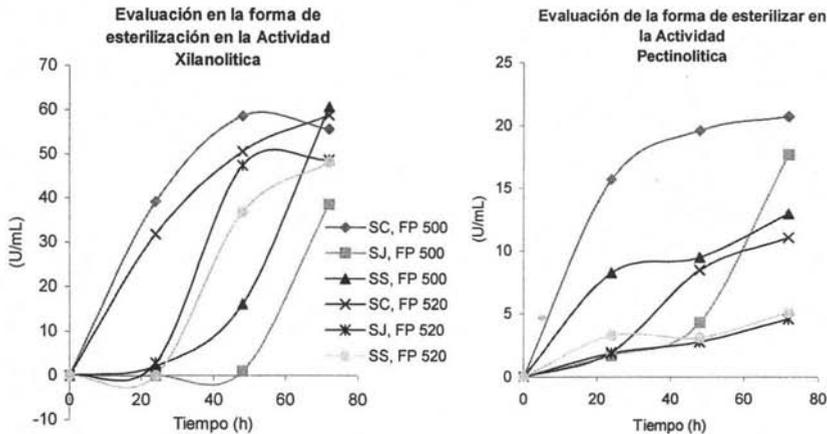


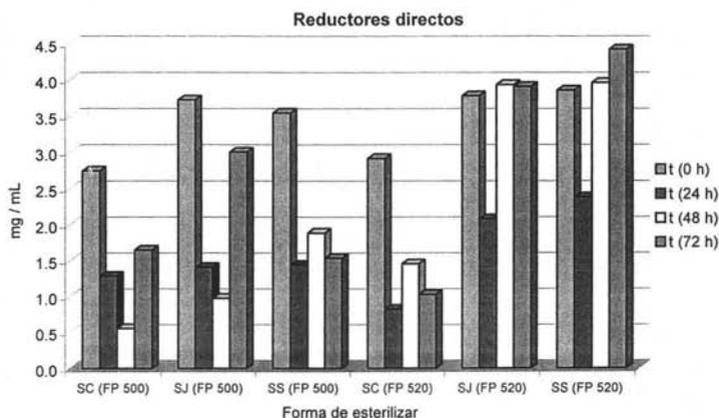
Fig. IV.8. Evaluación de la forma de esterilizar la fuente de carbono al 3%: Seco (SC), Suspensión junto (SJ) y Suspensión separado (SS) en la actividad xilanólítica y pectinolítica de la cepa 500 y 520.

De alguna manera al esterilizar la FC en SJ y SS cabe la posibilidad de que los polisacáridos sean parcialmente hidrolizados. En este caso, la fracción SB está compuesta por diversos polisacáridos y carbohidratos de bajo peso molecular (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, etc), que al estar en medio acuoso a pH ácido y al elevar la temperatura, se favorecen reacciones de hidrólisis de éstos, observándose así un incremento en los reductores directos al inicio de la fermentación (Fig. IV.9), lo que ocasiona que se retrase la producción de enzimas xilanólíticas en condiciones por la presencia de azúcares metabolizables. Esto es lo que ocurre al esterilizar la fuente de carbono en SJ y SS, pero cabe mencionar que la presencia de las sales tiene un efecto adicional, estas probablemente participen también en reacciones con los componentes de la fuente de

carbón, provocando así las diferencias en la producción de las xilanasas entre ambas formas de esterilizar la fuente de carbón. Por lo tanto, mientras menos afectada este la FC al inicio de la fermentación es mejor para la producción de xilanasas, reflejándose así en una actividad mayor al usar la FC esterilizada en SC.

En lo que respecta a la actividad pectinolítica Fig. IV.8, la cepa FP 500 claramente obtuvo la mayor actividad pectinolítica esterilizando la fuente de carbón en seco. Al parecer al igual que en la actividad xilanolítica la concentración de azúcares reductores al inicio de la fermentación afectaron negativamente la síntesis de pectinasas al esterilizar en SS y SJ. Aun cuando los valores de los reductores directos iniciales son similares en ambas condiciones (Fig. IV.9), la actividad xilanolítica no es la misma, lo que se puede atribuir a un efecto adicional debido a la presencia de las sales al esterilizarlas con el medio (Fig. IV.8).

La actividad pectinolítica de la cepa 520 es mayor al esterilizar la fuente de carbón en SC, y no se observó un efecto negativo por la concentración de los azúcares de bajo peso molecular inicial, sin embargo, parece que afectó en la disponibilidad del sustrato y la generación de azúcares reductores vía hidrólisis enzimática en el tiempo subsiguiente; es decir al ser el sustrato parcialmente degradado por las condiciones de esterilización, permitió que las enzimas actuaran más fácilmente, por lo que aumentó la concentración de azúcares reductores y se acumularon en el medio, reprimiendo el sistema pectinolítico, reflejándose en una actividad menor comparada con la obtenida al utilizar la fuente de carbón esterilizada en seco de la cepa 520.



Al llevar a cabo el análisis de proteína en estas condiciones diferentes de esterilizar la fuente carbón (Fig. IV.10), se observó que la cepa 500 produjo un número mayor de enzimas al esterilizar la FC en seco y con una concentración mayor. El perfil de proteínas al esterilizar en SJ y SS no fue muy diferente, pero si lo fueron

sus actividades. En el caso de cepa 520 la condición que provocó la secreción de un número menor de enzimas fue al esterilizar en SS, en las otras dos condiciones el perfil de proteínas fue muy similar entre sí. Ahora bien el perfil de proteínas en condiciones de esterilizado en SS y SJ fue diferente (Fig. IV.10), pero los valores reflejados de ambas actividades (xilanolítica y pectinolítica) a las 72 h no fueron muy diferentes entre sí, lo que indica que las enzimas secretadas en SS fueron las enzimas necesarias para llevar a cabo la degradación de los polisacáridos presentes en el medio de cultivo.

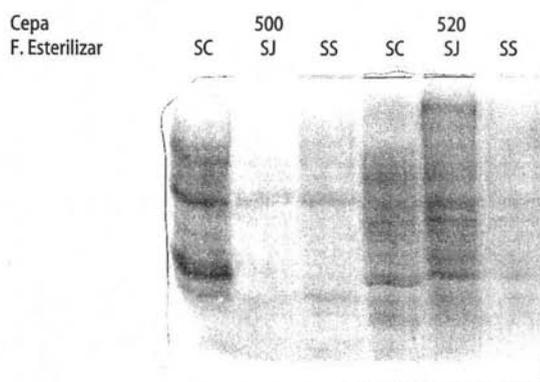


Fig. IV.10. Gel de proteína a las 72 h, de las 3 diferentes formas de esterilizar la fuente de carbono (SB).

IV. 3. Evaluación de la Fuente de Nitrógeno.

Los microorganismos son capaces de utilizar una gran gama de fuentes de nitrógeno (inorgánicas y orgánicas) para su crecimiento. Sin embargo, no todas las fuentes de nitrógeno proporcionan el crecimiento de estos de igual manera. Entre las fuentes inorgánicas de nitrógeno más comunes son los nitratos y sales de amonio, siendo consideradas estas últimas una buena fuente de nitrógeno junto con glutamina y asparagina, mientras que prolina y urea califican como pobres fuentes de nitrógeno (Sánchez and Demain, 2002; Hernández, 1995). En este contexto se evaluaron dos fuentes de nitrógeno inorgánicas: sulfato de amonio y nitrato de sodio y una fuente orgánica: extracto de levadura y se observó el efecto de estas en la producción de enzimas xilanolíticas y pectinolíticas (Fig. IV. 11). Cabe mencionar que el efecto del nitrógeno no es posible analizarlo separado del pH, ya que no se controló el pH durante de la fermentación.

Los resultados indicaron que para la cepa 500 la fuente más favorable para la producción de xilanasas es el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en esta fuente de nitrógeno se alcanzó a tiempos cortos buena actividad, tan solo 33% menos del

máximo alcanzado (48h); aunque usando NaNO_3 la actividad tan solo disminuyó en aproximadamente un 10% con respecto al máximo obtenido en ambas condiciones, pero a tiempos cortos esta actividad es aproximadamente 10 veces menor que con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En lo que respecta a la actividad pectinolítica el NaNO_3 , fue la fuente de nitrógeno que más favoreció ésta actividad, aunque tan solo disminuyó la actividad al usar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un 25%.

Finalmente en ambas actividades para esta cepa (500), la fuente de nitrógeno que produjo los valores más bajos fue al usar extracto de levadura.

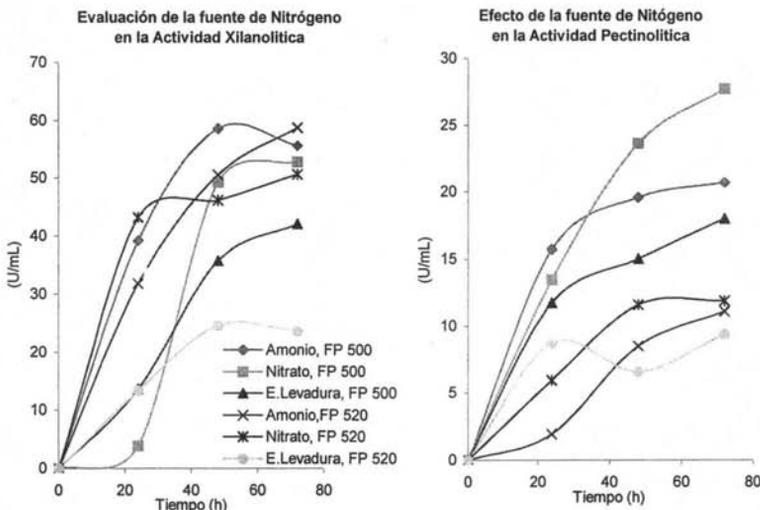


Fig. IV.11. Evaluación de la fuente de nitrógeno (0.106 g de nitrógeno/ 100 mL): Sulfato de amonio, Nitrato de sodio y Extracto de levadura en la actividad xilanolítica y pectinolítica de la cepa 500 y 520.

En el caso de la cepa 520 ocurre algo similar, los valores máximos de actividad xilanolítica fue usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y pectinolítica fue usando NaNO_3 como fuente de nitrógeno. Aunque a diferencia de la cepa 500 con NaNO_3 a tiempos cortos la actividad xilanolítica es mayor que con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, también se observó que la cepa 500 produce más actividad con extracto de levadura que la cepa 520.

Como se sabe el pH es uno de los factores que afecta a la producción de xilanasas y pectinasas (Harvey, 1994; Kurkarni et al, 1999), y que en gran medida los cambios de pH en el medio de cultivo (Fig. IV.12), son debido a la utilización de estas fuentes de nitrógeno.

Al utilizar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno a un pH de 5.0 y la cepa 500, el pH bajó progresivamente durante el transcurso de la fermentación hasta que se alcanzaron valores de 3.4, con NaNO_3 el pH subió a las 24 h pero bajó hasta valores de 3.2 aunque menos drástico que con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mientras que, cuando se usó extracto de levadura el pH subió hasta valores 6.2. Este último caso fue la condición más desfavorable para la producción de estas enzimas, ya que provocó la disminución de la actividad pectinolítica en aproximadamente un 35% y xilanolítica en un 28%, con respecto a la máxima actividad obtenida en ambos casos. En el caso de la cepa 520 el pH disminuyó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta valores de 3.0. El comportamiento al usar NaNO_3 y extracto de levadura es opuesto ya que aumentó el pH y se alcanzaron valores de 6.2 de pH. Estos cambios de pH parece que afectaron más a esta cepa en la producción de xilanasas, principalmente cuando se usó extracto de levadura donde la producción disminuyó hasta un 58% con respecto a la actividad máxima obtenida; en el caso de las pectinasas también disminuyó la actividad cuando se utilizó extracto de levadura pero solo un 22%. La diferencia entre las actividades xilanolítica y pectinolítica fue debida a que la utilización del nitrógeno inorgánico fue más fácil para estas cepas, que la del nitrógeno orgánico proveniente del extracto de levadura.

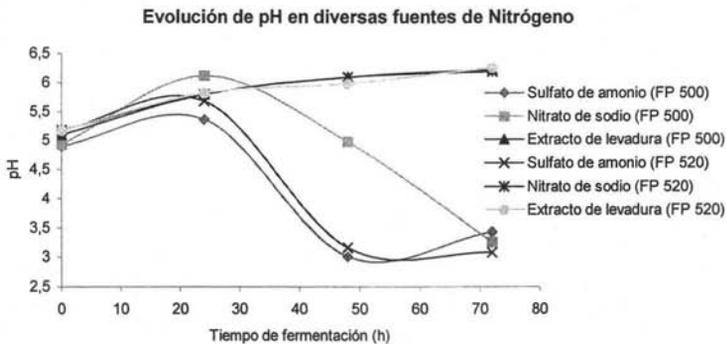


Fig. IV. 12. Evolución del pH al utilizar tres diferentes fuentes de nitrógeno: Sulfato de amonio, nitrato de sodio y extracto de levadura.

Para saber un poco más con respecto a que es lo que ocasiona el cambio de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo se llevó a cabo el gel de proteína a las 72 h. Encontrándose que esta variable provocó cambios en el perfil de proteínas secretadas al medio de cultivo. El número de proteínas secretadas por la cepa 500 cuando se usó NaNO_3 y extracto de levadura es mayor con respecto al número de proteínas secretadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En

el caso de NaNO_3 puede decirse que las enzimas adicionales producidas a diferencia del medio de cultivo que contiene $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pueden ser pectinasas más que xilanasas debido a la actividad pectinolítica fue mayor que las otras condiciones y/o enzimas que ayuden a la utilización del nitrógeno. En el caso del extracto de levadura, no parece ser ninguna de las dos, ya que las actividades evaluadas reflejaron menor actividad con respecto a las otras dos condiciones, probablemente las otras enzimas sean parte de la degradación de los péptidos, polipéptidos y carbohidratos que son parte de la composición compleja de la propia fuente de nitrógeno. Los cambios también se hicieron ver para la cepa 520 aunque en este caso, la cantidad de enzimas secretadas es menor con NaNO_3 y extracto de levadura.

IV. 4. Evaluación de la concentración de la fuente de carbono.

Otro de los aspectos evaluados en este estudio fue la concentración de la fuente de carbono (1%, 2% y 3%), se utilizaron concentraciones menores al 3% porque ya se sabía a esta concentración no había represión catabólica en estas cepas, lo que probablemente hubiera sucedido al aumentar la concentración, ya que conforme más aumenta la concentración del sustrato por ende también los azúcares solubles.

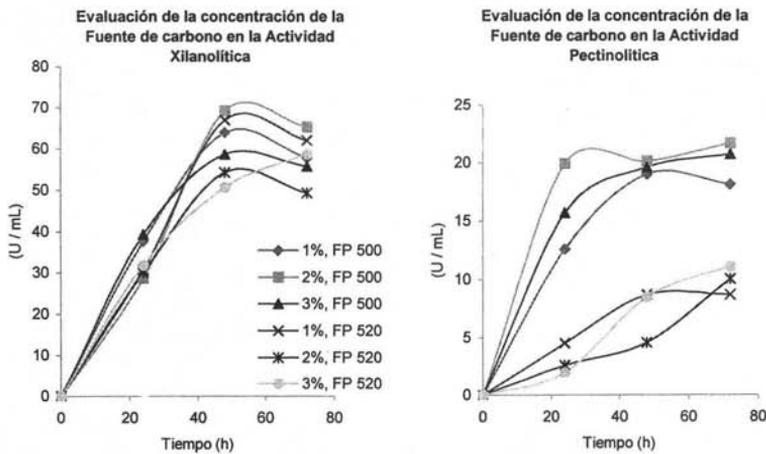


Fig. IV.13. Evaluación de la concentración de fuente de carbono (SB): 1% 2% y 3%, en la actividad xilanolítica y pectinolítica de la cepa 500 y 520

El máximo en la actividad xilanolítica, se obtuvo a las 48 h a excepción de la cepa 520 al 3% de fuente de carbono cuyo máximo es a las 72 h (Fig. IV. 13). En ambas cepas al inicio de la fermentación presentó un comportamiento muy similar, aun cuando la concentración de azúcares solubles es diferente entre cada concentración de la fuente de carbono (aumentó aproximadamente 1 mg/mL conforme se incrementó la concentración de fuente de carbono), conforme transcurrió el tiempo de la fermentación comenzó a existir diferencias entre los valores de actividad xilanolítica, en el caso de la cepa 500 el máximo de actividad alcanzada fue a una concentración de 2% de fuente de carbono, tan solo un 7.5% menor al 1% de concentración y 11.5% al 3% de fuente de carbono. Para la cepa 520 el máximo de actividad se obtuvo a una concentración del 1%, siendo 19% menor la actividad a una concentración de fuente de carbono al 2% y 12% menor al 3%.

La actividad pectinolítica máxima en la mayoría de los casos se obtuvo a las 72 h con excepción de la cepa 500 al 1% de fuente de carbono en donde se alcanzó a las 48 h. La concentración del 2% fue la condición que permitió que la cepa 500 produjera el máximo de esta actividad, aunque no muy diferente de lo que se produjo al 3% ya que la diferencia es de aproximadamente del 5%. La cepa 520 produjo el máximo de actividad al 3% de concentración de fuente de carbono tan solo el 10% mayor al 2%.

Los resultados mostraron que no existe una tendencia en la producción de xilanasas y pectinasas en ambas cepas con el aumento de la concentración de la fuente de carbono. En otros trabajos si ha existido una relación directa de concentración con la producción de enzimas, tal es el caso de algunas xilanasas que aumentaron conforme aumentó la concentración de la fuente de carbono (Kulkarni et al, 1999).

Al observar el perfil de proteínas se hace notar el porque la diferencia de las actividades evaluadas no fue grande. En el caso de la cepa 500 el perfil no fue diferente a ninguna concentración de fuente de carbono (Fig. IV.14), sin embargo, si existió diferencia en la concentración de algunas de las proteínas, la concentración mayor se observó al 2%, lo que se refleja en ambas actividades evaluadas (Fig. IV.13), el perfil de la cepa 520 fue más similar a las concentraciones 1% y 2%, ya que al 3% no hubo secreción de algunas enzimas de peso molecular alto que si lo fueron al 1 y 2%, sin embargo, esto no pareció afectar en gran medida la actividad xilanolítica y pectinolítica.

De esta etapa se decidió elegir como concentración de fuente de carbono el 3% sencillamente porque así es posible usar una mayor cantidad de los residuos y poder darles otro uso ayudando así a la contaminación ambiental que podrían generar estos residuos y a su vez porque al ser un material parcialmente degradado, se

le podría dar otro uso como por ejemplo: alimento para ganado, con la ventaja de que sería más fácilmente asimilable para los animales que lo consuman.

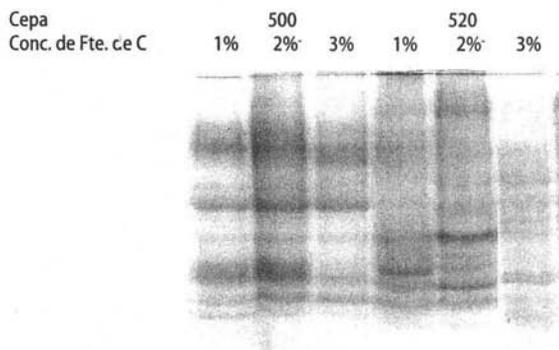


Fig. IV.14: Gel de proteína de muestras provenientes de las 72 h, de las fermentaciones a diferentes concentraciones de fuente de carbono.

IV. 5. Degradación de otros fragmentos de la pared celular por enzimas producidas en residuos de tamarindo

Como ya se mencionó la naturaleza de la fuente de carbono es compleja, de tal manera que están presentes diversos polisacáridos como son: celulosa, xilano, xiloglucano, pectina e incluso monosacáridos y disacáridos. Esta gran diversidad de compuestos propone que las enzimas producidas, no solo sean pectinasas y xilanasas como ya se mostró. Por esto se decidió evaluar la actividad celulolítica, xiloglucanolítica y otras actividades como son de: β -glucosidasa, β -galactosidasa, α -galactosidasa, β -xilosidasa, α -xilosidasa y α -arabinosidasa.

La determinación de estas actividades enzimáticas se llevó a cabo utilizando filtrados enzimáticos provenientes de las condiciones elegidas para la producción de enzimas xilanolíticas y pectinolíticas de las evaluaciones anteriores, por lo tanto son de las fermentaciones, en donde se esterilizó en seco la fuente de carbono al 3% y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a pH inicial de 5.0 utilizando la cepa 500 y 520.

1) Actividad Celulolítica

Gran parte de los residuos de tamarindo comprenden la semilla de tamarindo y esta a su vez es rica en un polisacárido llamado xiloglucano, este polisacárido tiene una interacción muy estrecha por puentes de hidrógeno con la celulosa formando así una red (XG/celulosa) (Fry, 1989; Pauly et al, 1999; O'Neill and

Selvendran, 1983; York and Eberhard, 2004). Por lo tanto se decidió evaluar si estas cepas eran capaces de producir celulasas, ya que podrían ser inducidas por la presencia de celulosa en el medio de cultivo.

Los resultados se muestran en la Fig. IV.15. La producción de celulasas en el transcurso de la fermentación en ambas cepas no es el mismo; la cepa 500 tiene el máximo de actividad a las 48 h mientras que la cepa 520 a las 72 h siendo este último 8% mayor a la actividad máxima producida por la cepa 500. La presencia de celulasas en el medio de cultivo, indica que la celulosa presente en el medio de cultivo indujo estas enzimas, ya que sin la presencia de ésta no es posible la inducción, este fenómeno de inducción se logra ver en el trabajo de Hernández A, en donde demostró que en fuentes de carbono como son xilanos de avena, xilanos de abedul, olote, CMC y CMC + xilanos de abedul utilizando cepas de *Aspergillus sp.*, la actividad celulolítica es baja o nula. Aunque también cabe la posibilidad de que ésta inducción también hayan participado otros componentes presentes en el medio, ya que en otros trabajos se ha reportado producción de celulasas son: aparte de celulosa están la soforosa, celobiosa, glucosa y xilosa (De Vries, R.P., 1999).

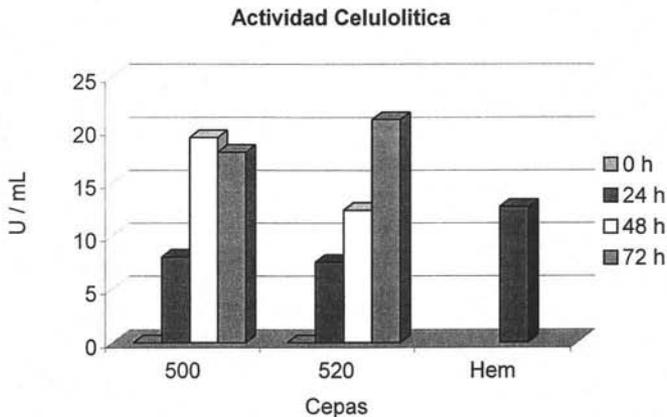


Fig. IV.15. Actividad celulolítica (U/mL) a tiempo de 0, 24, 48, 72h de fermentación de las cepas 500 y 520 crecidas en SB de tamarindo al 3% esterilizado en seco a pH inicial de 5.0 y fuente de nitrógeno sulfato de amonio; así como de una hemicelulasa comercial (0.03074 mg de enzima) como control de validación de la técnica.

En la figura IV.15 también se muestra un valor de esta actividad con fines comparativos, de una hemicelulasa comercial con actividad celulolítica producida por *Aspergillus niger*. Esta hemicelulasa se purificó para eliminar el vehículo en el que venía, que era lactosa. Se hizo pasar por una columna de desalación de 5x10 mL de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories, Econopac10 DG, Disposable Desalting Columns) una solución de 25

mg/mL y se hicieron recolecciones cada 3 mL y se leyeron a una absorbancia de 280 nm, tomándose únicamente las 6 primeras fracciones (datos no mostrados) y posteriormente llevándose a cabo una diálisis de este filtrado. A este filtrado se le determinó la actividad xilanólica (20.9 U/mL), los reductores directos (0.17 mg/mL), la concentración de proteína (0.307 mg/mL) y la actividad celulolítica (12.8 U/mL).

2) Actividad Xiloglucanólítica

Para determinar la actividad sobre xiloglucano (XG), se llevó a cabo utilizando el XG extraído a partir de la semilla de tamarindo en polvo, por medio de una extracción acuosa (Marry, M., et al., 2003), generalmente el xiloglucano proveniente de la pared celular de las plantas se extrae con álcali concentrado, esto es debido a la gran interacción que tiene este polisacárido con la celulosa, sin embargo, la semilla de tamarindo tiene poca cantidad de celulosa, lo que permite su extracción, al menos parcial del XG (Watt, D.K., et al., 1999). Además de XG extraído también se utilizó el XG comercial de la semilla de tamarindo (Megazyme International Ireland Ltd.)

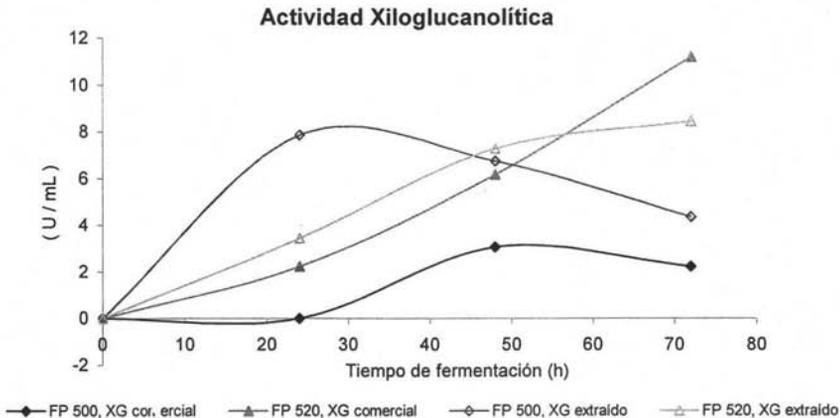


Fig. IV.16. Actividad xiloglucanólítica usando como sustrato xiloglucano de semilla de tamarindo (U/mL) a tiempo de 0, 24, 48, 72h de fermentación, de las cepas 500 y 520 crecidas en SB de tamarindo al 3% esterilizado en seco a pH inicial de 5.0 y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

La actividad xiloglucanólítica cuando se utilizó XG extraído como sustrato para la cepa 500 alcanzó su máximo a las 24 h seguida de la disminución de esta hasta valores de 4.36 U/mL a las 72 h de fermentación (Fig. IV.16), en lo que respecta a las otras actividades medidas, las actividades mayores se alcanzaron a finales de la

fermentación, lo que sugiere que tal vez esta (s) enzima (s) se deja (n) de producir, pero permanece en el medio de cultivo o bien es producida en pequeñas cantidades, ya que el microorganismo obtiene alimento a través de otros polisacáridos presentes debido a una mayor disponibilidad de estos en el medio de cultivo como son: xilano, pectina y celulosa. Sin embargo, al medir esta actividad utilizando XG comercial, no se obtuvo el mismo resultado; ya que el máximo fue a las 48 h y fue 61 % menor con respecto al máximo obtenido con el XG extraído. Esta diferencia radica principalmente a la pureza del sustrato y probablemente el XG extraído no solo contenga XG sino tal vez fragmentos de otros componentes hemicelulósicos solubles en agua y al llevar a cabo la actividad con el filtrado crudo, es posible que la actividad no solo sea debida a enzimas xiloglucanólíticas. Sin embargo se puede decir que el filtrado si posee actividad xiloglucanólítica, ya que el XG comercial es puro y si hay actividad.

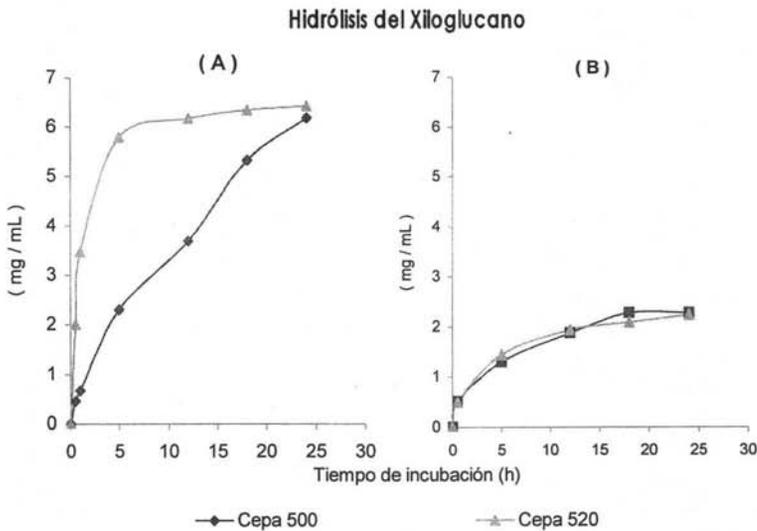


Fig. IV.17. Hidrólisis enzimática del xiloglucano, utilizando filtrados de las cepas 500 y 520 crecidas en SB de tamarindo al 3% esterilizado en seco a pH inicial de 5.0 y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. (A) Hidrólisis del XG comercial a diferentes tiempos de incubación, utilizando filtrados enzimáticos más concentrados; (B) Hidrólisis del XG extraído a diferentes tiempos de incubación, utilizando filtrados enzimáticos, tal cual de la fermentación (diluidos).

En lo que respecta a la cepa 520 la diferencia al utilizar XG extraído y XG comercial (Fig. IV.16) la actividad xiloglucanólítica no es tan diferente como en el caso de la cepa 500. A las 24 h y 48 h la actividad es ligeramente mayor utilizando XG extraído, pero observándose el mismo comportamiento en ambos sustratos y en ambos casos se alcanzó su máximo valor de actividad a las 72 h de la fermentación, pero en éste punto la

actividad con XG comercial superó en un 25% a la del XG extraído. Al no ser tan grande la diferencia entre ambas actividades en el transcurso de la fermentación como sucedió con la cepa 500, sugiere que las enzimas producidas por la cepa 520 son más específicas al xiloglucano. Probablemente en el XG extraído actuaron otras enzimas no xiloglucanólíticas presentes en el filtrado enzimático y que pudieron utilizar las impurezas del polisacárido extraído lo que pudo aumentar la actividad a las 24 y 48 h.

Como se sabe las celulasas también son capaces de degradar la cadena principal del xiloglucano, siempre y cuando no se encuentre sustituida y para descartar la posibilidad de que las enzimas producidas por ambas cepas sean en realidad celulasas más que enzimas que degradan el xiloglucano, se utilizó de nueva cuenta la hemicelulasa comercial con actividad celulolítica (Fig. IV. 14) y se determinó la actividad sobre XG extraído como sustrato, en condiciones iguales de ensayo que las de las cepas 500 y 520. No hubo actividad contra este sustrato, sin embargo al llevar a cabo la actividad utilizando el XG comercial su actividad es de 2.5 U/mL; y al ampliar el tiempo de incubación a 24 h en el caso del XG extraído, si se obtuvo degradación del sustrato lo que equivaldría a el valor de hidrólisis que se alcanzó con los filtrados enzimáticos de las cepas 500 y 520 a 5 h en éste sustrato (XG extraído)(Fig. IV. 17.B).

En la Fig. IV.17.B se muestra la hidrólisis del XG extraído en donde se utilizaron los filtrados provenientes tal cual de la fermentación (libres de células). La hidrólisis del polisacárido fue lenta y no se observó una diferencia significativa entre una u otra cepa. Al evaluar la hidrólisis del XG comercial se decidió utilizar los mismos filtrados pero más concentrados (Fig. IV.17.A), observándose así que la cepa 520, llevó a cabo la hidrólisis del polisacárido en un tiempo menor que la cepa 500.

Para saber un poco sobre los productos de degradación de la hidrólisis del XG extraído se utilizó la cromatografía en capa fina (TLC) utilizando las muestras provenientes de los diferentes tiempos de incubación (Fig. IV.18), apreciándose que a pesar de que existe generación de reductores, se confirma que la degradación del XG fue muy lenta y en la cromatopla no se observó cambio alguno. Al no liberarse carbohidratos de bajo peso molecular como pueden ser monosacáridos o disacáridos (Ver estándares Fig. IV.19), puede ser debido a que las enzimas que actúan en el XG extraído son endo – xiloglucanasas y los productos de degradación no migran en la cromatopla por lo que no fue posible observar el cambio en la degradación del XG extraído.

Por lo resultados anteriores se decidió utilizar los filtrados concentrados en lugar del filtrado original e incubados durante 24 h de reacción, los resultados mostraron que los productos de degradación del XG extraído fueron oligosacáridos y posiblemente también monosacáridos . Pero no fue posible la identificación de éstos, ya que se observó un barrido y no hay acumulación de un monosacárido en específico (Fig. IV.19),

dentro de los estándares utilizados, uno corresponde a la lactosa, aun cuando no se esperaba la producción de éste disacárido en la degradación se utilizó para dar una idea de cual es la migración de este disacárido, el cual es menor a los otros monosacáridos utilizados, por lo que se puede decir que tal vez los productos de degradación correspondan a disacáridos y/o trisacaridos, en relación de acuerdo a la migración del barrido que se observa en la Fig. IV.19.

Lo anterior escrito aplica para ambas cepas y la única diferencia en los resultados entre ellas es que para la cepa 500 la generación de azúcares más pequeños es mayor que para la cepa 520 de tal manera que se observó un barrido con desplazamiento mayor.

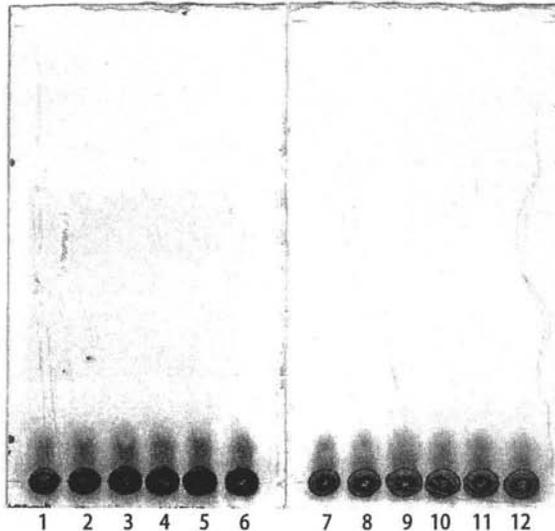


Fig. IV.18. Cromatografía en placa fina de productos de hidrólisis enzimática del XG, provenientes de la degradación del XG con los filtrados enzimáticos de las cepas 500 y 520, utilizando únicamente la parte soluble, concentrada. Las muestras de la 1 – 6 corresponden a la cepa 500 a diferentes tiempos de incubación: 0, 0.5, 5, 12, 18, 24 h respectivamente; mientras que las muestras de la 7 – 12 corresponden a las de la cepa 520 a los mismos tiempos de incubación

También se evaluaron los productos de hidrólisis del XG extraído con la hemicelulosa comercial y se observó que no se logró un cambio del polisacárido porque tanto a tiempo 0 y 24 h la muestra se vió igual, aun cuando si hubo actividad xiloglucanólítica después de las 24 h. Estos resultados por tanto sugieren, que además de ser producidas celulasas en las condiciones de crecimiento de FC fracción SB al 3% esterilizada en seco y sulfato de

amonio como fuente de nitrógeno, por las cepas 500 y 520; también fueron producidas enzimas que degradan específicamente al XG.

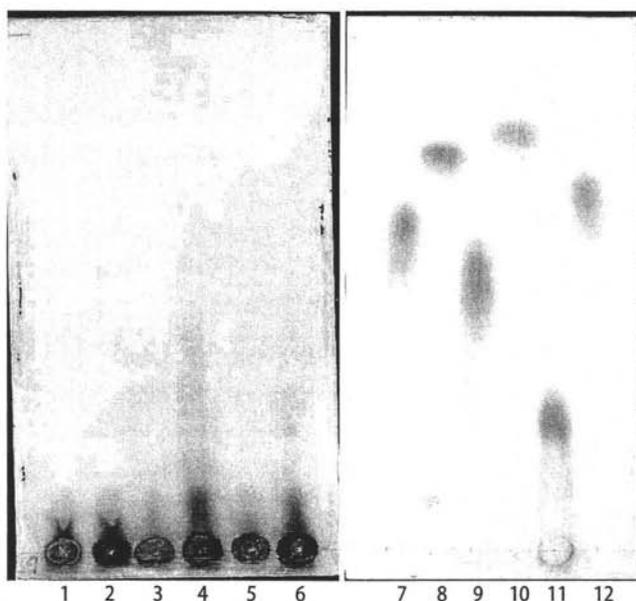


Fig. IV. 19. Cromatografía de placa fina de productos de hidrólisis del XG vía enzimática. 1 y 2 corresponden a la hidrólisis producida por la hemicelulosa comercial a tiempo 0 y 24 h de incubación, respectivamente; 3 y 4 corresponden a la hidrólisis producida por la el filtrado enzimático a las 72 h concentrado de la cepa 500 a 0 y 24 h de incubación respectivamente; 5 y 6 corresponden a la hidrólisis producida por la el filtrado enzimático a las 72 h concentrado de la cepa 520 a 0 y 24 h de incubación, respectivamente; 7. Glucosa, 8. Xilosa, 9. Galactosa, 10. Ramnosa, 11. Lactosa y 12. Arabinosa.

3) Enzimas que degradan cadenas laterales

Otras de las enzimas evaluadas en los filtrados enzimáticos de las cepas 500 y 520, fueron: β - glucosidasa, β -galactosidasa, α -galactosidasa, β -xilosidasa, α -xilosidasa y α -arabinosidasa, para determinar la actividad de estas enzimas, se ensayó utilizando el azúcar correspondiente acoplado a *p*-nitrofenol.

Algunas de estas enzimas actúan en cadenas laterales de los diversos polisacáridos que forman parte de la pared celular de las plantas. Tal es el caso de la α -arabinosidasa que actúa en las cadenas laterales del xilano y pectina; al igual que la β -galactosidasa, pero además esta enzima junto con la α -xilosidasa y α -galactosidasa actúan en las cadenas laterales del xiloglucano, esta última (α -galactosidasa) actúa principalmente en la

degradación de la cadena principal del galactomanano, que constituye otro de los polisacáridos de la pared celular de plantas.

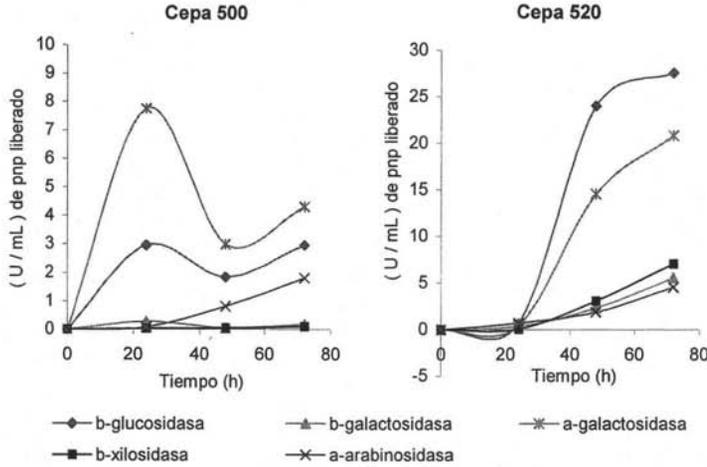


Fig. IV. 20: Actividad de β- glucosidasa, β-galactosidasa, α-galactosidasa, β-xilosidasa y α-arabinosidasa; utilizando como sustrato p-nitrofenol-β-D-glucopiranosido (pnp-β-D-glucopiranosido), pnp-β-D-galactopiranosido, pnp-α-D-galactopiranosido, pnp-β-D-xilopiranosido y pnp-α-L-arabinofuranosido respectivamente. Utilizando filtrados de las cepas 500 y 520 crecidas en SB de tamarindo al 3% esterilizado en seco a pH inicial de 5.0 y fuente de nitrógeno sulfato de amonio.

En la Fig. IV.20 se muestra la actividad de las enzimas evaluadas. Para la α-xilosidasa, no se detectó actividad alguna. Existen diferencias de opinión en que si esta enzima es capaz de utilizar este tipo de sustratos para determinar su actividad, lo cual podría deberse a que el sustrato es muy pequeño (Yoshikawa et al, 1993; Koyama et al, 1983; Fry, 1989; Grant and Edwards, 1995), esto permite que exista duda en si en verdad, se produjo esta enzima en el medio de cultivo y poder así ser detectada a través de la determinación de su actividad con un sustrato específico para esta enzima. Dado que esta enzima libera la D-xilosa unida al β-D-glucopiranosido por enlace α-1,6, lo más apropiado para determinar esta actividad sea la isoprimerosa (α-D-xyl-(1-6)-D-glc) o bien oligosacáridos de xiloglucano.

La actividad enzimática de cada una de las enzimas ensayadas resultó ser mayor en la cepa 520 con respecto a los valores de la cepa 500, aun cuando en la mayoría de los casos la cepa 500 en tiempos cortos de fermentación, la actividad de cada una de las enzimas fue mayor o similar que los de la cepa 520, a excepción

de la α -arabinosidasa. Sin embargo, en los tiempos subsiguientes la cepa 520 superó los valores de actividad producidos por la cepa 500.

Dentro las diversas enzimas evaluadas las que presentaron mayor actividad fueron: la β -glucosidasa y la α -galactosidasa en ambas cepas, observándose así un comportamiento similar de las actividades en cada cepa.

La actividad alta de la β -glucosidasa, en parte se debe a que el sustrato que se encuentra en mayor proporción es el xiloglucano, aunado a la presencia de celulosa en el medio de cultivo lo que permitió que se indujera más este tipo de enzima. En el caso de la α -galactosidasa, se ha reportado que la inducción de esta enzima se ha llevado a cabo en: arabinoxilano, glucosa, salvado de trigo y arroz, lactosa, galactonomanano, goma guar y galactosa (De Vries, 1999; De Vries and Visser, 2001), dado que en el medio de cultivo varios de estos componentes pudieron estar presentes lo que permitió que el microorganismo llevara a cabo la síntesis de esta enzima.

Algunas de estas enzimas actúan sobre el sustrato cuando este tiene un grado de polimerización de aproximadamente de $DP = 4$ tal es el caso de la β -xilosidasa y la β -glucosidasa, estas dos enzimas forman parte de la hidrólisis de la cadena principal del xilano y celulosa, XG respectivamente. El hecho de la cepa 500 produjo valores de actividad muy bajos para la enzima β -xilosidasa, aun cuando hay buena la actividad sobre xilano de abedul, sugiere que las xilanasas producidas por esta cepa son en su mayoría endoxilanasas y que tal vez para que exista una concentración mayor de β -xilosidasa se requiere de más tiempo de fermentación, en el caso de la cepa 520 fue 75 veces mayor el valor de actividad con respecto al valor máximo obtenido por la cepa 500 y fue aproximadamente 4 veces menor al valor máximo obtenido por la β -glucosidasa.

Aun cuando la cepa 520 produjo más actividad de β -xilosidasa, probablemente existe más síntesis de endoxilanasas porque la actividad xilanólítica sobre xilano de abedul dio valores altos y por tanto la sinergia de estos dos tipos de enzimas se refleja en un aumento de esta actividad.

En el caso de la α -arabinosidasa se ha reportado que ha sido producida usando como fuente de carbono arabinoxilano, remolacha de azúcar, paja de avena, xilano de abedul, L-arabinosa y L-arabitol (De Vries, 1999; De Vries and Visser, 2001). Y en este caso se observó que la actividad, para la cepa 500 es la tercera de mayor a menor, mientras que para la cepa 520 fue la que menor actividad produjo.

Entre ambas cepas existe una gran diferencia en cuestión de la actividad de cada una de las enzimas evaluadas, lo cual está relacionado de alguna manera en la síntesis de las mismas, estas diferencias tal vez se deban a que cada cepa prefiera algún tipo de sustrato en particular cuando existe una fuente de carbono tan heterogénea

como son los residuos de tamarindo, además de que la adaptación a las condiciones de crecimiento presentes en el medio de cultivo depende de cada cepa, lo que al final repercute en los valores de actividad.

Llevar a cabo la degradación completa de los polisacáridos de la pared celular de las plantas por ambas cepas, se requiere tanto de las enzimas la cadena principal, así como de las que degradan las cadenas laterales.

4) Electroforesis y determinación de actividad "in situ".

Al llevar a cabo el perfil de proteínas y así mismo la actividad "in situ" (utilizando xilano de avena para la actividad xilanolítica y pectina para la pectinolítica) de las proteínas producidas a las 72 h tanto por la cepa 500 y 520 en las condiciones que se han estado manejando. Se encontró así que, en principio las proteínas producidas por una u otra cepa no son las mismas, pero si existen proteínas que coinciden en ambas Fig. IV.21. El número de enzimas producidas extracelularmente fue mayor por la cepa 520. Esto podría explicar, en cierta manera, el porque la cepa 520 en las diferentes actividades determinadas en este trabajo fueron mayores en comparación con la cepa 500 y también indica que cada una de las cepas puede utilizar de manera diferente los diferentes heteropolisacáridos presentes en el medio de cultivo para crecer, de tal manera que la inducción de las enzimas que se requieren para la utilización de los polisacáridos presentes sea diferente y por lo que el perfil enzimático difirió entre ambas cepas.

Algunas de las enzimas producidas al llevar a cabo la actividad en geles de electroforesis, se identificaron como xilanasas y pectinasas (Fig. IV.21). En el caso de la actividad xilanolítica "in situ", la cepa 500 presentó un halo de hidrólisis correspondiente a una banda de proteína (s) de un peso molecular de aproximadamente 79 KDa, mientras que para la cepa 520 se observaron dos halos de hidrólisis, el primero correspondió a tres bandas de peso molecular de 45, 43 y 39 KDa aproximadamente y la segunda correspondió a dos bandas 32.7 y 31.9 KDa aproximadamente. En el caso de la actividad pectinolítica "in situ", la cepa 500 presentó un halo de hidrólisis correspondiente a una proteína de aproximadamente 49 KDa, sin embargo no se logró observar ningún halo de hidrólisis producido por las enzimas de la cepa 520; lo cual no es extraño ya que la actividad pectinolítica determinada cuantitativamente es menor en un 43% que la producida por la cepa 500, pudiendo ser una razón por la que no se logró apreciar esta actividad en el gel de electroforesis.

Diversos trabajos han reportado la producción de endoxilanasas y β -xilosidasas, las primeras en su mayoría son proteínas de bajo peso molecular fluctuando desde 10 – 52 KDa y en el caso particular de *A. niger* los valores fluctúan desde 13 – 33 KDa y *A. flavipes* 45 KDa; en el caso de las segundas enzimas mencionadas los valores son mayores a los de las endoxilanasas ya que los valores reportados van desde 60 hasta 122 KDa (De Vries and

Visser, 2001). En el presente trabajo no se pudo determinar el tipo de enzimas que produjeron los halos de hidrólisis, pero si se sabe que hubo producción de β -xilosidasas y seguramente también endoxilanasas. Tomando en cuenta los valores de peso molecular reportados, se podría decir los halos de hidrólisis que se observan en la cepa 520 de la actividad xilanolítica "in situ" pueden ser endoxilanasas.

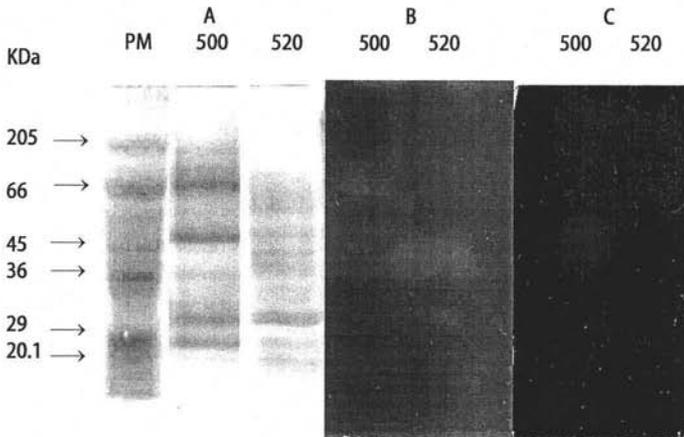


Fig. IV. 21. A) SDS-Page de proteínas producidas por las cepas 500 y 520 crecidas en SB de tamarindo al 3% esterilizado en seco a pH inicial de 5.0 y fuente de nitrógeno sulfato de amonio. B) Zimograma que muestra halos de hidrólisis producidos por las bandas proteicas que presentan actividad xilanolítica. C) Zimograma que muestra los halos producidos por las bandas proteicas que presentan actividad nectinolítica.

Los valores de peso molecular de las endo- y exo-poligalacturonas reportados fluctúan de 35 – 80 kDa y 40 – 66 kDa respectivamente (De Vries and Visser, 2001). De igual manera no fue posible determinar a cual tipo de enzimas se trata o si son ambas las que fueron producidas en esta fuente de carbono (fracción SB al 3%).

El resto de las enzimas que no presentan ninguna de las dos actividades "in situ" evaluadas, pueden ser aquellas que participan en la hidrólisis de sustratos como la celulosa, el xiloglucano de la cadena principal, así como aquellas que rompen los enlaces de las cadenas laterales de los diversos polisacáridos presentes en la fuente de carbono.

V. CONCLUSIONES

1. Las 5 cepas utilizadas fueron capaces de utilizar los residuos de tamarindo como única fuente de carbono para crecer, ya sea utilizando la fracción semilla + bagazo, así como solamente la fracción semilla, de tal manera que fue posible la producción de enzimas que degradan los polisacáridos presentes en los residuos como son: xilanasas y pectinasas, a los dos diferentes pH's iniciales utilizados (5.0 y 3.5).
2. Las cepas 60, 180 y 440 presentaron represión catabólica debida a la presencia de carbohidratos de bajo peso molecular a una concentración de 2.5-3.0 mg/mL al inicio de la fermentación al utilizar la fracción semilla + bagazo como fuente de carbono y siendo más sensible a este fenómeno las xilanasas que las pectinasas. En el caso de las cepas 500 y 520, la represión catabólica se presentó a una concentración de 3.5 – 4.0 mg/mL.
3. La actividad xilanolítica y pectinolítica fue mayor al utilizar la fracción semilla + bagazo como fuente de carbono.
4. El pH inicial que favoreció más la actividad xilanolítica fue a 5.0 y en la actividad pectinolítica fue indistinto el pH de inicio de la fermentación.
5. La cepa 520 fue la cepa que mejores valores de actividad xilanolítica produjo y también fue la que se vio menos afectada por los cambios de pH y fuente de carbono. Sin embargo también fue la que tuvo los valores más bajos de actividad pectinolítica en todas las condiciones utilizadas de pH y fuente de carbono.
6. El comportamiento de las cepas blancas en las diferentes condiciones fue muy similar entre sí, pero la cepa 500 fue la que tuvo mayor actividad xilanolítica y valores muy similares en la actividad pectinolítica.
7. La forma más adecuada de esterilizar la fuente de carbono fue en seco, ya que en esta condición se obtienen actividades xilanolíticas y pectinolíticas mejores tanto para la cepa 500 y 520.

8. Al utilizar sulfato de amonio como fuente de nitrógeno se vió favorecida la actividad xilanólítica, tanto en la cepa 500 y 520, mientras que la actividad pectinolítica fue mayor cuando se utilizó nitrato de sodio como fuente de nitrógeno en ambas cepas.
9. Las concentraciones de la fuente de carbono diferentes (1%, 2% y 3%) utilizadas no ocasionan un cambio radical en la actividad xilanólítica y pectinolítica. Sin embargo el utilizar los residuos de tamarindo al 3% tiene beneficios adicionales como son: el usar más cantidad de éstos para ayudar a disminuir la contaminación ambiental generada por los mismos, además los sólidos residuales de la fermentación pueden ser utilizados como alimento para ganado, con la ventaja de que este alimento se encontrarían parcialmente degradado y enriquecido con proteína.
10. Además de xilanasas y pectinasas la cepa 500 y la 520 produjeron otras enzimas: celulasas, xiloglucanasas, β - glucosidasa, β -galactosidasa, α -galactosidasa, β -xilosidasa y α -arabinosidasa. Pero los valores de actividad de cada una fueron mayores en la cepa 520.
11. El perfil de las enzimas producidas por la cepa 500 y 520 producidas a 3% de semilla + bagazo como fuente de carbono esterilizado en seco, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y a pH de 5.0, es diferente entre sí, siendo la cepa 520 la que produjo mayor numero enzimas. Algunas de las enzimas secretadas por ambas cepas se identificaron como xilanasas y pectinasas; en la cepa 520 se identificaron 5 enzimas con actividad xilanólítica, cuyos pesos moleculares son de aproximadamente 45, 43, 39, 32.7 y 31.9 KDa y en la cepa 500 se identificó solo una enzima con esta actividad con un peso molecular aproximado de 79 KDa, pero adicionalmente se identificó otra enzima con actividad pectinolítica con peso molecular aproximado de 49 KDa.
12. Algunas de las enzimas producidas por las cepas 500 y 520 ya tiene aplicación en la industria de los alimentos, ya sea como filtrados crudos o parcialmente purificados (elaboración de pan de harina de baja calidad, clarificación de jugos, extracción de aceites, etc), o bien la utilización de alguna enzima en específico (por ejemplo: β -galactosidasa mejora la gelificación de los galactomananos, producción de leche deslactosada), por lo que sería posible utilizar el filtrado enzimático en alguna de estas aplicaciones, e incluso sería posible ampliar los usos de éstas.

La utilización del xiloglucano es limitado y este podría ampliarse a través de la modificación enzimática, para esto sería necesario la caracterización y purificación de enzimas que degraden el xiloglucano, en condiciones de óptimas de producción e incluso a través de la sobre expresión de las enzimas después de la modificación genética de las cepas.

VI. Referencias

1. **Anon.** (1976) *Tamarindus indica* L. In The Wealth of India (Raw Materials Series) Vol.X: 144-122. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi.
2. **Barba, C.** (2002). Síntesis de carboximetilcelulosa (CMC) a partir de pastas de plantas anuales. http://www.tdx.cesca.es/TESIS_URV/AVAILABLE/TOX-0812102-093854/
3. **Bastwade, K.B.** (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of act. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 353 – 368.
4. **Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S.** (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 326 – 338.
5. **Bhattacharyya, P. K, Bal, S. and Mukherji, R. K.** (1994) Studies on the characteristics of some products from tamarind (*Tamarindus indica* L.) kernels. Journal of Food Science and Technology (India), 31(5): 372-376.
6. **Blandino, A., Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S.S., Webb, C.** (2001). Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. Process Biochemistry. 37: 497 – 503.
7. **Chambers, J.** (2000). Waste Management: Fuits and vegetables. 2609 – 2613. En: Prederick, J.F. Wiley Encyclopedia of food science and technology. 2ª ed. Wiley Interscience Publication. USA.
8. **Coffey, D.G., and Bell, D.A** (1995). Cellulose and Cellulose Derivatives. 123 – 153. En: Alistar M. Stephen. Food Polysaccharides and their applications. Marcer Dekker Inc, New York USA.
9. **Coronel, R. E,** (1991) *Tamarindus indica* L. In Plant Resources of South East Asia, Wageningen ; Pudoc. No.2. Edible fruits and nuts. eds. E. W. M Verheij and R. E Coronel, PROSEA Foundation, Bogor, Indonesia: 298-301.
10. **De Vries, R.P.** (1999). Accesory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Tesis de Doctorado. Wageningen Agricultural University. Holanda. 2 – 29.
11. **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 – 522.
12. **Demain, A.L.** (2000). Microbial biotechnology. Trends in biotechnology. 18: 26 – 31.
13. **Edwards, M., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V., and Reid, J.S.G.** (1985). Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. Planta. 163: 133 – 140.

14. **Fabela, S.** (2000). Secreción de Pectinasas extracelulares de *Aspergillus* MGM-180 en condiciones extremas de pH. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias.
15. **Feungchan, S.,** Yimsawat, T., Chindaprasert, S. and Kitpowsong, P. (1996 a) Tamarind (*Tamarindus indica* L.) Plant genetic resources in Thailand. Thai Journal of Agricultural Science, Special Issue No.(1): 1-11.
16. **Fry, S.C.** (1989). The structure and functions of xyloglucan. Journal of Experimental Botany. 40 (120): 1 – 11.
17. **Fry, S.C.,** York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.P., Kato, Y., Lorences, E.P., MacLachlan, G.A., MacNeil, M., Mort, A.J., Reid, J.S., Seitz, H.U., Selvendran, R.R., Voragen, A.G.J., & White, A.R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan – derived oligosaccharides. Physiologia Plantarum. 89: 1 – 3.
18. **Grant, J.S.,** and Edwards, M.E. (1995). Galactomananos and Other Cell Wall Storage Polysaccharides in Seeds. 154 – 182. En: Alistar M. Stephen. Food Polysaccharides and their applications. Marcer Dekker Inc, New York USA.
19. **Gunasena, H.P.M.,** and Hughes, A. (2004). Tamarind (*Tamarindus indica* L.) International Center for Underutilized Crops, Southampton, UK. http://www.civil.soton.ac.uk/icuc/cd_icuc_ber_tamarind/content/tamarind/tamarind_book_html/index_fulla.htm
20. **Han, N.S.,** Robyt, J.F. (1998). Separation and detection of sugars and alditols on thin layer chromatograms. Carbohydrate Research. 313: 135 – 137.
21. **Hanif, A.,** Yasmeen, A., and Rajoka, M.I. (2004). Induction, production, repression and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. 94: 311 – 319.
22. **Harvey L.M.;** McNeil B. (1994). Liquid Fermentation System and Product Recovery of *Aspergillus*. pp 141-176. En: Smith J.E. Biotechnology Handbooks 7: *Aspergillus*. Plenum Press. New York.
23. **Hernández, A. M.** (1995). Evaluación del efecto del pH y la fuente de carbono sobre la producción de xilanasas en cepas de *Aspergillus* creciendo a 45°C. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. 1 – 18.
24. **Ilyin, V.K.,** Soldatov, I.A., Korniuschenkova, P.E., Grinin, A.S., Lykon, I.N., Safranova, S.A. (2004). Microbial utilisation of natural organic wastes. Acta Astronautica. 54: 357 – 361.
25. **Ishola, M. M.,** Agbaji, E. B. and Agbaji, A. S. (1990) A chemical study of *Tamarindus indica* (Tsamiya) fruits grown in Nigeria. Journal of Science, Food and Agriculture, 51: 141-143.

26. **Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R.** (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 77: 215 – 227.
27. **Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M.** (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 23: 411 – 456.
28. **Marathe, R.M., Annapure, U.S., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R.** (2002). Gelling behaviour of polyose from tamarind kernel polysaccharide. *Food Hydrocolloids*. 16: 423 – 426.
29. **Marry, M., Cavalier, D.M., Schnurr, J.K.** (2003). Structural characterization of chemical and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. *Carbohydrate Polymers*. 51: 347 – 356.
30. **Miller, G.L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 31: 426 – 428.
31. **Morad, M. M., El Magoli, S. B. and Sedky, K. A.** (1978) Physico-chemical properties of Egyptian tamarind seed oil. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 80: 357-359.
32. **Morton, J.** (1987). Tamarind. <http://www.hort.purdu.edu/newcrop/morton/tamarind.html>
33. **O'Neill, M.A., and Selvendran, R.P.** (1983). Isolation and partial characterization of a xyloglucan from the cell walls of *Phaseolus coccineus*. *Carbohydrate Research*. 111: 239 – 255.
34. **Olsson, L., Christensen, T., Hansen, K., Palmqvist, E.** (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 612-619.
35. **Orozco, M.** (2003). Evaluación de la capacidad de producción de sistemas enzimáticos complejos por cepas de *Aspergillus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química.
36. **Parenicová, L.** (2000) Pectinases of *Aspergillus niger*: A molecular and biochemical characterisation. Tesis de Doctorado. Wageningen Agricultural University. Holanda. 2 – 28.
37. **Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S.** (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The plant Journal*. 20 (6): 629 – 639.
38. **Puchard, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnický, L., Christakopoulos, P., Vrsanská, M., Kekos, D., Macris, B. J., and Bhat, M. K.** (1999). Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 355 – 361.
39. **Reid, J.S.G., Edwards, M. and Dea, I.C.M.** (1988). In Phillips, G.O., Wedlock, D.J., and Williams, P.A. (Eds), *Gums and stabilisers for the food industry 4*, (p 391). Oxford: IRL Press.

40. **Salunkhe, D.K., Kadam, S.S.** (1995). Handbook of fruit Science and Technology. Editorial Marcel Dekker, Inc., New York USA. 576 – 579.
41. **Sanchez, S., Demain, A.** (2002). Metabolic regulation of fermentation process. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 895 – 906.
42. **Shirakawa, M., Yamatoya, K., Nishinari, K.** (1998). Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme. *Food Hydrocolloids*. 12: 25 – 28.
43. **Smith, J.E.** (1994). *Biotechnology Handbooks: Aspergillus*. Volumen 7. Plenum Press. New York and London. 1 – 38, 177 – 204.
44. **Sulová, Z., Baran, R., Farkas, V.** (2001). Release of complexed xyloglucan endotransglycosylase (XET) from plant cell walls by a transglycosylation reaction with xyloglucan-derived oligosaccharides. *Plant Physiol. Biochem*. 39: 927 – 932.
45. **Thom, C., and Church, M.B.** (1926). The aspergilli. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
46. **Thom, C., and Raper, K.B.** (1945). A manual of the aspergilli. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
47. **Thompson, J.E., and Fry, S.C.** (2000). Evidence for covalente linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspensión cultured rose cells. *Planta*, in press.
48. **Vincken, J.P., Von den Broek, L.A., Van der Lei, D., Beldman, G., and Voragen, A.G.J.** (1997). Fungal and Plant Xyloglucanases May Act in Concert Liquefaction of Apples. *J.Sci. Food. Agric*. 73: 407 – 416.
49. **Voet & Voet.** (1990). *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona España.
50. **Watt, D.K., Brasch, D.J., Larsen, D.S., Melton, L.D.** (1999). Isolation, characterization, and NMR study of xyloglucan from enzymatically depectinised and non-depectinised apple pomace. *Carbohydrate Polymers*. 39: 165 – 180.
51. **Wen Lui, Yanling, L., Guirong, M.** (1999). Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochemistry*. 34: 67 – 72.
52. **Willats, W., McCartney, L., Mackie, W. and Knox, J.P.** (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. 47: 9 – 27.
53. **York, W. and Eberhard, S.** (2004). Xyloglucan and glycosil sequence. <http://www.ccrcc.uga.edu/~mao.xyloglc/x1ext.htm>
54. **Yoshikawa, K., Yamamoto, K., and Okada, S.** (1993). Isolation of *Aspergillus flavus* MO-5 producing two types of intracellular α -D-xilosidases: Purification and Characterization of α -D-xylosidase I. *Biosci. Biotech. Biochem*. 57 (8): 1275 – 1280.