



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS DE MANZANA RICOS  
EN RAMNOGALACTURONANOS PARA LA PRODUCCION  
DE ENZIMAS PECTINOLITICAS.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**KARINA GALICIA MONROY**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2005

m. 345820





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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


**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** PROF. RODOLFO PASTELIN PALACIOS.  
**VOCAL:** PROF. L. ORLANDO ABRAJAN VILLASEÑOR.  
**SECRETARIO:** PROF. GUILLERMO AGUILAR OSORIO.  
**PRIMER SUPLENTE:** PROF. MARCO ANTONIO ORTIZ JIMÉNEZ.  
**SEGUNDO SUPLENTE:** PROF. FRANCISCO RUIZ TERAN.

**LUGAR DE TRABAJO:**

LABORATORIO DE FISIOLÓGIA DE HONGOS FILAMENTOSOS,  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA CONJUNTO "E"  
FACULTAD DE QUIMICA UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:** DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO.



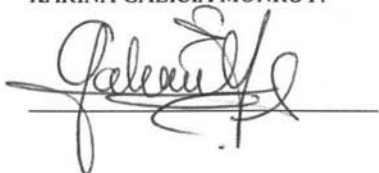
---

**SUPERVISOR TÉCNICO EXTERNO:** LIC. BLANCA TREJO-AGUILAR.



---

**SUSTENTANTE:** KARINA GALICIA MONROY.



---

Este trabajo se desarrollo con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del personal Académico (DGAPA). UNAM, proyectos IN219604 y IN207603.

#### AGRADECIMIENTO ESPECIAL.

Al Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel, por su apreciable apoyo en el análisis instrumental infrarrojo, que se llevo a cabo en la Universidad Autónoma de Coahuila.

#### RECONOCIMIENTOS.

Al Dr. Guillermo Aguilar, por ser no solo un distinguido académico sino, por ser un gran ser humano.

A mi asesor técnico, Blanca Trejo-Aguilar, que por su amor al trabajo, dedicación y paciencia hizo, posible la realización de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Perla, Melissa, Irene, Sr. Rodrigo, Cristian y en especial a Carlos y Elena, por sus valiosos comentarios y consejos que he recibido en todo momento.

A Ernesto Flores, Víctor Díaz, Arturo Aviles y Antonieta Reyes, trabajadores administrativos de la UNAM, que siempre me han brindaron su amistad, apoyo y ayuda incondicional, haciéndome la estancia en la UNAM una verdadera "casa de estudio".

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi amor y admiración a mi madre y hermana, y al recuerdo más hermoso que me ha dado la vida, su memoria.

## AGRADECIMIENTOS

Al amor de mi vida, amigo y compañero excelente Adrián Reyes, que por su amor, esfuerzo, enseñanza, y comprensión ha hecho realidad mis sueños.

A mis padres Juan Galicia y Julia Monroy, por haberme dado la vida, creer y confiar en mi en todo momento, inspirándome a ser mejor cada día.

A mis hermanas Erika, Alicia, Barbara, Liliana, Susana y Judit, por aceptarme ser siempre como soy, tomarme en cuenta y darme un lugar en su corazón, las amo.

A mi inseparable amiga Yazmín F. Pérez, por el cariño que nos ha unido siempre y estar en todos los momentos importantes. A la Sra. Hilda Conde por hacerme ver la vida más fácil y por sus valiosos consejos y ejemplo de lucha por la vida, gracias.

Al Sr. Hipólito, Ofelia, Susana, Armando y Luis Manuel, gracias por haberme aceptado con amor en su familia y contribuir en el término de mi carrera profesional y por tantas cosas que he recibido de ustedes.

A la Sra. Trinidad y Alejandro Díaz, por toda esa ayuda y compañía, siempre que lo he necesitado.

A mi tío José Luis Viniegra y mamá Jose, por enseñarme el cuidado y el amor que tiene cada cosa en la vida y apoyarme siempre sin interés alguno.

A todas aquellas personas que he tenido la fortuna de conocer y que de alguna manera forman parte en mi formación personal y profesional.

---

**CONTENIDO**

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES	5
Pectina	6
Pectinasas	9
<i>Aspergillus</i>	15
La manzana	
Origen, taxonomía y morfología	19
Importancia económica y distribución geográfica	21
Producción nacional	22
DIAGRAMA DE TRABAJO	26
MATERIALES Y METODOS	
Microorganismo	27
Preparación del inóculo	27
Preparación y condiciones de cultivo en medio líquido	27
Determinación de azúcares reductores	28
Determinación de actividades pectinolíticas	
Exopectinolítica	28
Endopectinolítica	28
Ramnogalacturonasa	29
Determinación de proteína	29
Electroforesis (SDS'PAGE) y actividad "in situ"	29
Extracción de ramnogalacturonano modificado (RGM) de manzana	30
Preparación y condiciones de cultivo en medio sólido	30
Crecimiento y detección de actividad enzimática, en medio sólido	31
Análisis infrarrojo con transformada de Forier (FTIR)	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Selección de cepas	32
Efecto del pH sobre la producción de enzimas pectinolíticas, de 5 cepas de <i>Aspergillus sp.</i>	37
Efecto de la concentración de fuente de carbono, sobre la producción de pectinasas en FP500 a pH 3 y 5.	39
Extracción del RGM y su evaluación como sustrato en actividad ramnogalacturonasa.	45
Crecimiento celular y detección de actividad enzimática en medio sólido de 10 cepas de <i>Aspergillus sp</i>	47
Análisis infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	49
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52

Los polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa y pectina constituyen cerca del 90% de los polímeros estructurales de la pared celular de plantas. La pectina esta compuesta por tres dominios estructurales Homogalacturonano (HG) también llamada región lisa, ramnogalacturonano I (RG I) y ramnogalacturonano II (RG II) denominada región peluda. Las pectinasas son enzimas capaces de degradar sustancias pécticas, por lo que son utilizadas en procesos industriales, tales como la producción de jugos de frutas, la manufactura de vinos y la despectinización de jugos, como el de manzana.

La principal fuente de obtención de estas enzimas es a partir de fermentaciones realizadas con hongos no patógenos del genero *Aspergillus*. Los hongos de este genero son bastante frecuentes en el ambiente, capaces de utilizar un sin numero de materiales como fuente de nutrición, poseen la capacidad de producir una gran variedad de enzimas, que por lo general son secretadas al medio.

Durante la fabricación de jugos de frutas se lleva a cabo una ultrafiltración, sin embargo, en algunos casos dicha filtración se ve limitada por la presencia de fragmentos de pectina residual, a la cual se le denomina ramnogalacturonano (RG). Dichas enzimas son de gran ayuda en la disminución de viscosidad por lo tanto, reduce el tiempo de filtrado y muy probablemente estas colaboran para una máxima extracción del fruto. Generalmente, las preparaciones pectinolíticas comerciales poseen un nivel muy bajo de ramnogalacturonasas, siendo estas importantes en la hidrólisis de esta fracción de pectina retenida en los procesos de filtración y provocando opalescencia y sedimentos indeseables en vinos. En este trabajo se utilizaron residuos de manzana para la producción de enzimas pectinolíticas. Lo anterior debido a que la manzana es uno de los frutos más importantes en el procesamiento industrial. Se presenta la extracción del ramnogalacturonano de la manzana fresca y su utilización como única fuente de carbono para el crecimiento de 10 cepas de *Aspergillus sp.* Esto último para verificar la capacidad degradadora que tiene dicho hongo cuando crece en fuentes de carbono de este tipo. Con esto se pretende colaborar en el buen uso de desechos orgánicos, y dar opciones en el manejo de residuos agroindustriales y no solo en el enfoque que generalmente se le ha otorgado a estos, sino en reciclar y poder obtener productos de alto valor agregado, los cuales puedan ser utilizados en la misma industria alimentaria.

## INTRODUCCION

Los polisacáridos constituyen del 80 al 90% de los polímeros estructurales de la pared celular de plantas. Entre estos se encuentran la celulosa, hemicelulosa y pectina.

La pectina es un heteropolisacárido compuesto por dos diferentes regiones estructurales. La primera, denominada homogalacturonano (HG) también llamada región lisa, que esta compuesta por una cadena principal de ácido galacturónico, unido por enlaces  $\alpha$ -1,4 pudiendo estar metilados y/o acetilados, (Fig. 1).

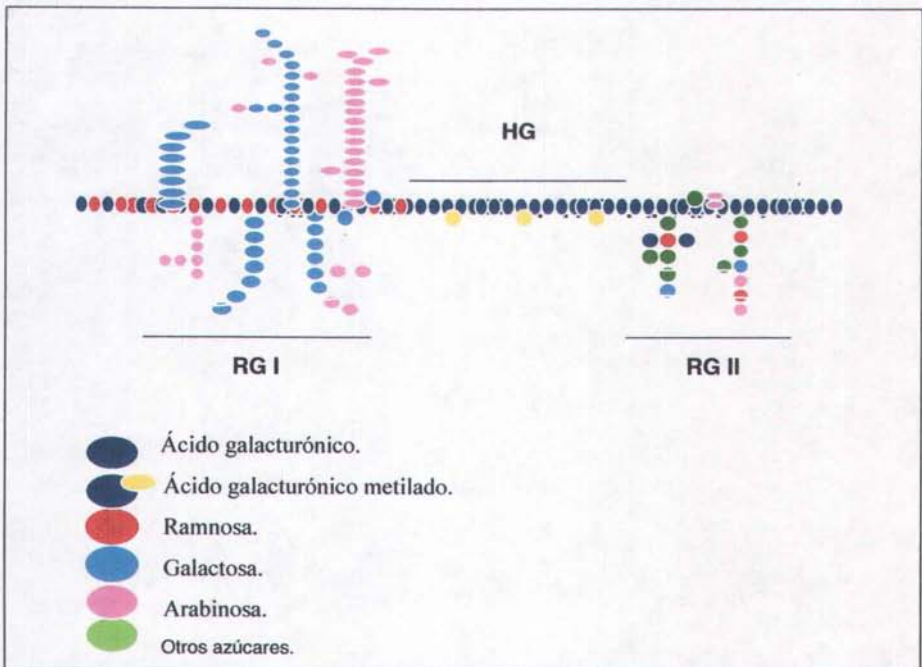


Fig. 1. Estructura hipotética de la pectina de manzana (Puvanésarajah et al, 1991).



La segunda esta compuesta por residuos de ácido galacturónico y ramnosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,2 en donde pueden estar unidas cadenas de arabinosa y galactosa en posición del carbono 4; a esta se le ha denominado ramnogalacturonano I y II (RG I y RG II) (Fig.2), y también es conocida como región peluda (Schols and Voragen, 1996).

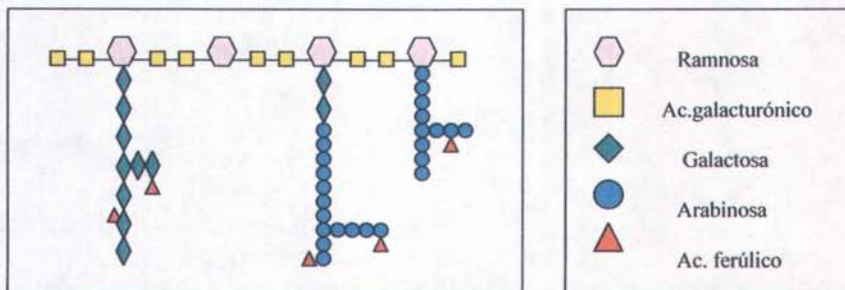


Fig. 2. Esquema de la región peluda de pectina, (Schols and Voragen, 1996).

Las pectinasas, son aquellas enzimas que pueden degradar las sustancias pécticas. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se pueden encontrar en plantas superiores y en microorganismos, saprofitos o patógenos. Son comercialmente importantes en la manufactura de jugos de frutas y vinos (Colagrande, et al, 1994). La manzana en el mundo es uno de los materiales más importantes para la producción de jugos y concentrados. La ultrafiltración de estos jugos se ve limitada, por la presencia de fragmentos de pectina no degradada. Estas fracciones de pectina ocasionan turbidez y sedimentos indeseables en vinos y otros productos, por lo que su eliminación es muy importante para garantizar la estabilidad de estos. Las preparaciones de pectinasas, han sido usadas para ayudar a la extracción del jugo y a la despectinización, durante la extracción del jugo, las paredes celulares son hidrolizadas, resultando un decremento en la viscosidad.

Un problema de la mayoría de las preparaciones comerciales de pectinasas, es la limitada hidrólisis, sobre el ramnogalacturonano. La búsqueda de microorganismos que puedan crecer y producir enzimas a partir de desechos de manzana, puede permitir la obtención de estas enzimas.

---

## OBJETIVOS

### Objetivo general.

Evaluación de residuos de manzana para la producción de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus*.

### Objetivos específicos.

- Seleccionar algunas cepas de *Aspergillus* capaces de crecer en los desechos de manzana.
- Evaluar los sistemas enzimáticos producidos a partir de desechos de manzana como fuente de carbono.
- Obtener ramnogalacturonano (RGM) a partir de manzana fresca.
- Seleccionar algunas cepas de *Aspergillus* capaces de crecer en el ramnogalacturonano obtenido.
- Evaluar el ramnogalacturonano modificado (RGM) de manzana como sustrato para actividad enzimática.

---

## ANTECEDENTES.

Los polisacáridos son cadenas lineales o ramificadas, formadas de monosacáridos unidos mediante enlaces O-glicosídicos, con pérdida de una molécula de agua por enlace.

Sus características son: peso molecular elevado, no tienen sabor dulce, pueden ser insolubles o formar dispersiones coloidales, no poseen poder reductor (Ruijsenaars and Hartmans, 2001).

Los polisacáridos de la pared celular de plantas, son los componentes orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza. Se pueden dividir en 3 grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina.

La celulosa es el principal constituyente de la pared celular, se trata de un polímero lineal de residuos de glucosa, unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. Se presenta como estructuras ordenadas (fibras), cuya principal función es asegurar la rigidez de la pared celular de plantas.

La hemicelulosa es el polisacárido más heterogéneo y es la segunda estructura más abundante en la pared celular de plantas. El principal tipo de hemicelulosa encontrada en cereales y maderas duras es el xilano, este se trata de un heteropolisacárido constituido por unidades de D-xilosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, y puede tener sustituciones con residuos de L-arabinosa, D-galactosa, acetilo, ácido ferúlico, p-cumárico y glucurónico. (de Vries, et al, 1999). Debido a que la estructura de los xilanos es variada y compleja, además de que su interacción con otros polímeros resulta aún más complicada, es necesaria una actividad enzimática demasiado completa, para lograr una hidrólisis más eficiente, algunos mecanismos de acción enzimática no están aún totalmente entendidos.

## Pectina

Las sustancias pecticas son un grupo de polisacáridos ácidos, de alto peso molecular que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Son industrialmente importantes por ser agentes gelificantes. El tamaño, carga, densidad, distribución de carga y grados de sustitución de las moléculas de pectina pueden ser cambiados biológicamente o químicamente.

Se utilizan ampliamente en la industria alimentaria para la fabricación de mermeladas y jaleas, en el área farmacéutica como agente antidiarreico y recubrimientos de fármacos de liberación prolongada (Rolin et al, 1998), en nutrición para la obtención de fibra dietética (Baig and Cerda, 1980).

La pectina químicamente, se trata de un heteropolisacárido compuesto por una cadena de residuos de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico, unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4 (homogalacturonano HG) y residuos de ramnosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,2 (ramnogalacturonano RGI y II) estos tres dominios se encuentran covalentemente unidos formando una especie de red.

**Homogalacturonano:** Estos segmentos son definidos como homopolímeros de residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4, usualmente son extraídos del material de plantas con tratamientos ácidos dependiendo del método de extracción se presentan algunas modificaciones. Las regiones de homogalacturonano pueden estar metilesterificadas o acetiladas (Fig. 2), dependiendo del tejido de planta del cual ha sido aislado. Esta región también ha sido definida como región lisa (Schols and Voragen, 1996). Es reconocido por su habilidad en la formación de geles y por esa razón es ampliamente utilizado en la industria de los alimentos.

Esta habilidad de las pectinas para formar geles, depende de la longitud de las cadenas de ácido galacturónico y de su grado de metilación. Las pectinas de alto metoxilo gelifican en presencia de agua y azúcar (65%) en un medio ácido (pH 2.9-3.2), los geles formados por este tipo de pectinas se caracterizan porque a altas temperaturas pueden ablandarse pero no derretirse. Las pectinas de bajo metoxilo forman geles en presencia de calcio, las propiedades de estos geles esta determinado por la concentración de calcio, pH, fuerza iónica y temperatura a la que induzca la gelificación (Ríos, B. 2003).

### Ramnogalacturonano I y II

El ramnogalacturonano I, esta compuesto por más de 100 repeticiones de disacárido, 2  $\alpha$ -L-ramnosa (1,4)  $\alpha$ -D-ácido galacturónico principalmente (Fig. 1). Cadenas de arabinosa y galactosa pueden estar ancladas en posición del C-4 en los residuos de ramnosa; la proporción de estos mismos residuos con cadenas laterales va de un 20 a 80% dependiendo de la fuente de polisacáridos que se trata, ocasionalmente estas cadenas pueden terminar en residuos de fucosa, ácido galacturónico y xilosa (Schols and Voragen, 1996).

El Ramnogalacturonano II es un polisacárido extremadamente complejo de bajo peso molecular, esta compuesto por nueve unidades de ácido galacturónico y contienen hasta once diferentes azúcares (Fig. 3), en más de veinte diferentes enlaces (O'Neill et al, 1990). Esta región de la pectina es altamente conservada tanto en composición como en su arreglo estructural muy parecido en todas las moléculas de la pared celular de arroz, cebolla, pino douglas, uva, manzana y remolacha puede ser obtenida después de tratamiento con endopoligalacturonasas, en donde esta se solubiliza.

El RG II posee una cadena principal de Homogalacturonano, compuesta por alrededor de nueve residuos de ácido galacturónico con enlaces  $\alpha$ -1,4 estos son los que se solubilizan por acción de la endopoligalacturonasa (Pellerin and Brillouet, 1995).

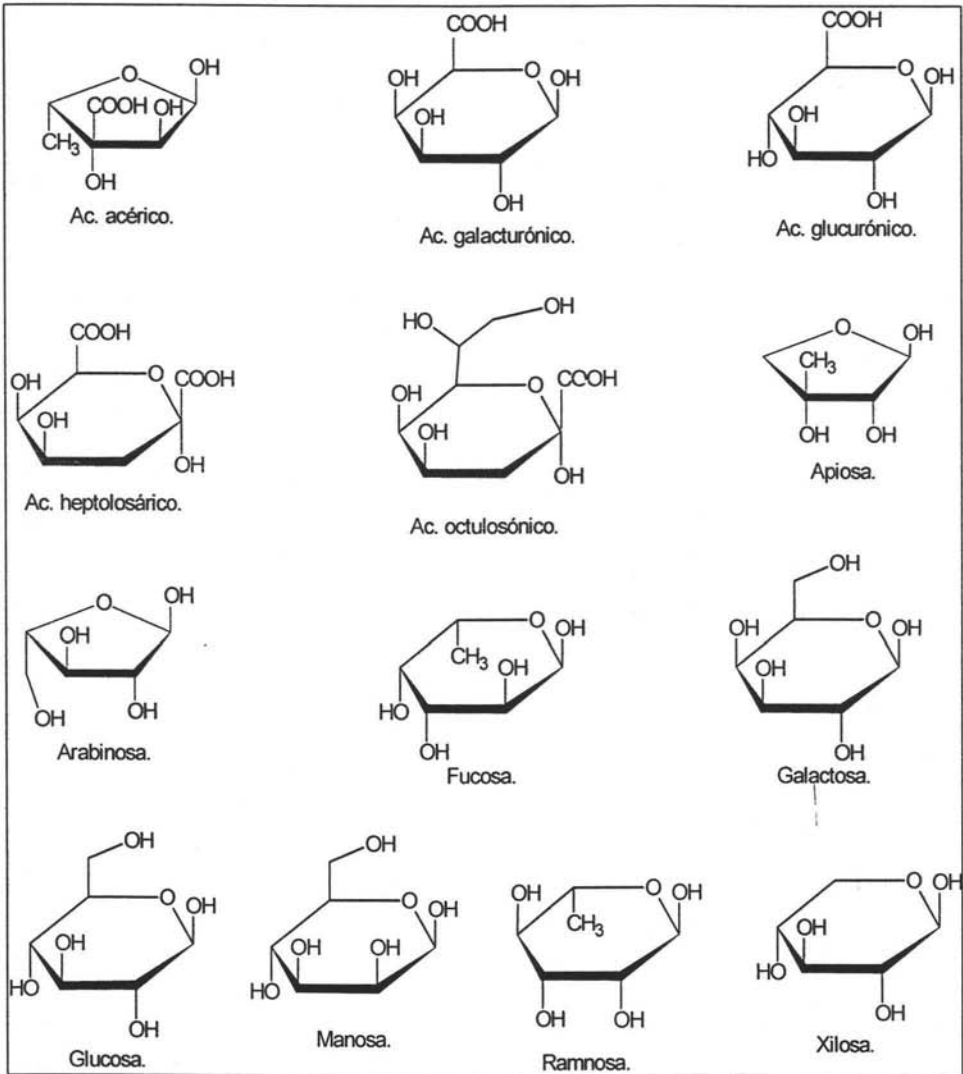


Fig. 3 Diferentes azúcares que conforman el complejo del ramnogalacturonano II. (Ten H-Suykerbuyk Marjon, 1997).

Las enzimas son responsables de muchas de las transformaciones metabólicas de los seres vivos, y se pueden definir como biocatalizadores. Se utilizan como aditivos altamente específicos para aplicaciones en el procesamiento de alimentos, teniendo aplicaciones útiles en prácticamente todas las áreas de la tecnología alimentaria (García et al, 1993). En la modificación de almidones, manufactura de quesos, amasado de harinas, modificación de vinos, fabricación de cerveza, conservación de alimentos, producción de jugos de frutas y otras bebidas, mejoramiento de texturas, entre muchas otras. Gran parte de estas aplicaciones son consecuencia de la disponibilidad de enzimas de origen microbiano.

La explotación industrial de enzimas microbianas comenzó, en 1894, con la patente de Takamine sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa a partir de *Aspergillus oryzae*, desde entonces, *Aspergillus* ha mantenido una posición dominante en la síntesis de moléculas de interés biotecnológico: ácidos grasos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, y diversas enzimas (García et al, 1993).

### Pectinasas

Las pectinasas son enzimas que degradan las sustancias pécticas, están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se pueden encontrar en plantas superiores donde pueden causar varias transformaciones fisiológicas, relacionadas con los cambios de textura que ocurren durante la maduración de frutas y verduras. Existen marcadas diferencias entre pectinasas microbianas con respecto a las enzimas de plantas, ya que la pectinesterasa fungal es generalmente más resistente a agentes químicos, su pH esta en un rango ácido, en comparación con el pH alcalino de las enzimas de plantas, otorgando una gran ventaja a las enzimas fúngicas en el ámbito industrial (Saijjaanantakul et al, 1991).

La turbidez típica de bebidas de frutas como: néctares y el puré de tomate, es deseable por lo que es necesario evitar que las enzimas endógenas degraden la pectina de estos frutos. Por otro lado, en jugos como el de manzana la turbidez es causada por la pectina y el pectato de  $\text{Ca}^+$ , es indeseable y se evita con el uso de enzimas pectinolíticas exógenas comúnmente producidas por hongos.

Los tratamientos enzimáticos se llevan a cabo con preparaciones enzimáticas pectinolíticas crudas, que comúnmente están derivados de hongos no patógenos como *Aspergillus*, los cuales tienen gran capacidad para la secreción de diversas moléculas (Ten H-Suykerbuyk Marjon, 1997).

Las enzimas pécticas son clasificadas de acuerdo a su modo de acción y pueden ser clasificadas en: estererasas y despolimerasas.

Estas enzimas son producidas por un gran número de bacterias (Collmer and Keen, 1986), algunas levaduras (Biely and Kremnicky, 1998), insectos, plantas. Los hongos producen una gran variedad de actividades pectinolíticas, para degradarla o modificarla y pueden ser clasificadas con base en el tipo de enlaces que atacan, las despolimerasas rompen los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 del sustrato de preferencia (Rose 1980), pueden ser subdivididas de acuerdo al mecanismo de ruptura del enlace, en hidrolasas (ruptura hidrolítica) y liasas (ruptura por  $\beta$ -eliminación), (Fig. 4).

En tanto las pectinasas tienen diferente especificidad sobre el sustrato, pero básicamente pueden separarse en un grupo de enzimas específicas al homogalacturonano, y otro de específicas sobre el ramnogalacturonano.



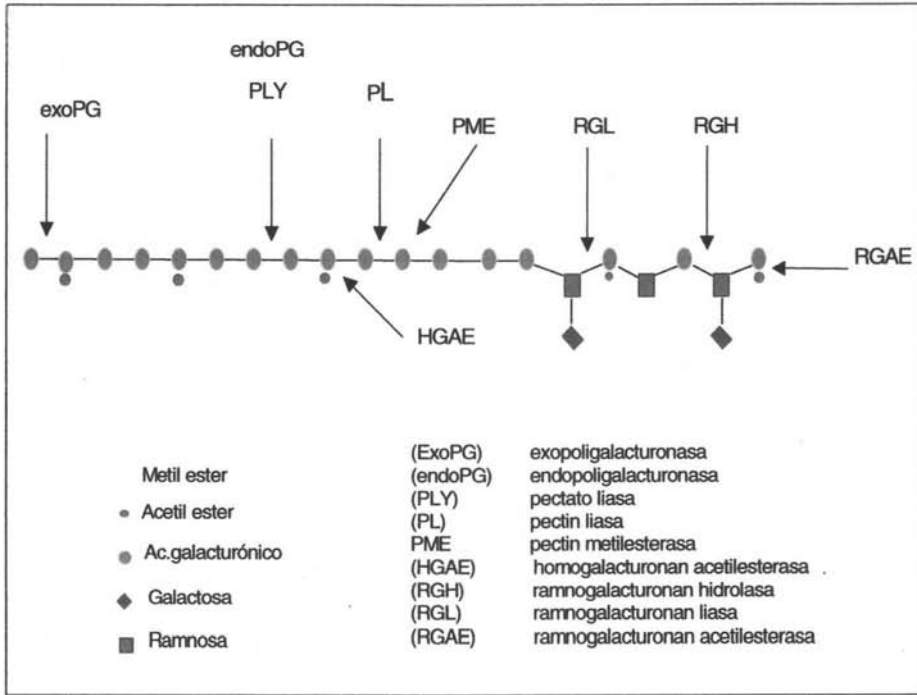


Fig. 4 Representación esquemática de la estructura química de la pectina y el nombre de algunas enzimas que participan en el complejo sistema de hidrólisis. (Voragen and Pilnik, 1989).

### Poligalacturonasas.

Estas hidrolizan preferentemente las pectinas de bajo metoxilo o ácido poligalacturónico, solamente pueden romper enlaces glicosídicos adyacentes a los grupos carboxilo libres. Se dividen en endopoligalacturonasas (atacan los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 al azar de la cadena del polisacárido generando oligómeros de ácido galacturónico) y exopoligalacturonasas (hidroliza ácido D-galacturónico del extremo no reductor). (Voragen and Pilnik, 1989).

### Pectatoliasas.

Estas rompen los enlaces glicosídicos adyacentes a los grupos carboxilos libres o no esterificados, mediante mecanismos de trans eliminación, en este grupo también encontramos enzimas de tipo endo y exo dependiendo del lugar en donde se rompe la unión.

Las pectatoliasas son dependientes de  $\text{Ca}^+$  para su actividad, son propiamente producidas por bacterias y hongos filamentosos.

### Pectinliasas.

Estas degradan el homogalacturonano, se encargan de romper los enlaces glicosídicos entre residuos de ácido galacturónico metilados o esterificados, mediante mecanismos de trans eliminación, introduciendo un doble enlace entre el C4 y el C-5 del extremo no reductor formado en la reacción, estas son solamente producidas por hongos. Hasta este momento se cree que algunos gusanos patógenos de plantas las pueden producir.

### Homogalacturonanacetilesterasa.

Se encarga de liberar grupos acetilos del carbono C-2 y C-3 del ác. D- galacturónico unido a otro metilado (Voragen and Pilnik, 1989).

### Ramnogalacturonasas.

Son enzimas degradadoras de pectina, que actúan sobre el ramnogalacturonano. Las cuales han sido descritas recientemente como ramnogalacturonan hidrolasa, esta enzima hidrolítica actúa en la unión de ácido D-galacturónico y L-ramnosa en el esqueleto principal del ramnogalacturonano, actúa en cooperación con ramnogalacturonan-acetilesterasa, solo en las regiones altamente ramificadas de la pectina, liberando oligosacáridos, compuestos de residuos de L-ramnosa con D-galactosa, grupos galactosil y algunas unidades de ramnosil, en el extremo no reductor de una unidad de ramnosa.

Recientemente se han descrito otras enzimas que degradan esta fracción de pectina, llamadas ramnogalacturonan liasas., que rompe la unión de ramnosa con ácido galacturónico acetilado, del esqueleto principal del ramnogalacturonano (RG). (Voaragen, et al, 2001).

### **Pectinmetilesterasas.**

Estas liberan los grupos metoxilo, del grupo 6 carboxil del ácido galacturónico y convierten pectinas altamente esterificadas en pectinas de bajo metoxilo, muchas plantas superiores las producen (Voragen and Pilnik, 1989) y microorganismos, existiendo una diferencia entre ellas. Las que provienen de hongos, generalmente son más resistentes a agentes químicos. Aunque la desesterificación ocurre al azar, se sabe que la enzima requiere de un grupo carboxilo libre adyacente al grupo metoxilado para actuar (Whitaker, 1990).

### **Pectin-acetilesterasa y ramnogalacturonan-acetilesterasa:**

Estas liberan los grupos acetilos del C<sub>2</sub> o C<sub>3</sub> del homogalacturonano y de la región peluda de la pectina respectivamente (RG I y RG II). Esta última enzima ha sido encontrada recientemente. (Voragen and Pilnik, 1989).

Las pectinasas han sido aplicadas por más de 60 años en la industria de alimentos y bebidas. Se han encontrado en diversos organismos, diferentes actividades pectinolíticas, donde las más importantes, desde el punto de vista de su aplicación en la industrialización de frutas y vegetales, son las enzimas despolimerizantes de tipo endo, ya que reducen rápidamente la viscosidad de la pectina presente en estos materiales, reduciendo viscosidad y por ende los tiempos de filtración de jugos aumentando así los rendimientos de extracción del fruto.

El principal microorganismo explotado para la producción de preparaciones comerciales de pectinasas, es *Aspergillus niger*, utilizadas en la manufacura de jugos claros espumosos, por ejemplo de manzana, pera y uva (para clarificación). Jugos grumosos: limón, ciruela, jugo de tomate y néctares donde el objetivo es preservar la integridad de la célula vegetal hidrolizando selectivamente el polisacárido de la lámina media.

Las preparaciones pectinolíticas comerciales, derivadas de *Aspergillus niger*, contienen un gran número de enzimas, los resultados observados no pueden solamente ser atribuidos a una sola clase de enzimas. Por tanto, existe la necesidad de identificar la contribución individual de las actividades enzimáticas para obtener preparaciones enzimáticas más específicas y para facilitar el desarrollo de nuevas aplicaciones en el caso de las ramnogalacturonasas (Kashyap et al, 2001).

### *Aspergillus*

Pertenece a la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina (hongos imperfectos), cuya reproducción es solamente asexual por medio de conidias. Dentro de Deuteromycotina, esta especie pertenece a la clase Hyphomycetos, la cual produce conidióforos en algunas partes del micelio (Perenicová, 2000). *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.

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  $\mu\text{m}$  de largo. Las conidias son producidas sucesivamente desde las puntas de las fialides, formando así cadenas no ramificadas. Las conidias son más o menos globosas (Perenicová, 2000).

El origen del nombre *Aspergillus* data del siglo XVIII, cuando Micheli en 1729 describió un moho con conidióforos y cabezas soportando cadenas de esporas, él es el responsable del nombre de *Aspergillus* por su parecido al asperjo. Sin embargo, pasaron alrededor de 200 años antes de que apareciera una primera clasificación taxonómica de *Aspergillus*, el mejor criterio para la clasificación de un *Aspergillus* aislado fue: el color de la cabeza conidial, color y superficie del tallo, forma de las vesículas y ausencia o presencia de métula. Esto permitió separar 13 grupos. Sin embargo los hongos filamentosos imperfectos como el *Aspergillus* negro presentan un alto grado de variabilidad en sus características morfológicas y fisiológicas, frecuentemente causadas por las condiciones externas de crecimiento.

En el pasado, esto llevó a frecuentes cambios en los nombres de las especies y a la reclasificación de cepas individuales. Esta tendencia fue claramente demostrada en el trabajo de Mosseray, quien distinguió 35 especies entre cepas pertenecientes al grupo de *Aspergillus niger*.

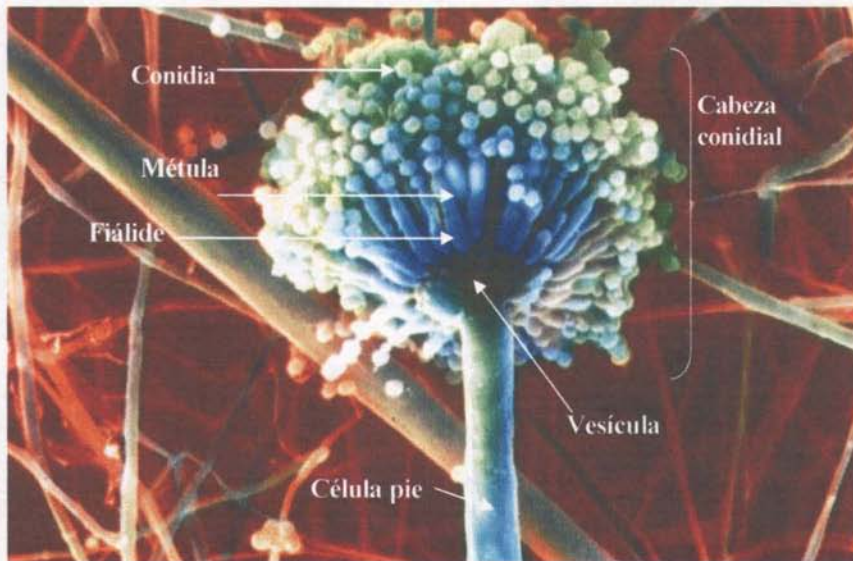


Fig. 5. Micrografía de un conidióforo de *Aspergillus*. ([www.pall.com/corporate\\_presroom\\_28030.asp](http://www.pall.com/corporate_presroom_28030.asp)).

Actualmente las estructuras morfológicas, siguen siendo una importante característica, para la clasificación de este microorganismo (Harvey and McNeil, 1994). Algunas especies de *Aspergillus* tienen un estilo de vida saprófito, son capaces de utilizar un rango muy amplio de materiales como fuente de carbono y por este motivo posee la capacidad de producir un sinnúmero de enzimas. Estas enzimas por lo general son secretadas al medio. Sus características de crecimiento permiten que *Aspergillus* sea manejable, (Rodríguez, 1998) su fácil preservación y su reconocimiento como organismo GRAS (generally regarded safe) por la FDA, lo hace ser el microorganismo preferido por bioquímicos y genetistas (Oxenboll, 1994) este microorganismo ofrece grandes posibilidades para su explotación biotecnológica con nuevas aplicaciones tecnológicas y la posibilidad de hallar y producir nuevas enzimas.

Al género *Aspergillus* lo conforman una gran variedad de habitantes, algunos de estos saprofitos viven en la tierra, otros en alimentos almacenados y en vegetación en estado de descomposición. *Aspergillus* y *Penicillium*, son los géneros dominantes de contaminación en productos almacenados, siendo capaces de crecer en situaciones extremas, como baja actividad acuosa y altas temperaturas. (Harvey and McNeil, 1994).

Antes de 1970, se conocía poco de la estructura genética eucariótica y de la organización en el ámbito molecular (Klug and Cummings, 1999).

Ahora se sabe que varios microorganismos apagan un gran número de genes en presencia de glucosa, como respuesta al ahorro de energía. Aunque la represión puede ser ejercida por varias fuentes de carbono, la glucosa es probablemente la más represiva junto con la sacarosa, xilosa y acetato. La galactosa y el glicerol se consideran medianamente represores, en tanto que la arabinosa, lactosa y el etanol son poco o casi nulos represores. Además del tipo de fuente de carbono, también la concentración de ésta es determinante en la producción de enzimas (Ruijter and Visser, 1997). Se ha observado que el D-ácido galacturónico puede comportarse como un inductor a concentraciones bajas y como un represor a concentraciones altas en diferentes especies de *Aspergillus* (Aguilar and Huitrón, 1987). Los mecanismos moleculares que controlan la síntesis de pectinasas microbianas, no están completamente conocidos. Se sabe que el pH es un factor importante en la expresión de genes que codifican para pectinasas y que la proteína responsable de la regulación es PacC, se han reportado enzimas endoplasmogalacturonasas como reprimidas por esta proteína (Kojima et al, 1999).

La represión de pectinasas por *Aspergillus* esta regulado por CreA (proteína represora del metabolismo del carbono A) cuando existen sustratos simples como la glucosa, dicha proteína reprime la expresión de ciertos genes al unirse en regiones promotoras del gen (Ruijter and Visser, 1997).

Entre los mas estudiados esta el de *Erwinia carotovora*, su represión por catabolito, es el reflejo de la mayor facilidad con la que la glucosa puede metabolizarse, si se compara con la lactosa. En ausencia de glucosa, y en condiciones de inducción, CAP (proteína activadora por catabolito) ejerce un control positivo. La función de la glucosa en la represión es, que esta inhibe la acción de la adenil ciclase, lo que provoca la disminución del nivel de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico), en la célula. En estas condiciones, CAP no puede formar el complejo CAP-AMPc, que es esencial para el control positivo de la transcripción.



En forma similar a lo descrito en otros sistemas genéticos, se ha demostrado la intervención de proteínas como CreA e incluso AMPc en los fenómenos de represión de las pectinasas (Cooper and Word, 1973).

La síntesis de las pectinasas es influenciada además por factores ambientales tales, como la concentración del medio de cultivo, temperatura, disponibilidad de nitrógeno y oxígeno,  $Fe^+$  y la presencia de agentes que dañan el DNA (Hugovvieux et al, 1996). En algunos casos la inducción es promovida, por azúcares como  $\alpha$ -L-arabinosa (Klung and Cummings, 1999). Las enzimas pueden ser inducibles, parcialmente inducibles o constitutivas, muchas de estas hidrolizan moléculas poliméricas que son bastante grandes para poder entrar a la célula, por lo que se supone que existe un nivel basal de enzimas, que degradan el sustrato generando moléculas de bajo peso molecular, capaces de entrar a la célula y efectuar la inducción (Van der Veen, 1991).

Casi siempre el inductor es el sustrato del sistema enzimático, aunque en algunos casos puede ser el producto de la reacción. Existen sistemas de control como respuesta de operones a proteínas reguladoras que pueden designarse según ejerzan un control positivo o negativo de la inducción o represión, utilizando las interacciones apropiadas entre las proteínas reguladoras y la pequeña molécula inductora o represora (Rodríguez, 1998).

La producción de enzimas pectinolíticas por cepas de *Aspergillus* es determinada por diferentes factores de regulación metabólica, uno de estos es la fuente de carbono (de Vries et al, 2002). Se ha encontrado que algunos productos de degradación de la pectina como ramnosa, arabinosa, ácido galacturónico, son los principales inductores de diferentes enzimas pectinolíticas de tipo endo y exopoligalacturonasas, ramnogalacturonan liasas e hidrolasas, pectinliasas (de Vries and Visser, 2001). La mayor parte de estudios en cuanto a inducción y represión de pectinasas en hongos, se enfocan sobre el homogalacturonano (HG), poco se sabe de la regulación de síntesis de enzimas que degradan al ramnogalacturonano (RG).



### Origen de la manzana

Desde el punto de vista botánico, el fruto es el ovario maduro de una flor, incluyendo una o varias semillas. Se desconoce el origen exacto del manzano, aunque se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzanos silvestres europeos y asiáticos. Según V.V. Ponomarenko es *Malus silvestris*, una especie de manzano silvestre que crece de forma natural en las regiones montañosas de Asia central, podría ser esta especie de la que se habrían originado, hace 15,000-20,000 años.

El nombre botánico del manzano ha variado entre *Malus pumila*, *Malus domestica* o *Malus silvestres*. (Jackson and Looney, 2002).

Las referencias históricas datan del siglo III antes de Cristo en Grecia. También se han encontrado restos de manzanos en excavaciones realizadas en zonas lacustres prehistóricas del norte de Italia, se han reportado cultivos en Egipto desde el siglo XII a. C., se menciona en la literatura griega desde los años 600 a.C. y en la Biblia. (Kay Ryugo, 1993). Algunas investigaciones indican que su consumo data de la edad de piedra en la zona centro de Europa, a partir de entonces la manzana se disperso a todo el mundo gracias a la enorme adaptabilidad que tienen sus variedades a los diversos ecosistemas. Con la colonización, se introdujeron variedades diversas de especies frutícolas, fue traída a nuestro continente a principios del siglo XVII. (Claridades Agropecuarias, 1995).

### Taxonomía y morfología

-Familia: Rosáceas.

-Especie: *Pyrus malus*.

-Porte: Alcanza como máximo 10 m. de altura y tiene una copa globosa.

Tiene una vida de unos 60-80 años.

-Sistema radicular: raíz superficial, menos ramificada que en peral.

-Hojas: ovales, blandas, con el haz verde claro.

-Flores: grandes, casi sentadas, que se abren unos días antes que las hojas.

-**Floración:** tiene lugar en primavera, generalmente por abril o mayo, las manzanas más precoces maduran en junio, aunque existen razas que mantienen el fruto durante la mayor parte del invierno e incluso se llegan a recoger en marzo o abril.

-**Fruto:** pomo globoso, con pedúnculo corto y numerosas semillas de color pardo brillante. (Tamaro, 1986).

El fruto del manzano pertenece al tipo pomo y cuenta en promedio con cinco alvéolos; el endocarpio es cartilaginoso y en cada alveolo están las semillas, el pedúnculo del fruto es de longitud variable, el cáliz es persistente y forma el ojo colocado en una posición más o menos regular y profunda, la forma del fruto depende de la variedad, aunque es generalmente esférica (Fig.6). La semilla es un óvulo que al alcanzar su maduración, se constituye por tegumentos o cubiertas que le envuelven al órgano llamado almendra, que forma la mayor parte de la semilla, el epicarpio corresponde a la cascara, y el mesocarpio es la porción carnosa y comestible (Ramírez, 1993).

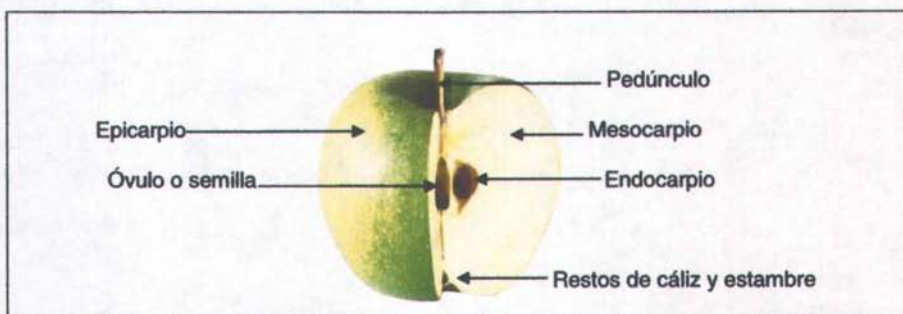


Fig. 6. Corte longitudinal de un fruto tipo pomo con señalamiento de sus partes principales. (Salazar, 2000).

La mayoría de las variedades que se conocen actualmente provienen de selecciones y de cruces artificiales, efectuados en el extranjero, por particulares o por institutos experimentales.

Las variedades industriales más importantes son: Golden Delicious, Red Delicious, Akane, Ozark Gold, Belle de boskop, Reyna de las reinetas, Gala, Jonagold, Reyneta de Canadá, Melrose, Martina, Delbard jubilé, Fuji, Marialena, Elstar, Naranja de Cox, Irared, Verde Docella, Granny Smith entre otras (Lalatta, 1999).

### Importancia económica y distribución geográfica

Los manzanos son el cultivo frutal más importante del mundo después de las naranjas, los plátanos y las uvas, es una de las especies de fruta dulce de mayor difusión a escala mundial, debido fundamentalmente a: su facilidad de adaptación a diferentes climas y suelos, posee un gran valor alimenticio y terapéutico. Por proceder de climas muy fríos resiste las más bajas temperaturas, lo que ha permitido cultivarlo a gran escala en todos los países de clima relativamente fríos, y en particular en todos los de Europa.

La producción mundial estimada en 1998 fue de 56 millones de toneladas, siendo China, Estados Unidos, Francia, Italia y Turquía los principales productores. Ahora China produce alrededor de un tercio de la producción mundial de manzanas, después de las plantaciones a gran escala llevadas a cabo en los años 80 y 90 (Jackson and Loooney, 2002).

El manzano es un árbol que prospera en los climas templados y fríos de nuestro país. Los cultiveros típicos no toleran el aire seco ni las altas temperaturas, por lo que las zonas de gran producción están determinadas por estas condiciones climáticas y edáficas. Los principales estados productores de manzana en México son: Chihuahua, Durango, Puebla, Coahuila, Nuevo León, Hidalgo, (Ramírez, 2003), (Tabla. 1) y su producción anual se muestra en la tabla 2.

AVANCE DE SIEMBRAS Y COSECHAS  
PERENNES 2006

Manzana

SITUACION AL 30 DE ABRIL DE 2005

DELEGACION	TOTAL (Riego + Temporal)						
	SUPERFICIE (HA)		COSECHADA	PRODUCCION (TON)		RENDIMIENTO (TON/HA)	
	SEMBRADA	SINIESTRADA		ESTIMADA	OBTENIDA	ESTIMADO	OBTENIDO
AGUASCALIENTES	19	0	0	76	0	4.000	
BAJA CALIFORNIA	39	0	0	275	0	7.051	
BAJA CALIFORNIA SUR							
CAMPECHE							
CHIAPAS	1,262	0	0	2,850	0	2.339	
CHIHUAHUA	25,875	0	0	440,660	0	17.026	
COAHUILA	7,070	0	0	64,423	0	9.112	
COLIMA							
DISTRITO FEDERAL	33	0	0	251	0	7.708	
DURANGO	10,172	0	0	46,101	0	4.532	
GUANAJUATO	21	0	0	63	0	2.976	
GUERRERO	28	0	0	112	0	4.000	
HIDALGO	1,553	0	0	5,763	0	3.712	
JALISCO	56	0	0	111	0	1.985	
MEXICO	203	0	0	1,600	0	7.890	
MICHACÁN	167	0	0	1,408	0	8.434	
MORELOS	7	0	0	63	0	9.000	
NAYARIT							
NUEVO LEON	1,975	0	0	12,663	0	6.403	
OAXACA	1,204	0	0	7,572	0	4.367	
PUEBLA	7,486	0	0	37,285	0	4.981	
QUERETARO	732	0	0	2,106	0	2.853	
QUINTANA ROO							
REGION LAGUNERA	0	0	0	0	0		
SAN LUIS POTOSI	23	0	0	236	0	10.272	
SINALCA							
SONORA	216	0	0	719	0	3.334	
TABASCO							
TAMAULIPAS							
TLAXCALA	58	0	0	415	0	7.155	
VERACRUZ	61	0	0	336	0	5.508	
YUCATÁN							
ZACATECAS	1,401	13	367	4,527	770	3.478	2.098
<b>TOTAL</b>	<b>60,270</b>	<b>13</b>	<b>367</b>	<b>630,240</b>	<b>770</b>	<b>10.459</b>	<b>2.098</b>
COMARCA LAG. DGO.							
COMARCA LAG. COAH.							

Tabla 1. Producción nacional estimada.

FUENTE: SERVICIO DE INFORMACIÓN Y ESTADÍSTICA AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP), CON INFORMACIÓN DE LAS DELEGACIONES DE LA SAGARPA EN LOS ESTADOS.

Anuario Estadístico de la Producción Agrícola

1996-2005 / Resumen Nacional / MANZANA / CICLICOS Y PERENNES / RIEGO + TEMPORAL

Año	Superficie Sembrada (Ha)	Superficie Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor Producción (Pesos)
2003	62,874.88	54,553.43	495,161.77	9.077	3,336.41	1,652,060,916.78
2002	61,465.87	60,831.37	479,192.96	7.877	3,084.00	1,477,832,956.53
2001	59,156.11	58,229.11	415,179.52	7.130	2,830.71	1,175,251,265.60
2000	64,377.61	54,652.21	337,438.44	6.174	3,513.13	1,185,465,259.83
1999	66,116.51	64,473.76	449,866.55	6.978	3,542.86	1,593,815,007.24
1998	66,898.33	58,739.58	370,244.49	6.303	3,365.09	1,245,905,214.31
1997	67,496.00	62,507.00	629,277.00	10.067	1,589.84	1,000,447,297.11
1996	71,398.00	60,170.00	426,713.05	7.092	2,580.47	1,101,119,653.66

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

Tabla 2. Estadística anual de la producción nacional de manzana (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>).

## Distribución de la producción de Manzana.

Tipo de Destino	Manzana (en %)
Exportación fresco	9
Consumo domestico	60
Industria	19
Usos no Industriales (*)	12

Tabla 3. Distribución de la producción de manzana. (\*) Desperdicios, Alimentos Para Animales, Etc.) (Consejo Federal de Inversiones fruticultura webmaster@cfired.org.ar)1999-2000).

La mayoría de la producción es destinada a consumo en fresco o domestico, el segundo lugar es destinado a la industrialización. Se estima que aproximadamente el 12% de la producción es desperdicio, lo cual resulta ser mayor de lo que se exporta (tabla 3), dichos residuos podrían ser de interés práctico en el área de la biotecnología, utilizándolos como sustratos para producción de enzimas de interés, y de esta manera no es necesario utilizar sustratos purificados que implican un mayor costo.

La manzana, y la remolacha son productos ricos en pectina y en esta pectina el RG I y RG II son muy abundantes. Así mismo los desechos de estos productos son especialmente ricos en RGI. Las enzimas que degradan el ramnogalacturonano son conocidas como ramnogalacturonasas y forman parte del complejo enzimático de las pectinasas, la búsqueda de microorganismos que puedan crecer y producir enzimas a partir de desechos de manzana, puede permitir la obtención de estas. Por tanto, existe la necesidad de identificar la contribución individual de cada una de estas enzimas, para obtener preparaciones enzimáticas más específicas y facilitar el desarrollo de nuevas aplicaciones en el caso de las ramnogalacturonasas.



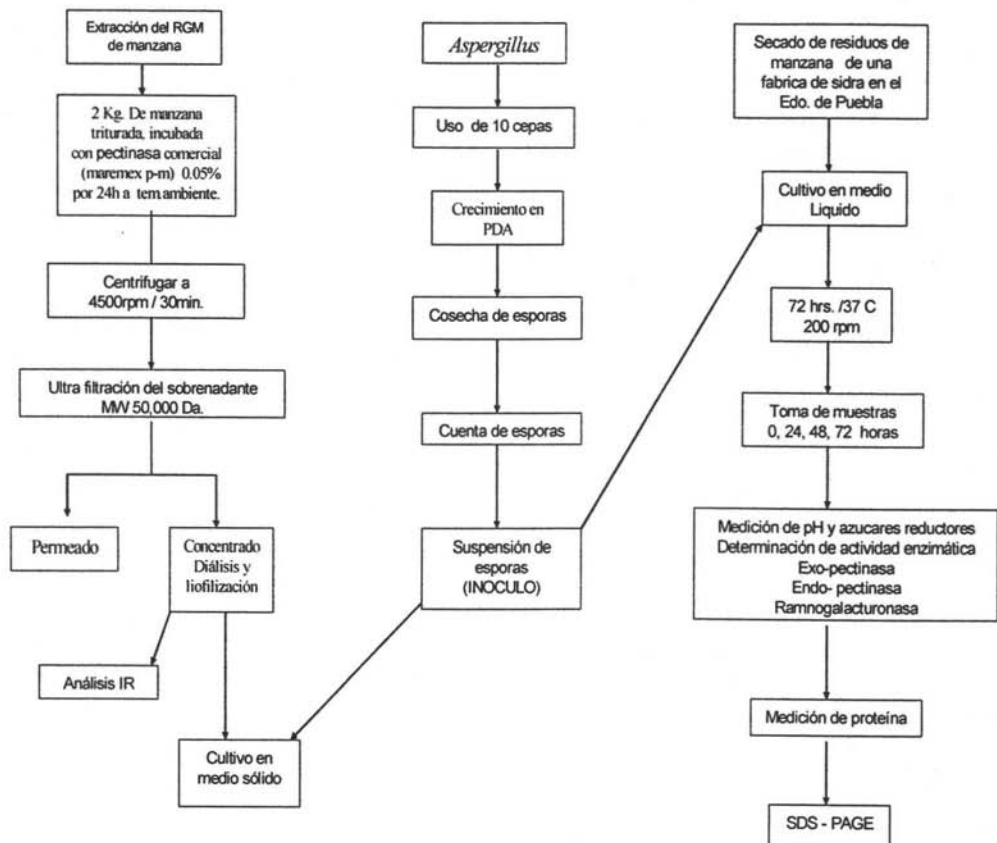
La composición enzimática de las preparaciones comerciales, son determinantes en el tiempo de filtración y rendimiento de jugos y vinos, también incrementan sabor y brillantez. Análisis comparativos de las preparaciones de hongos que comúnmente son usadas en estas industrias, revelan la presencia de una variedad de actividades enzimáticas pectinolíticas de tipo liasas e hidrolasas, (Colagrande, et al, 1994).

La mayoría de las preparaciones comerciales, muestran actividades celulolíticas y hemicelulolíticas, sugiriendo que sustratos complejos han sido usados como fuente de carbono para el crecimiento del hongo.

La licuefacción de las manzanas con preparaciones de enzimas pectinolíticas comerciales, durante mucho tiempo ha dejado un remanente de polímero pectico en la ultrafiltración final del jugo. Análisis de este polímero realizado con enzimas como galactanasas,  $\beta$ -galactosidasa, arabinasa y arabinofuranosidasa revelaron que está compuesto principalmente por ramnogalacturonano el cual fue resistente a la acción de estas enzimas, el análisis fue hecho en RGM de manzana y de remolacha. En 1990 Schols y colaboradores encontraron que *Aspergillus aculeatus*, producía una enzima capaz de degradar este RGM. La pectina de manzana presenta un alto grado de metilesterificación lineal en la región del homogalacturonano que alternando con la región peluda comprende una alta división con el ramnogalacturonano (De Vries, et al, 1982). El peso molecular de las sustancias pécticas es variable, en el caso de la manzana es de 250,000Da a 360,000Da. (Newbold and Joslyn, 1952). Las manzanas procesadas brindan productos tales como jugos, concentrados, vinagre, jaleas, conservas en almíbar, mermeladas, producción de ácido málico empleado en la industria farmacéutica y en la alimentaria como sustituto de ácido cítrico, bebidas refrescantes, vino y sidra (Suárez, 1989).

El residuo del procesamiento industrial de manzana en operaciones tales como en el pelado, despepitado, deshuesado puede ser utilizado para producción de enzimas pécticas, extracción de pectina y varios productos comestibles, como algún tipo de fibra dietética (Lal Causal and P. C Sharma, 1995).

## DIAGRAMA DE TRABAJO





### Microorganismo.

El grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos cuenta con un cepario del cual se utilizaron 10 cepas silvestres de hongos del género de *Aspergillus sp.* aisladas de frutos y materia en estado de descomposición de diferentes lugares. Dichos microorganismos fueron seleccionados por su capacidad para crecer en medios con pectina como única fuente de carbono.

### Preparación de inóculo.

Cada microorganismo se propaga en cajas con medio agar-papa-dextrosa (PDA), a las 72 horas de crecimiento se cosecha la superficie del medio con ayuda de un asa, recuperando las esporas con solución salina-tween, ayudado por una pipeta pasteur transfiriéndose a un tubo etiquetado, todo en condiciones estériles. La cuantificación de esporas se realizó utilizando una cámara de Newbawer.

### Preparación y condiciones de cultivo en medio líquido.

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo, cuya composición fue: ( $K_2HPO_4$ , 0.2%,  $KH_2PO_4$  0.2% y  $NH_4(SO_4)$  al 0.4%). Como fuente de carbono se utilizaron los desechos de manzana al 1, 2, 3, 4 y 5%, esterilizándolos por separado a  $121^\circ C$  y 15 psi. durante 20 minutos.

Los medios de cultivo se inocularon, con una suspensión de esporas de tal modo que la concentración final fuera de  $1 \times 10^6$  esporas/ml. La fermentación se realizó a  $37^\circ C$  con agitación de 200 rpm se tomaron muestras de 5ml cada 24 h. a lo largo de la fermentación.

### Determinación de azúcares reductores.

Se determinaron directamente en filtrados libres de células, usando el método de DNS (Miller, 1959). Los productos de degradación de la pectina son expresados como ácido galacturónico. A 0.1ml de muestra se agregan 0.9ml de agua destilada, 2ml de reactivo DNS, y se someten a ebullición durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 5 ml de agua destilada y se registro la D.O. observada a 575nm.

### Determinación de actividad exopectinolítica.

La actividad exopectinolítica presente en el medio, se evaluó por medio de la cuantificación de azúcares reductores. Producidos a partir de una solución de pectina al 1%. La pectina fue disuelta en buffer acetatos 100mM a pH 5, utilizada como sustrato (0.5ml).se adiciono el filtrado enzimático (0.1ml) y 0.4 ml de buffer acetatos 100mM. Después se incubo a 45 °C durante 20 minutos, se adicionó el reactivo DNS (2ml) se sometió a ebullición durante 5 minutos, finalmente se adicionaron 5 ml de agua destilada. Se registro la D.O. observada a 575nm. Como blanco de cada uno se utilizo su filtrado libre células inactivado. La unidad de actividad exopectinolítica es la cantidad de enzima que produce un  $\mu\text{mol}$  de ácido D-galacturónico en las condiciones de ensayo.

### Determinación de actividad endopectinolítica.

La actividad se determinó por la reducción de viscosidad de una solución de pectina al 1%(p/v) preparada en buffer acetatos pH 4.2 con 0.03% (p/v) de NaCl. La temperatura de ensayo fue a 30°C. La reacción se inicio adicionando 0.5 ml de filtrado enzimático a 10ml de solución de pectina en un viscosímetro de Canon-Fenske No.200. Una unidad de actividad endopectinolítica fue definida como la cantidad de enzima que reduce en un 50% la viscosidad de la solución de pectina en las condiciones de ensayo. De acuerdo a lo descrito por (Aguilar y col 1987).

### Determinación de actividad Ramnogalacturonasa.

Se determino utilizando el ramnogalacturonano modificado extraído de manzanas (RGM) como sustrato a una concentración de 0.5 % en buffer acetatos 100mM pH 5. La cantidad de sustrato fue de 0.1mL, con 0.1ml de buffer acetatos 100mM pH 5 y 0.1 ml del filtrado enzimático, esta mezcla de reacción se incubo a 40°C por 3 h. Al termino del tiempo de incubación se agregaron 2ml de reactivo DNS, se sometió a ebullición por 5 minutos, se llevo a un volumen final de 8ml con agua destilada, se registro el D.O a 575nm. Como blanco de cada uno se utilizo su filtrado enzimático inactivado. La unidad de actividad ramnogalacturonasa es la cantidad de enzima que produce un  $\mu\text{mol}$  de ácido D-galacturónico en condiciones de ensayo.

### Determinación de proteína.

Se determino por el método de Lowry (Lowry et al, 1951) Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar.

### Electroforesis (SDS-PAGE) y actividad "in situ".

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Los geles contenían acrilamida al 10% y bis-acrilamida al 2.7% (Laboratorios Bio-Rad). Las muestras se colocaron en un baño a ebullición por 60 segundos, en amortiguador de muestra compuesto de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 4% (Laboratorios Bio-Rad), buffer Tris-HCl 125 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol al 0.005%. La electroforesis se corrió con 250  $\mu\text{g}$  de proteína en cada muestra, a una corriente de 40 mA por un tiempo de 1 a 1.5 h a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm Migtly Small SE-245 (Hoefer Sci Ins USA). Después de ese tiempo los geles se sumergieron en solución.

de tinción, que contiene azul de Coomasie R-250 (Laboratorios Bio-Rad ) al 0.125%, metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 1 h y después fueron desteñidos con una solución de ácido acético al 10%.

En cuanto a la actividad, se corrió un gel en las mismas condiciones descritas a excepción del proceso de tinción este se sumergió en una solución renaturalizante (tris 100mM pH 6.8) manteniéndolo en agitación de 20 rpm a una temperatura de 37°C durante 1 h. posteriormente se sumergió en una solución de pectina al 1% y pH 5 durante toda la noche a temperatura ambiente, finalmente el gel se tiñó con una solución de rojo rutenio al 0.05%, durante 30 minutos y se lavó con agua destilada para quitar el exceso de colorante.

Estos geles se corrieron conjuntamente con el fin de poder identificar exactamente que proteínas son las que corresponden a la actividad enzimática.

### Extracción de ramnogalacturonano modificado ( RGM ) de manzana.

Se trituraron 2 kg de manzana fresca (Golden Delicious) con 1L de agua destilada para tener una mejor agitación, se incubo con una pectinasa comercial (Macerex PM, rango optimo de pH 3.5 a 5 y temperatura de 2 a 60°C) al 0.05 % durante 24 h a temperatura ambiente. El material obtenido se centrifugo a 4500 rpm durante 30 minutos, posteriormente se decanto y filtró. Finalmente se ultrafilto al vacio con una membrana de 50000 Da. La fracción retenida se cuantifico en volumen y se concentro mediante diálisis y liofilización. (Ten H-Suykerbuyk, 1997).

### Preparación y condiciones de cultivo en medio sólido.

Se preparo agar bacteriológico 15g/L disuelto en medio basal ajustado a pH 5. Por otro lado se preparo la fuente de carbono que en este caso fue el RGM (ramnogalacturonano modificado) de manzana al 1% (p/v) disuelto en buffer acetatos pH 5 y agar bacteriológico 15g./L. Se esterilizaron por separado a 121°C y 15 psi durante 20 minutos. Se vertió el agar bacteriológico en una caja petri estéril y se esperó a que solidificara. Este sirvió como fuente de nitrógeno. Posteriormente se agregó sobre este, la fuente de carbono (RGM de manzana) y se dejó en una superficie plana hasta que solidificará. Una vez que solidificó se inocularon las 10 cepas de *Aspergillus* con orden establecido en donde la cantidad de inculo fue de  $1 \times 10^4$  esporas, estas se incubaron a 37°C durante 48h.

### Crecimiento celular y detección de actividad enzimática en medio sólido.

Para poder determinar el crecimiento y actividad enzimática se midió el diámetro de las colonias así como el diámetro del halo de hidrólisis de cada una. Posteriormente se hizo una relación de halo/colonia. El halo de hidrólisis se observó por medio de una tinción.

Se utilizó una solución de rojo rutenio al 0.05% como colorante y se dejó actuar sobre la placa durante 30 minutos, posteriormente se lavo con agua destilada, con esto se observaron halos de hidrólisis o degradación alrededor de las colonias lo cual indicaría el consumo del polisacárido que en este caso es el RGM de manzana

### Análisis infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

El análisis del ramnogalacturonano modificado de manzana se llevó a cabo en un equipo FTIR. Tomando como estándares ramnogalacturonano de limón y de frijol de soya. Los espectros fueron corregidos en su línea base y normalizados tangencialmente con el programa Opus (versión 4.0, Bucker, Alemania). Este estudio se realizó en la Universidad Autónoma de Coahuila, bajo la supervisión del Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel.

Todos los experimentos se hicieron cuando menos por triplicado.

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de cepa.

La primer parte de la etapa experimental consistió en identificar cepas de *Aspergillus* que mostraran actividad pectinolítica. Para lo anterior se trabajó con 10 cepas blancas de *Aspergillus* previamente obtenidas a partir de frutas en descomposición (Orozco, 2003). Con la finalidad de seleccionar una cepa pectinolítica y probar el efecto de pH y la concentración de la fuente de carbono. Se llevaron a cabo fermentaciones líquidas utilizando un medio basal, como fuente de carbono residuos de manzana al 3% (p/v), con pH inicial de 5.5.

En este experimento se determinaron perfiles de pH, azúcares reductores y actividad exopectinolítica. El patrón cinético de pH de todas las cepas en estudio presentaron la misma tendencia, disminuyendo en general a un pH de 2.7 en las primeras 24 h, permaneciendo constante hasta el final de la fermentación. (Fig. 7 A y B). Lo anterior indica que el microorganismo tiene actividad metabólica. Los azúcares reductores generados por la hidrólisis de la fuente de carbono presentaron un perfil diferente en cada cepa, indicando así la capacidad que posee cada una para hidrolizar la fuente de carbono (Fig. 7 C y D). Con respecto a la actividad exopectinolítica sus valores van desde 10.1 U/ml para la cepa FP450 hasta 16.65 U/ml en la cepa FP500 a las 72h de fermentación (Fig. 7 E y F). De este experimento fue posible seleccionar las 5 mejores cepas, utilizando como criterio general la actividad exopectinolítica. Las cepas que mostraron las mejores actividades exopectinolíticas a las 72 h. de fermentación fueron las cepas FP60, FP340, FP440, FP470 y FP500.

Cepa	Actividades U/ml (72h).
FP60	15.24
FP340	16.49
FP440	14.95
FP470	14.68
FP500	16.65



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

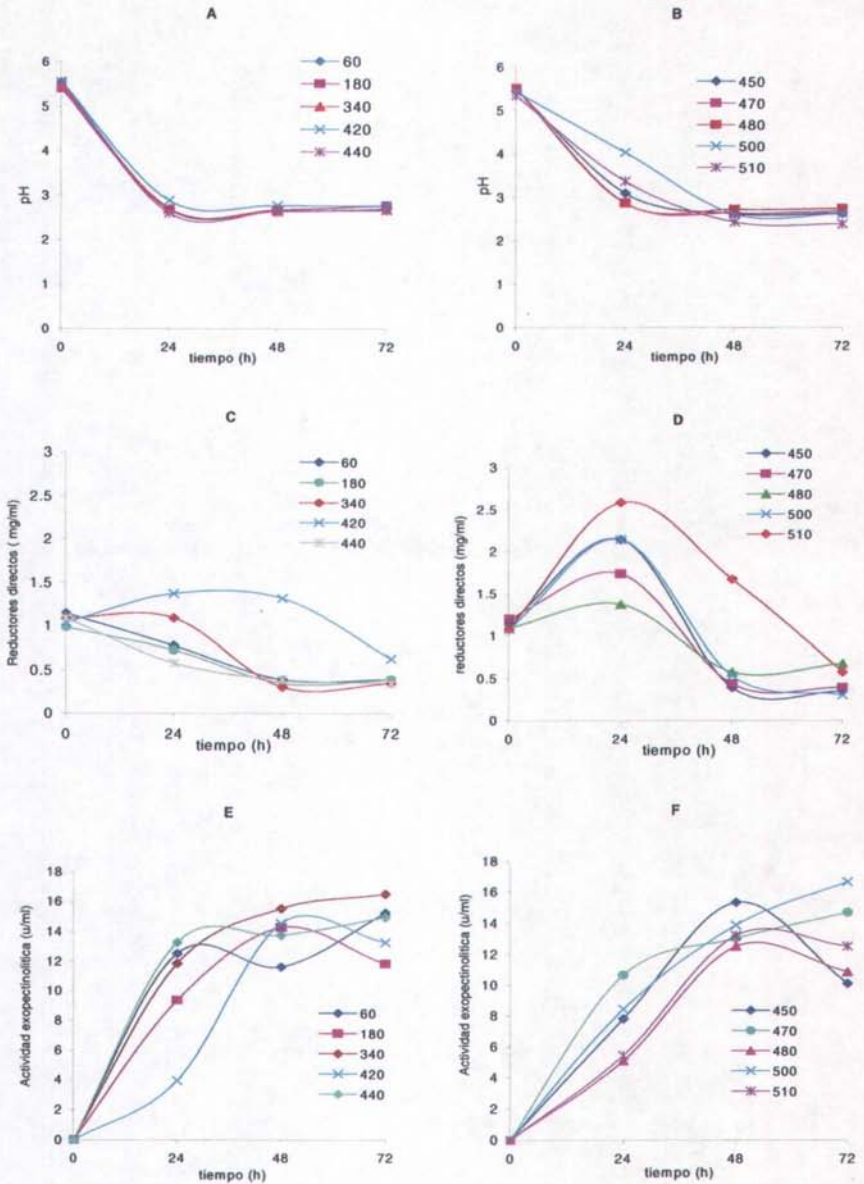


Fig. 7. Cinética de 10 cepas de *Aspergillus*. Utilizando como fuente de carbono residuos de manzana al 3% (p/v) en un pH inicial de 5.5. Graficas A y B. perfil de pH, C y D. azúcares reductores (mg/ml), E y F actividad exopectinolítica (U/ml).

Con las 5 cepas elegidas se llevaron a cabo fermentaciones, utilizando residuos de manzana al 3% (p/v) y un pH inicial de 3. La cinética de pH observada en este experimento es similar para todas las cepas, comienzan a pH 3 y tiende a disminuir en las primeras 24 h a un pH de 2.6 y posteriormente se mantiene constante a pH de 2.3 en las 48 y 72h de fermentación (Fig. 8 A).

Respecto al perfil de azúcares reductores, el comportamiento es semejante en todas las cepas, partiendo de una concentración inicial de 1.7 mg/ml, aumentando hasta 2.5 mg/ml en las 24h y disminuyendo hasta 0.7 mg/ml en las últimas horas. (Fig. 8 B). Este comportamiento de incremento a las 24 h se puede relacionar con la capacidad que posee el microorganismo para degradar este polisacárido en monosacáridos, los cuales son utilizados para llevar a cabo sus funciones metabólicas. Lo anterior se encuentra estrechamente relacionado con la velocidad de crecimiento de *Aspergillus* ya que durante las primeras horas genera productos de hidrólisis de la fuente de carbono, los cuales se producen en mayor medida de lo que puede consumir y cuando exponencialmente crece los consume al máximo.

Respecto a las actividades de tipo exopectinolíticas, se observó una clara producción para todas las cepas, en un rango de entre 14.08 u/ml para la cepa FP440 como mínimo y un máximo de 18.13 u/ml para la cepa FP500 a las 72h de fermentación (Fig. 8 C). La cepa 440 resulta ser la máxima productora de enzimas a las 24h, sin embargo en el transcurso de la fermentación permanece con valores constantes, siendo finalmente la menos productora.

La máxima actividad endopectinolítica la presenta la cepa FP500 a las 72h de fermentación con 1.4 U/ml. (Fig. 8 D). Por su parte la cepa 60 presenta una actividad enzimática tres veces mayor comparada con la cepa FP500 a las 24h en tanto que a las 48 h sigue en la primera posición, con respecto a las demás. Lo anterior podría ser importante para su aplicación industrial, ya que a las 24h se produce casi la mitad de lo que se produce a las 72h de fermentación, esto reduce claramente el tiempo y la productividad aumenta.



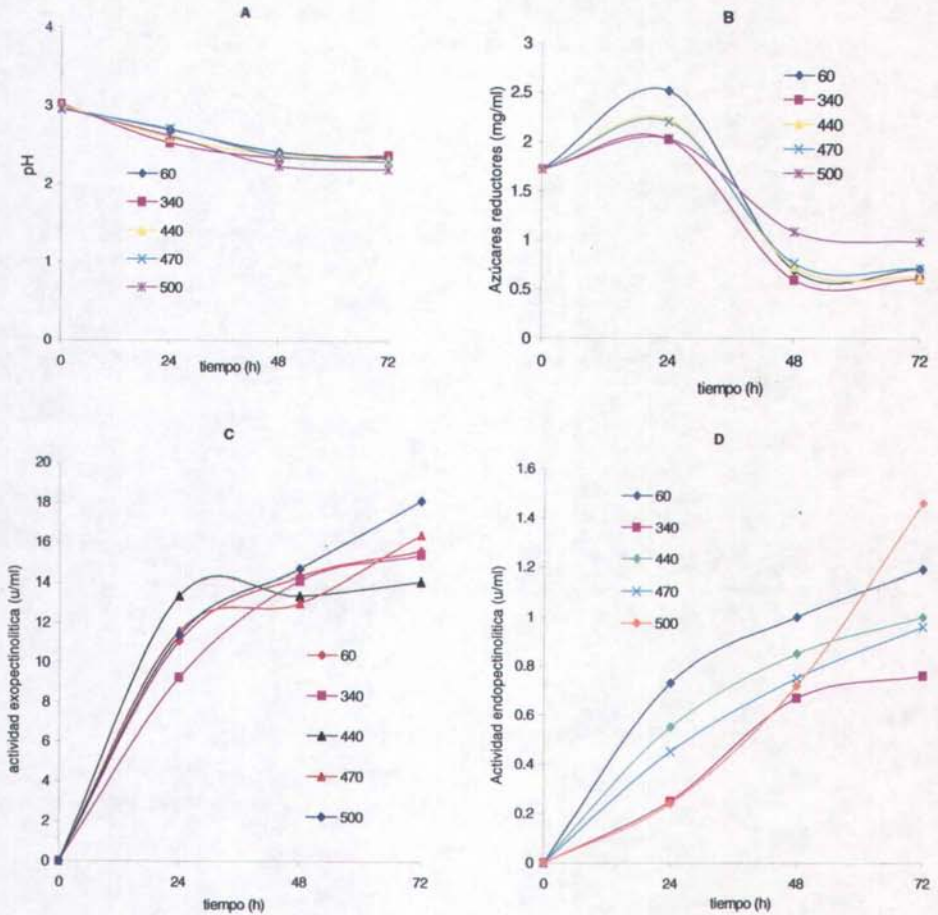


Fig. 8. Cinética de 5 cepas de *Aspergillus* utilizando como fuente de carbono residuos de manzana al 3% (p/v) en un pH inicial de 3. Gráfica (A) perfil de pH. (B) azúcares reductores (mg/ml). (C) actividad exopectinolítica (U/ml). y (D) actividad endopectinolítica (U/ml).

Posteriormente se llevaron a cabo fermentaciones con las 5 cepas de *Aspergillus*, en 3% (p/v) de residuos de manzana, en un pH inicial de 5.

En la cinética de pH y de azúcares reductores se observó un comportamiento similar al ya descrito en la Fig. 7 A y 8 B, respectivamente. Las actividades exopectinolíticas se consideran buenas para todas las cepas, teniendo como máxima productora de enzimas pécticas a la cepa FP440 con 20 U/ml a las 72h de fermentación y la mínima con casi el 50% menos a la cepa FP340 (Figura 9 A) las tres restantes presentaron actividades promedio de 15 U/ml.

La producción de endopectinasas en este pH inicial es mayor, para todas las cepas comparadas con las actividades producidas a pH 3. La cepa FP500 fue la máxima productora de enzimas endopectinolíticas ya que a las 72h se produjeron 3.6 U/ml y la mínima fue la cepa FP60 con 1.46 U/ml. Las 3 cepas restantes tuvieron 2.31 U/ml en promedio (Figura 9 B).

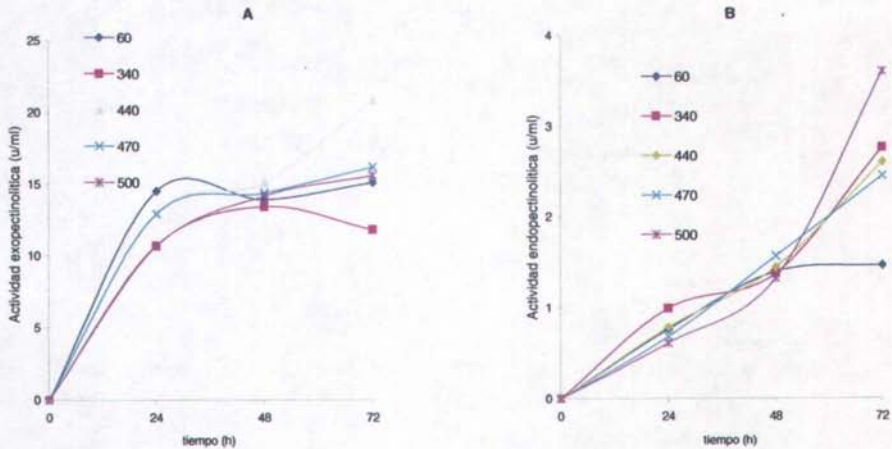


Fig. 9. Producción de pectinasas de 5 cepas de *Aspergillus* utilizando residuos de manzana al 3% (p/v) en un pH inicial de 5. Grafica (A). Actividad exopectinolítica (U/ml). y (B). Actividad endopectinolítica (U/ml).

Efecto del pH sobre la producción de enzimas pectinolíticas de 5 cepas de

*Aspergillus sp.*

Al comparar el comportamiento de las 5 cepas en los dos valores de pH probados, se pudo comprobar que el pH posee un efecto importante en la producción de los diferentes sistemas enzimáticos. Este efecto se ha reportado para cepas de *Aspergillus niger* y puede deberse a que el pH influye en diversos procesos metabólicos básicos en la fisiología celular (Trejo-Aguilar et al, 1996).

Los resultados obtenidos en la preselección de estas cepas productoras de los dos sistemas enzimáticos (exo y endo), muestran que la cepa FP500 es la mejor productora de enzimas de tipo endopeptinolítica en los dos valores de pH a las 72h de fermentación (Figura 10 a), y la mejor productora de actividad exopeptinolítica a pH 3, aunque a pH 5 la cepa FP440 es la mejor de todas con 20.8 U/ml a las 72h de fermentación, en tanto que la cepa FP500 apenas produce 15.5 U/ml, (figura 10 b).

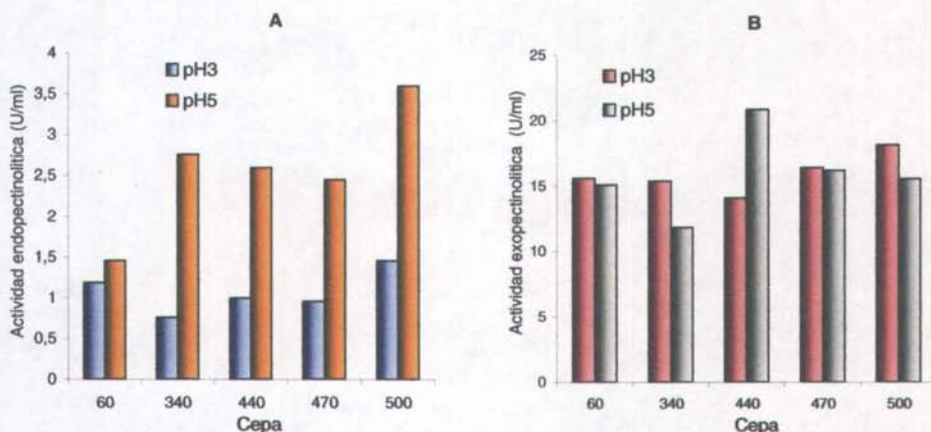


Fig. 10. Efecto del pH sobre la producción de actividad endopeptinolítica de 5 cepas de *Aspergillus*, en residuos de manzana al 3% (p/v). (a). Efecto del pH sobre la actividad exopeptinolítica de 5 cepas de *Aspergillus* en residuos de manzana al 3% (p/v) (b).



Con base en los resultados anteriores, se utilizó la cepa FP500 para un estudio más profundo con respecto al efecto de la concentración de la fuente de carbono y el pH inicial, en la producción de pectinasas.

Adicionalmente se determinó el perfil electroforético de las 5 cepas a pH 3, en donde todas presentaron un perfil de proteínas muy similar (Fig. 11). La cepa FP500 presentó una banda más intensa, lo que es consistente de una mayor actividad.

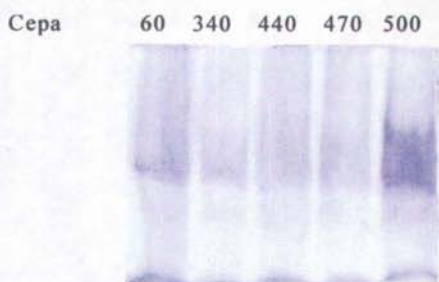


Fig. 11. Patrón electroforético en condiciones desnaturalizantes de filtrados enzimáticos de 5 cepas de *Aspergillus* crecidas a pH inicial de 3, con residuos de manzana al 3% (p/v).

En la Fig. 12 se muestra a la cepa FP500 a los dos pH probados, con el perfil de actividad "in situ", el cual exhibe las zonas de degradación correspondientes a las bandas proteicas.

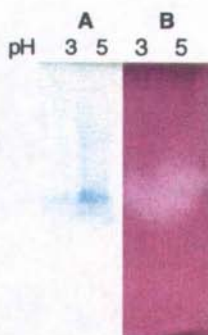


Fig. 12. Perfil de proteína en condiciones desnaturalizantes de la cepa FP500 a pH 3 y pH 5 en 3% de residuos de manzana como fuente de carbono (A). Actividad "in situ" de las bandas correspondientes de proteína secretadas por la cepa FP500 a los dos pH (B).

### Efecto de la concentración de fuente de carbono, sobre la producción de pectinasas para la cepa FP500 a pH 3 y pH 5.

Se realizaron fermentaciones con la cepa FP500 en un pH inicial de 3 y 5, utilizando diferentes concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5% (p/v) de residuo de manzana. Como en los casos anteriores el pH tiende a disminuir en las primeras 24h y posteriormente se estabilizo en un pH promedio de 2.5 a lo largo de la fermentación.

Los azúcares reductores a los dos pH probados, presentaron una cinética variable entre cada uno, lo cual resulta ser normal, ya que no comenzaron la fermentación con la misma concentración de fuente de carbono. Para el caso de 1% en pH 3 y 5 la cinética fue casi constante permaneciendo con una concentración de 0.55 mg/ml durante toda la fermentación, en concentración inicial de 2% comenzaron con 1.3 mg/ml, a las 24h disminuyeron 45%, para después mantenerse en promedio a una concentración de 0.9 mg/ml a las 48 y 72h en ambos pH (Fig. 13 a y b). En el caso de 3% y pH inicial de 3 comenzó a una concentración de 1.78 mg/ml y a las 24h aumentaron a 2.05 mg/ml para posteriormente a las 48h consumir el 50% de los azucares simples y quedar en una concentración estable de 1mg/ml, hasta el final de la fermentación (Fig. 13 a). Por otro lado, a pH 5 los azucares iniciaron con 2.26 mg/ml y a las 24h se consumieron cerca del 22% del sustrato, la cantidad de estos disminuyeron proporcionalmente, para las 48h se estabilizo a una concentración de 0.98mg/ml (Fig.13 b). Mientras que con el 4% y pH 3, comenzó con 2.91 mg/ml, el microorganismo consumió el 60% de los azúcares simples a las 24h, posteriormente permaneció en valores constantes (1.13mg/ml) hacia el final de la fermentación (Fig. 13 a). A pH 5 se inicio con 2.71mg/ml, estos disminuyeron 37% a las 24h, para las 48 y 72h permanecieron con 1.28mg/ml (Fig. 13 b).

Finalmente a 5% de concentración inicial de residuos de manzana y pH 3, los azúcares reductores iniciales fueron mayores (3.30 mg/ml), esto es debido a que el residuo de manzana posee azúcares reductores, por lo tanto cuando se aumenta la concentración inicial de fuente de carbono, aumentan los azúcares en el medio. A las 24h el microorganismo consumió el 50% de estos monosacáridos, a las 48h se duplicaron a 3.2mg/ml, para las 72h disminuyeron ligeramente a 3.0 mg/ml. A pH 5, inicialmente se registró el mismo valor que a pH 3, para las 24h se consumieron 1.2mg/ml, y estos aumentaron 0.2mg/ml en las 48h, y finalmente bajo a una concentración de 1.6mg/ml (Fig. 13 a y b).

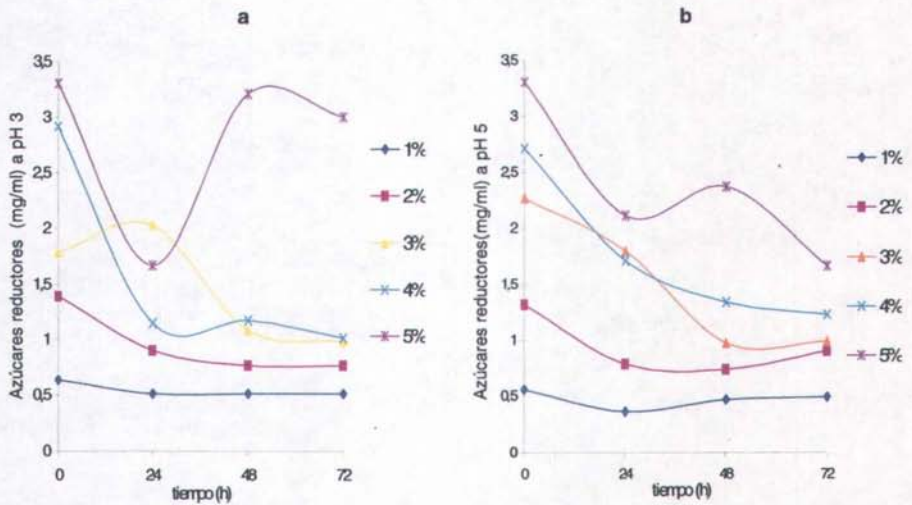


Fig. 13. Cinética de azúcares reductores (mg/ml) de la cepa FP500 a pH inicial de 3 (a) y pH inicial de 5 (b).

La actividad máxima de tipo exopectinolítica a pH 3, se presentó en la concentración inicial de 3% de fuente de carbono, con 18.13 U/ml, seguida de la del 4% que fue de 12.68 U/ml, y por otra parte la mínima actividad determinada es la del 2% de fuente de carbono, ya que apenas se produjeron 10.2 U/ml (Fig. 14 a).



Para esta misma actividad a pH 5, la condición más favorable fue cuando la concentración inicial de fuente de carbono es de 1%, ya que con esta alcanzo su máxima actividad con 21.2 U/ml. La condición menos favorable la presento al 5%, en la cual se registró la menor actividad (14.02 U/ml). Por lo anterior se puede decir que a mayor concentración de azúcares reductores, se reprime esta actividad (Fig. 14 b).

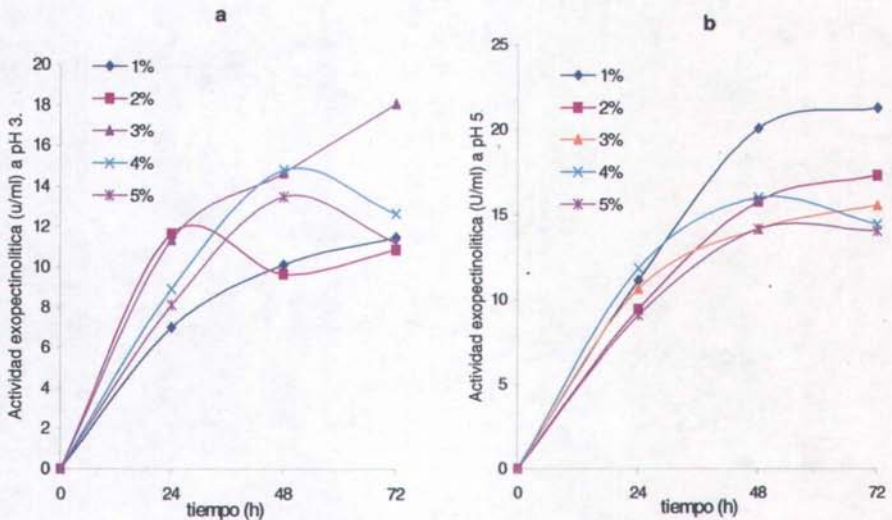


Fig. 14. Cinética de actividad exoenzimática (U/ml) de la cepa FP500 a pH 3 (a) y pH 5 (b).

La producción de endopectinasas a pH de 3, fue mayor cuando se trabajó inicialmente a concentración de 3% (p/v) de residuos de manzana, con producción enzimática de 1.46 U/ml a las 72h de fermentación (Fig. 15 a).

En el caso de pH 5, se presentó una clara inducción de estas enzimas al 1% de fuente de carbono, ya que se alcanzó la máxima actividad con 13.28 U/ml. La actividad endopectinolítica disminuye proporcionalmente con respecto a la concentración inicial de sustrato, resultando la del 5% la menos favorable para la producción de este tipo de enzimas, lo anterior se puede atribuir a una represión por sustrato (Fig. 15 b).

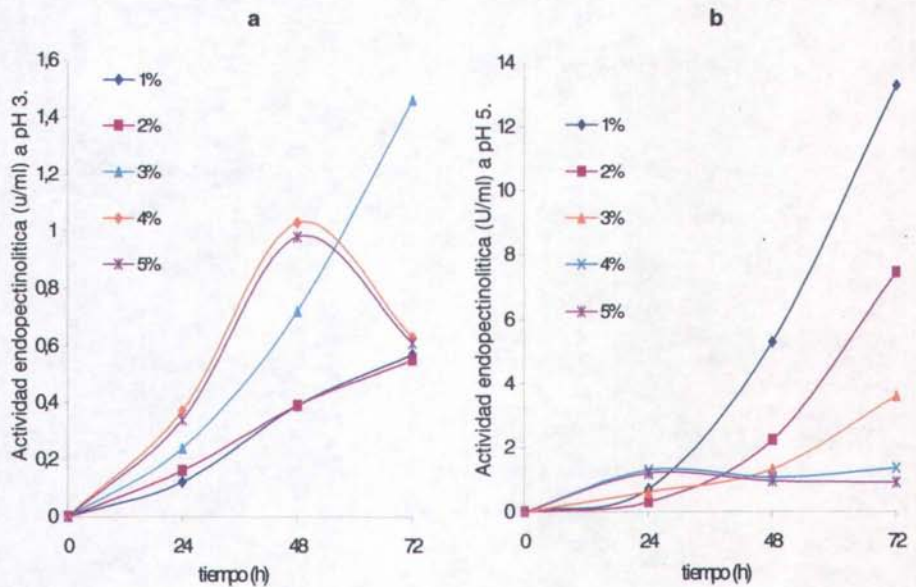


Fig. 15. Cinética de actividad endopectinolítica de la cepa FP500 a pH 3 (a) y pH 5 (b).

La actividad exopectinolítica y endopectinolítica a pH 5, disminuyen con respecto al aumento de la concentración inicial de fuente de carbono, resultando así que al 5% es el medio en el cual la producción enzimática es la menos favorable.



El efecto que tiene la concentración de la fuente de carbono y el pH inicial en la fermentación, es fundamental para la producción de estos sistemas enzimáticos. En el caso de actividad de tipo exopectinolítica el pH inicial más adecuado es de 5 para la mayoría, siendo la concentración inicial de 3% la única que no presentó este comportamiento (Fig. 16 a).

A pH inicial 5, se encontraron grandes diferencias de producción para la actividad endopectinolítica comparada con la que se produjo en pH de 3 (Fig.16 b). Estos resultados se correlacionan con la cantidad de azúcares reductores disueltos en el medio, ya que a menor concentración inicial de fuente de carbono, menor concentración de azúcares reductores y mayor producción de estas se obtiene. Este fenómeno es conocido y esta muy relacionado con la represión catabólica.

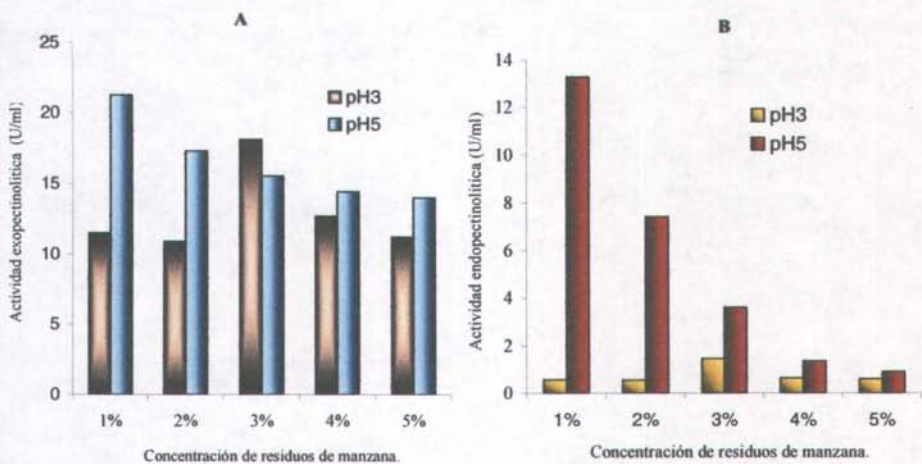


Fig. 16. Efecto del pH en la actividad exopectinolítica de la cepa FP500 a diferentes concentraciones de residuo de manzana como fuente de carbono. (a). Efecto del pH sobre la actividad endopectinolítica de la cepa FP500 a diferentes concentraciones de residuo de manzana (b).

Posterior a esto se realizó una electroforesis desnaturalizante correspondiente a las proteínas extracelulares obtenidas a partir de los cultivos fermentativos, con la cepa FP500 en las mejores condiciones de producción enzimática. Tal fue el caso de 1% y 2% de fuente de carbono a pH 5, que presentaron las máximas actividades de tipo endopectinolítica y exopectinolítica, también se comparado con 1% a pH inicial de 3. En las tres condiciones, se presentó un perfil de proteína similar, con una banda de peso molecular de 50kDa, aunque con mayor intensidad en el carril 2 aunado a que se detectó otra banda con un peso molecular de 45kDa. Esto debido muy probablemente a que a pH 5 se promueva la síntesis de otras proteínas, la cual se va reprimiendo al aumentar la concentración de fuente de carbono (Fig. 17 carril 3). En conjunto se presenta la actividad pectinolítica "in situ", correspondiente a las bandas de proteína. Schols y col. en 1990 fueron los primeros en identificar y reportar la actividad de una enzima capaz de degradar el cuerpo del RGM, la ramnogalacturonan hidrolasa con un peso molecular de 51 kDa y actividad a pH 5, dichos valores pudiesen ser comparables con los datos obtenidos.

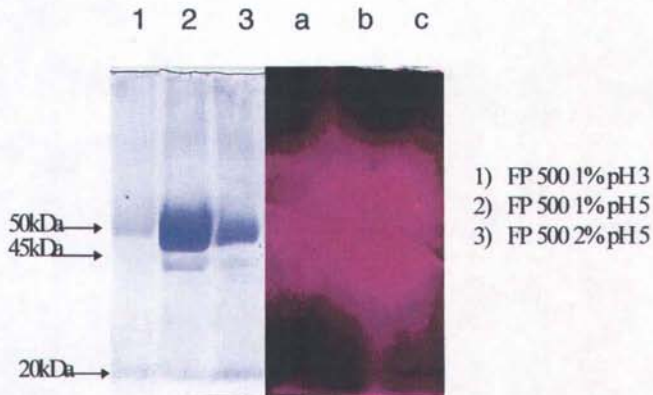


Fig. 17. Patrón electroforético desnaturalizante de la cepa FP500. Perfil de proteína (1, 2, y 3) Actividad "in situ". ( a, b y c ).

### Extracción del ramnogalacturonano modificado de manzana (RGM).

Durante la extracción se obtuvo un polvo de color rosado, con olor característico a manzana, completamente insoluble, de consistencia globosa. Con un rendimiento de 0.1%. Para evaluar el ramnogalacturonano como sustrato en actividad ramnogalacturonasa, se utilizaron filtrados enzimáticos de fermentaciones hechas con la cepa FP500 en residuos de manzana a concentraciones de 1, 2, y 3%, como fuente de carbono y pH inicial de 5.

En la Fig. 18, se muestra la cinética de producción de actividad ramnogalacturonasa. La actividad obtenida en el filtrado enzimático de 1% de residuos de manzana con respecto al de concentración inicial de 2%, es muy parecido, alcanzando su máxima actividad de 2.02 U/ml a las 24h y manteniéndose casi constantes hasta las 72h. Para la concentración inicial de 3% en el filtrado enzimático, la actividad es tres veces menor comparada con 1 y 2% a las 24h, aunque ligeramente mayor con 0.2 U/ml a las 48h. Es interesante que en prácticamente 24h se obtuviera la máxima producción. Al comparar el comportamiento de producción en las tres condiciones, es posible concluir que basta con utilizar el sustrato al 1% para alcanzar un buen nivel de producción de ramnogalacturonasas. Lo anterior resulta ser un ahorro en la fuente de carbono y una clara reducción de tiempo para la obtención de estas enzimas específicas en la hidrólisis del ramnogalacturonano.



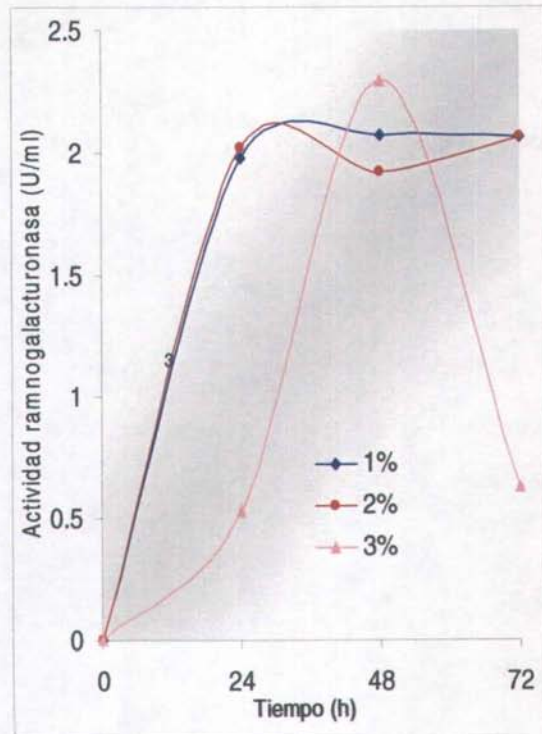


Fig. 18. Actividad de ramnogalacturonasa de la cepa FP500 a concentraciones de 1, 2 y 3% (p/v) de residuos de manzana como fuente de carbono y pH inicial de 5 sobre ramnogalacturonano modificado de manzana como sustrato (RGM).

Crecimiento celular y detección de actividad enzimática en medio sólido.

El ramnagalacturonano se probó como única fuente de carbono, para evaluar la capacidad del microorganismo para degradar al polisacárido obtenido, se probaron las 10 cepas de *Aspergillus* que inicialmente se utilizaron en este experimento. Todas las cepas crecieron (Fig. 19, A) y produjeron halos de degradación (Fig19, B).

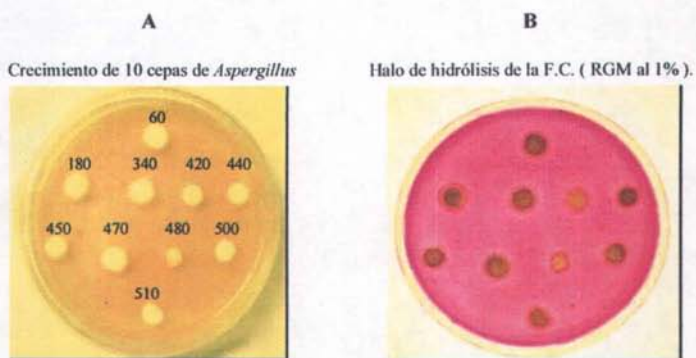


Fig. 19. Crecimiento en medio sólido con ramnagalacturonano como única fuente de carbono de 10 cepas de *Aspergillus* (A). y sus correspondientes halos de hidrólisis (B).

Se obtuvieron relaciones de halo/colonia (diámetro del halo de hidrólisis entre el diámetro de la colonia). Con el fin de identificar que cepa en medio sólido creció más y/o cual de ellas posee la capacidad de degradar al ramnagalacturonano (RGM). Las cepas que presentaron un valor mayor en relación H/C (1.43) fueron, FP420, FP450 y la FP510 (Tabla 4).

Por otro lado, las cepas restantes presentaron valores de entre 1.22 a 1.38, valores aceptables considerando la difícil degradación de la fuente de carbono.

Se esperaba que la cepa FP500, fuese una de las más altas en relación a crecimiento y halo de hidrólisis, lo cual no fue, esto se debe a factores como: actividad acuosa, la aireación también podría tomarse en cuenta.

Estos resultados arrojan datos muy interesantes, debido a que a partir de una forma sencilla, se pueden identificar algunas cepas autóctonas, que son capaces de crecer y producir enzimas específicas para la hidrólisis de ramnogalacturonano.

clasificación de cepa	Relación halo/colonia (cm)
FP 60	1,22
FP 180	1,38
FP 340	1,33
FP 420	1,43
FP 440	1,25
FP 450	1,43
FP 470	1,22
FP 480	1,33
FP 500	1,22
FP 510	1,43

Tabla 4. Relación halo/colonia, de 10 cepas de *Aspergillus*. Creciendo en ramnogalacturonano al 1% (p/v) como única fuente de carbono a pH inicial de 5.



### Análisis infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

Para el análisis de ramnogalacturonano modificado de manzana (RGM), se utilizaron como estándares ramnogalacturonano I (RGI) de frijol de soya y ramnogalacturonano I (RGI) de limón. El espectro mostró una región espectral de  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 20).

La interpretación completa de un espectro de infrarrojo es difícil, en virtud de que la mayoría de las moléculas orgánicas son tan grandes que existen docenas o cientos de posibles movimientos. En cierto sentido esta complejidad es valiosa, puesto que dicho espectro sirve como huella dactilar única de un compuesto específico. Sin embargo, para propósitos de determinación de estructuras, la gran cantidad de absorciones presentes en el espectro, complica la interpretación completa, por fortuna en este caso, no es necesario hacerlo para poder obtener información útil sobre el ramnogalacturonano I de manzana (RGM) ya que el espectro muestra como estándares conocidos al ramnogalacturonano I de limón y de frijol de soya, presentando señales casi idénticas, con lo cual es casi seguro que se trate de la misma estructura péctica.

La mayoría de los grupos funcionales provocan absorciones características, en este caso la absorción es clara para los grupos -OH, que casi siempre queda comprendida en el intervalo de  $3200\text{ a }3600\text{ cm}^{-1}$  (a), siendo este grupo funcional, parte fundamental de las estructuras del polisacárido.

La zona por debajo de los  $1500\text{ cm}^{-1}$  (b), corresponde a la región de huellas dactilares, es aquí donde se presentan un gran número de absorciones, debidas a las vibraciones de enlaces sencillos como C-C, C-O. (Mc Murry, 1994). Los cuales son la base de la estructura del heteropolisacárido.

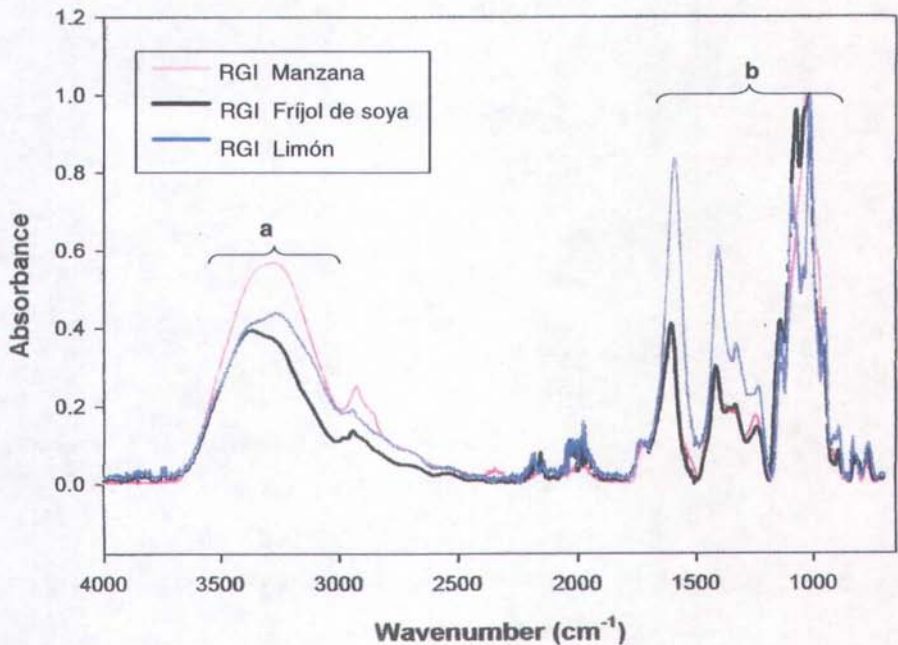


Fig. 20. Espectro de infrarrojo T.F. Análisis comparativo del perfil del RGM de manzana con RGI de limón y frijol de soya.

En este experimento se podría asegurar que los extractos presentan características estructurales de composición comparable.



- Todas las cepas de *Aspergillus* probadas poseen la capacidad de utilizar los residuos de manzana como sustrato y expresar sus sistemas enzimáticos pectinolíticos.
- La producción de pectinasas producidas por *Aspergillus* es afectada por el pH del medio. La actividad exopectinolítica, para las 5 cepas en 3% de residuos de manzana aumenta conforme el pH disminuye, mientras que para la producción de endopectinasas fue mayor a medida que el pH aumento.
- La cepa FP500 se considera la mejor productora de actividad endopectinolítica, trabajando a pH 5 y una concentración 1% de fuente de carbono.
- La producción de endopectinasas y exopectinasas por *Aspergillus* depende de un claro balance, relacionado con la concentración de fuente de carbono y pH inicial.
- El RGM de manzana extraído en el laboratorio presento un perfil estructural (IF) muy semejante al RG I de frijol de soya y de limón.
- Todas las cepas blancas de *Aspergillus* utilizadas son capaces de crecer y utilizar el RGM de manzana, como única fuente de carbono y producir ramnogalacturonasas.
- Los residuos de manzana pueden considerarse buenos inductores de sistemas enzimáticos pectinolíticos degradadores de polisacáridos, y con esto colaborar en el buen uso de residuos agroindustriales.

- Aguilar G. and Huitrón C. (1993) Conidial and mycelial-bound exo-pectinase of *Aspergillus sp.* FEMS microbiol. Lett 108: 127-132.
- Aguilar, G. and Huitrón, C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose additions. Enzyme Microbial Technology. 9: 690-696.
- Baig, M. M. and Cerda, J. J. (1980). Studies on the role of citrus in health and disease. In citrus nutrition and quality. S. Nagy and J. A. Attaway. Eds ACS Symposium series 143. American Chemical Society: Washington, D.C. Pag. 25-41.
- Blanca A. Trejo-Aguilar<sup>a</sup>, Jaap Visser<sup>b</sup> and Guillermo Aguilar O<sup>a</sup> (1996). Pectinase secretion by *Aspergillus* FP-180 and *Aspergillus niger* N-402 growing under stress induced by the pH of culture medium. Eds. J. Visser and A. G. J. Voragen. Pectins and Pectinases. Elsevier Science B. V. All rights reserved. Pag. 915-920.
- Biely, P. and Kremnicky, L. (1998). Yeast and their enzyme system degrading cellulose, hemicellulose and pectin. Food Technology, biotechnology. vol 36 pag. 305-312.
- Claridades Agropecuarias, (Nov. 1995). Revista mensual producida y editada por Apoyos y servicios a la comercialización Agropecuaria. ASERCA. Editor responsable Mario Barreiro Perera. Pág.3 y 17.
- Colagrande O, Silva A., Fumi M. D. (1994). Recent applications of biotechnology in wine production. Biotechnology vol. 10 Pag. 2-18.
- Collmer, A. and Keen, N. T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annual Review Phytopathology, Vol. 24. pag. 383-405.
- Cooper R .M. and Wood R. K. (1973). Induction of synthesis of extracellular cell wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. Nature 246. pag. 309-311.
- de Vries R. P, (1999) Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Tesis Doctorado, Wageningen Agricultural University. Holanda Pag. 2-6. (1999).
- de Vries, R. P. and Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65:497-522.
- de Vries, R. P., Jansen, J., Aguilar, G., Parenicova, L., Joosten, V., Wulfert, F., Benen, A. E. y Visser, J. (2002). Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. FEBS Letters. 530: 41-47.
- García, G. M. Quintero, R.R., López Murguía, A (1993). Biotecnología alimentaria. Limusa, México. Pág. 104.

- Harvey, L. M. and McNeil B. (1994). Liquid fermentation system and product recovery of *Aspergillus sp.* Pag. 141-176. Smith, J. E. Biotechnology. Handbooks.7-*Aspergillus*, plenum. Press. New York.
- Hugouvieux, C. P. N, Reverchor S. Nasser W., Condemine G. and Robert Baudovy J. (1996). Regulation of pectinase biosynthesis in *Erwinia chrysanthemi*. En progress in biotechnology 14 pectins and pectinases. Visser J. Voragen, Eds. Elsevier Amsterdam, pag. 311-346.
- Jackson D.I. and Looney, N.E. (2002). Producción de frutas de climas templados y subtropicales, Editorial Acribia, Zaragoza. Pág. 213-215.
- Kashyap. D.R. et al (2001) Application of pectinases in the comercial sector: a review Bioresource Technology vol. 77 pag. 215-227.
- Kay Ryugo. (1993). Fruticultura ciencia y arte. Primera edición. AGT Editor, S.A. Pág. 332.
- Klung W. S. and Cummings M. R.(1999). Conceptos de genética. Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid, pag. 556-559.
- Kojima, Y., Sakamoto, T., Kishida, M., Sakai, T. and Kawasaki, H (1999). Acidic adiction-inducible poligalacturonase of *Aspergillus kawachii*. J. Mol. Catalysis: Enzymatic. 6:351-357.
- Lal D.L. Kaushal and P.C Sharma (1995) Hand book of fruti science and technology production, composition, storage and processing, edited by DK. Salunkhe S.S. and Kadam Marcel Dekker. New York basel Hong Kong U.S.A. pag. 91.
- Laemi, V. K. (1970). Cleavage of the estructural proteins during the assembly of the head of bacteioophage. T4. Nature. 227: 680-685.
- Lalatta Filippo (1999) Guía completa del cultivo de manzanas. Edt. Vecchi, Pág. 29.
- Lowry, O., Rosebrowgh, N., Fair, N. and Randall, R. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 93: 265-275.
- McMurry, John. (1994). Química orgánica, Espectroscopia de infrarrojo de moléculas orgánicas. Grupo editorial Iberoamericana. Pag. 407-412.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Chem. 31:426-428.
- Newbold, R. and Joslyn, M. A. (1952). Journal of the Association of official Agricultural. Chemistry, vol. 35, pag. 872.

- Oechsli R.M. V. Lutz R. pectic substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterisation of a new type of rhamnogalacturan I. Carbohydrate polymers 51 ( 2003) pag.301, 308.
- O a Kenfull D.G (1991) The chemistry of high-methoxyl pectins the chemistry and technology of pectin.Reginal H. Walter ed. Academic Press. California pag. 87-92.
- O'Neill M. Albersheim. P. Darvill A.G. (1990) The pectic polysaccharides of primary cell walls. In dey P.M.and Harborne J.B. (eds) Methods in plant biochemistry, Vol. 2 Carbohydrates. Academic Press, London, pag. 415-441.
- Oxeboll K. (1994) *Aspergillus* enzymes and industrial uses FEMS symposium no. 69. The genus *Aspergillus* from taxonomy and genetics to industrial applications Keith A. Powell, Peberdy ed. Plenum, Press New York pag. 147-155.
- Parenticová, L.(2000). Pectinases of *Aspergillus niger*. A molecular and biochemical characterization. Tesis Doctorado. Wageningen University. Holanda. Pág 2-28.
- Pellerin P. Doco. T, Brillouet J (1995) The pectic polisaccharide rhamnogalacturonan II is a major component of the polisaccharides present in fruit-derived products. In: Abstracts of the international symposium "pectins and pectinasas". Elsevier, The Netherlands.
- Puvanesarajah V, Darvill AG, Albersheim P (1991). Structural characterization of two oligosaccharide fragments formed by the selective cleavage of rhamnogalacturonan II: evidence for the anomeric configuration and attachment sites of apiose and 3-deoxy-2-heptulosaric acid. Carbohydrates Res 218:211-222.
- Ramírez Rodríguez Homero, (2003) El manzano. Edt. Trillas Pág. 14-16.
- Rinaudo M. (1996) Physicochemical properties of pectins in solution and gel states en progressin biotechnology 14 pectins and pectinases. Visser J y Voragen A. eds. Elsevier Amsterdam. Pág.21-33.
- Ríos Barajas Marcela Yanel (2003). Efecto del almacenamiento del frijol en la metilación de la pectina y la actividad de pectinmetilesterasa. Tesis de licenciatura FAC. Química UNAM. Pag. 11.
- Rodríguez, P. B. Rosa (1998) Identificación de algunos inductores de las pectinasas extracelulares producidas por *Aspergillus sp.* FP180., tesis maestría, UNAM, México, D.F., Pág. 16.
- Rolin, C.; Nielsen, B.U. and Glahn, P. (1998). Pectin. In : Polisaccharides. Structural diversity and funtion versatility. S. Dumitriu. Ed. K. Marcel Dekker. New York. Pag. 377.
- Rose A. H. (1980) Microbial enzymes and bioconversions. Academic Press. Economic Microbiology vol. 5 pag. 227.

- Ruijsenaars, H. J. and Hartmans, S. (2001). Plate methods for the detection of polysaccharase-producing microorganisms. *Appl.Microbiol. Biotechnol.vol.55* Pag.143-149.
- Ruijter, G.J.G. and Visser J (1997) Carbon repression in *Aspergillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151.
- Sajjaanantakul T. and Pitifier L. A. (1991) Pectinesterase the chemistry and technology of pectin pag.135-157.
- Salazar Alonso H., Grajeda G. (2000). *Fruticultura en clima templado*, Grupo editorial Éxodo, Pág. 106.
- Schols H. A. G.J. Voragen. (1996) Complex Pectins: Structure elucidación using enzymes. En *progressin biotechnology 14 pectins and pectinases* Visser J. and A. G.J. Voragen editors, pectins and pectinases Elsevier Science B. V. All rights reserved. Pag. 3-20.
- Suárez, F. (1989). *Elaboración de Sidra, una bebida espumante*. Editorial Zaragoza, Madrid, España Pág. 268.
- Tamaro (1986). *Tratado de fruticultura*, Editorial Gustavo Gili, S.A. Barcelona, España.
- Ten H-Suykerbuyk Marjon (1997) Molecular analysis of endo-rhamnogalacturonan hidrolases in *Aspergillus*. Tesis de doctorado Wageningen University. Pág.1-47.
- Van der Veen, P. (1991). PhD. Thesis, Research Institute for plant Protection, Wageningen, Holanda.
- Voragen A.G.J. and Pilnik W. (1989) Pectin degading enzymes in fruit and vegetable procesing. *A.C.S. Symp. Ser. 389: 93-115*.
- Voragen, F.; Beldman, G. and Schols H, (2001). Chemistry and enzymology of pectins. In *Advanced dietary fibre Technology*. McCleary, B. and Prosky L. Eds. Blackwell science. Ireland. Pag. 379.
- Vries, J.A. de F.M. Rombouts, A.G.J. Voragen, and W. Pilnik. (1982) Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydr. Polimers 2: 25-33*.
- Walter R.H. (1991) Analytical and graphical methods for pectin. The chemistry and techonology of pectin. Reginal H Walter eds. *Academic California Press* pag. 189-225.
- Whitaker, J. R. (1990). *Microbial enzymes and biotechnology*. 2da. Edition. Fogarty, W. M. and C. T. Kelly (eds) *Academic, Pres. Vol 4*, pag. 133-176.
- Whitaker J.R (1984).Pectic Substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzime Microb. Technol 6:341-349*.

---

Referencias electrónicas.

[http://www.infoagro.com/frutas\\_tradicionales/manzana.htm](http://www.infoagro.com/frutas_tradicionales/manzana.htm).

<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>

[webmaster@cfired.org.ar](mailto:webmaster@cfired.org.ar)1999-2000 (consejo federal de inversionistas fruticultura).