

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**“Identificación y comparación de las
pectinasas extracelulares producidas
por cepas de *Aspergillus flavus*”**

Tesis

que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Bioquímicas)
que presenta:

IBT. Carlos Eduardo Gómez Sánchez

Tutor: **Dr. Guillermo Aguilar Osorio**

México, D. F.

Noviembre de 2006



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.

IDENTIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS PECTINASAS EXTRACELULARES PRODUCIDAS POR CEPAS DE *Aspergillus flavus*

Reconocimientos

Esta tesis de maestría fue dirigida por el Dr. Guillermo Aguilar Osorio, jefe del grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos, en el laboratorio 312 del departamento de Alimento y Biotecnología del edificio "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante los estudios de maestría goce de apoyos económicos por beca de CONACYT. Esta tesis se desarrollo con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN207603 y IN219604).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eduardo Bárzana García	Facultad de Química, UNAM
Dr. Manuel Jiménez Estrada	Instituto de Química, UNAM
Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Facultad de Química, UNAM

El jurado asignado para la defensa del examen de grado estuvo formado por:

Presidente	Dr. Eduardo Bárzana García	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Leobardo Serrano Carreón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Luis Bernardo Flores Cotera	CINVESTAV, IPN
Suplente	Dra. Alicia González Manjares	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Roberto Arreguín Espinosa	Instituto de Química, UNAM

Agradecimientos

Al Dr. Guillermo Aguilar Osorio y a Blanca Trejo-Aguilar

Por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y, principalmente, por la amistad que siempre me ha brindado.

A mis compañeros de laboratorio

Aurora, Elena, Karina, Melissa, Irene, Perlita, Christian, Alberto, Gina y el Sr. Rodrigo, por propiciar un ambiente agradable de trabajo.

A los miembros del comité tutorial y de jurado de maestría

Por su valiosa guía y aportaciones a la realización de esta tesis, así como por el tiempo que se tomaron para revisarla.

Dedicatorias

Esta tesis está dedicada principalmente a mis padres, José E. Gómez y Rosalina Sánchez, por su inmesurado y desinteresado apoyo, gracias. Los amo.

Parte de este esfuerzo también está dedicado a mis hermanos Alejandra, Daniel y Rosalina, ya que sin su presencia física o moral, este camino hubiera sido muy difícil de sobrellevar.

A mis amigos de siempre: Mario, Diana y Mirna, gracias por estar conmigo en todo momento.

CONTENIDO

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	3
2.1. <i>Aspergillus flavus</i>	3
2.2. Generalidades sobre pared celular de plantas	5
2.3. Pectinasas	8
2.4. Enzimas que degradan polisacáridos en otros patógenos de plantas	12
3. Objetivos	15
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. Hipótesis	15
5. Materiales y Métodos	16
5.1. Microorganismos	16
5.2. Desarrollo de inóculo	16
5.3. Experimentos de transferencia de micelio	16
5.4 Medios y condiciones de cultivo	16
5.5. Determinación de crecimiento celular	18
5.6. Determinación de grupos reductores	18
5.7. Determinación de actividad exo-pectinolítica	18
5.8. Determinación de actividad endo-pectinolítica	19
5.9. Determinación de actividad pectin liasa	19
5.10. Determinación de la estabilidad al pH de la actividad pectin liasa	19
5.11. Determinación de pH óptimo de la actividad pectin liasa	20
6. Resultados y Discusión	21
6.1. Crecimiento en medio sólido	21
6.2. Efecto del pH y la temperatura	23
6.2.1. Crecimiento celular	23
6.2.2. Actividades pectinolíticas	24
6.3. Efecto de la fuente de carbono	30
6.3.1. Crecimiento celular	30
6.3.2. Actividades pectinolíticas	31
6.4. Experimentos de transferencia de micelio	36

6.4.1. Crecimiento celular	36
6.4.2. Actividades pectinolíticas	38
6.5. Caracterización de los filtrados enzimáticos con actividad pectin liasa	41
7. Discusión general	47
8. Conclusiones	53
9. Referencias	55

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación esquemática de las microfibrillas de celulosa. 5
- Figura 2.** Representación esquemática del xilano. 6
- Figura 3.** Representación esquemática del xiloglucano. A) unidades repetidas de tres residuos de D-glucosa sustituidos con D-xilosa en posición α -1,6 seguidos de un residuo de D-glucosa sin sustitución. B) unidades de dos residuos de D-glucosa sustituidos por residuos de D-xilosa en posición α -1,6 seguidos de dos residuos de D-glucosa sin sustituir. 6
- Figura 4.** Esquema de la estructura del galacto(gluco)manamo 7
- Figura 5.** Esquema de la interacción de los polisacáridos de la pared celular de las plantas. 7
- Figura 6.** Esquema general de la estructura de la pectina. 8
- Figura 7.** Mecanismo de acción de las poligalacturonasas (hidrolasas). 9
- Figura 8.** Mecanismo de acción de las pectin y pectatoliasa 10
- Figura 9.** Representación esquemática de la frecuencia de corte de las enzimas pectinolíticas con actividad tipo “exo” y “endo”. 11
- Figura 10.** Efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* en medio sólido. a y b) *A. flavus* NRRL-6541 y *A. flavus* CECT-2687 a 28°C, respectivamente y c y d) *A. flavus* NRRL-6541 y *A. flavus* CECT-2687 a 37°C, respectivamente. 21
- Figura 11.** Cinética de crecimiento de *Aspergillus flavus* en medio sólido (agar papa-dextrosa). A) (●) *A. flavus* NRRL-6541 y (■) *A. flavus* CECT-2687 a 28 °C y B) (○) *A. flavus* NRRL-6541 y (□) *A. flavus* CECT-2687 a 37 °C. 22
- Figura 12.** Cinética de producción de de actividad exo-pectinolítica volumétrica de *Aspergillus flavus* en pectina como fuente de carbono. A) NRRL-6541 y B) CECT-2687. (●, ■, ▲) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 28°C y (○, □, Δ) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 37°C. 26
- Figura 13.** Cinética de producción de de actividad exo-pectinolítica específica de *Aspergillus flavus* en pectina como fuente de carbono. A) NRRL-6541, B) CECT-2687 y C) evolución típica del pH del medio de cultivo. (●, ■, ▲) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 28°C y (○, □, Δ) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 37°C. 27
- Figura 14.** Cinética de producción de actividad pectin liasa específica de la cepa *Aspergillus flavus*.NRRL-6541 en pectina como fuente de carbono. (●, ■, ▲) pH inicial

3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 28°C y (○, □, Δ) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 37°C. 28

Figura 15. Cinética de producción de actividad exoPG específica de *Aspergillus flavus* en diferentes fuentes de carbono. A) NRRL-6541 y B) CECT-2687. (●) Glucosa, (■) Ácido galacturónico, (▲) Ácido poligalacturónico, (▼) Xilosa, (+) Galactosa, (○) Arabinosa y (□) Ramnosa. 33

Figura 16. Cinética de producción de actividad pectin liasa en diferentes fuentes de carbono. A) NRRL-6541 y B) CECT-2687. (●) Glucosa, (■) Ácido galacturónico, (▲) Ácido poligalacturónico, (▼) Xilosa, (+) Galactosa, (○) Arabinosa y (□) Ramnosa. 35

Figura 17. Cinética de producción de actividad pectin liasa y evolución del pH del medio por *A. flavus* NRRL-6541 (◆, ■) y *A. flavus* CECT-2687 (◇, □). pH (◆, ◇), actividad pectin liasa (■, □). 36

Figura 18. Cinética de crecimiento celular en los experimentos de transferencia de micelio. El precrecimiento se hizo en medio basal con 1% (p/v) de glucosa y 0.1% (p/v) de extracto de levadura. El micelio se recuperó en condiciones asépticas y se lavó tres veces con solución salina fría. A) *A. flavus* NRRL-6541 y B) *A. flavus* CECT-2687. (●) Glucosa, (■) ácido galacturónico, (▲) ácido poligalacturónico y (▼) pectina. 37

Figura 19. Cinética de producción de actividad exo-pectinolítica en experimentos de transferencia de micelio utilizando distintas fuentes de carbono (10 g/L), a pH 6.0 y 37°C. A) *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y B) *Aspergillus flavus* CECT-2687. (●) Glucosa, (■) ácido galacturónico, (▲) ácido poligalacturónico y (▼) pectina. 39

Figura 20. Producción de actividad pectin liasa en experimentos de transferencia de micelio utilizando distintas fuentes de carbono. A) *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y B) *Aspergillus flavus* CECT-2687. (●) Glucosa, (■) ácido galacturónico, (▲) ácido poligalacturónico y (▼) pectina. 40

Figura 21. Efecto la concentración de Ca^{2+} sobre la actividad liasa producida por la cepa *A. flavus* NRRL-6541, presente en un filtrado libre de células. La actividad se produjo en pectina a pH inicial de 6.0 y 37 °C. 42

Figura 22. Efecto del grado de esterificación de la pectina sobre la actividad liasa producida por dos cepas de *A. flavus*. 43

Figura 23. Efecto del pH sobre la actividad liasa presente en los filtrados enzimático producidos por *Aspergillus flavus* en ácido galacturónico a pH 6.0 y 37°C. A) pH óptimo y B) estabilidad a pH. 45

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Composición del medio basal (MB).	17
Tabla II. Condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo.	17
Tabla III. Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> en medio sólido (Agar papa-dextrosa).	22
Tabla IV. Crecimiento celular de las cepas <i>A. flavus</i> NRRL-6541 y CECT-2687.	23
Tabla V. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento máximo de <i>A. flavus</i> .	30
Tabla VI. Consumo de sustratos de cepas de <i>Aspergillus flavus</i> .	31
Tabla VII: Comparación de actividad de tran-eliminación sobre pectinas con diferentes grados de esterificación.	44

RESUMEN

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *Aspergillus flavus* para comparar su crecimiento en medio líquido, así como determinar su capacidad de producir enzimas pectinolíticas bajo diferentes condiciones ambientales y nutricionales. Las dos cepas crecieron mejor en pectina y ácido poligalacturónico (3.42-6.6 y 1.32 mg mL⁻¹, respectivamente) que sobre azúcares sencillos como la glucosa (0.2-0.62 mg mL⁻¹) en cultivos inoculados con esporas. Cuando los cultivos fueron inoculados con micelio vegetativo la cepa NRRL-6541 creció mejor en glucosa (3.1 mg mL⁻¹) que en pectina y ácido poligalacturónico (2.1 y 1.7 mg mL⁻¹, respectivamente) y la cepa CECT-2687 creció mejor en pectina (4.2 mg mL⁻¹) que en glucosa (1.3 mg mL⁻¹). Las actividades que se identificaron fueron la actividad exo-pectinolítica (exo-PG) y la actividad pectin liasa, aún no reportada para este hongo. Se determinó que la actividad exo-PG, al igual que lo que se ha reportado, es inducida por pectina y sustancias relacionadas con su estructura (ácido poligalacturónico y ácido galacturónico). Por otro lado, la actividad pectin liasa también fue producida en pectina, ácido poligalacturónico y ácido galacturónico y reprimida por glucosa. La mayor actividad pectin liasa se produjo en ácido galacturónico (72 y 22 mU mg⁻¹ PS para la cepa NRRL-6541 y CECT-2687, respectivamente) cuando el cultivo se inoculó con esporas, mientras que cuando se inoculó con micelio vegetativo, la cepa NRRL-6541 produjo la mayor actividad en ácido galacturónico (12.1 mU mg⁻¹ PS) y la cepa CECT-2687 lo hizo ácido poligalacturónico (4.2 mU mg⁻¹ PS). Las dos actividades pectinolíticas (exo-PG y pectin liasa) presentaron una producción diferencial respecto a la fuente de carbono y al tipo de inóculo que se utilizó. También se caracterizaron los filtrados enzimáticos libres de células con actividad pectin liasa producidas por las dos cepas de *A. flavus*, y se determinó que estos tienen un pH óptimo de 7.0 y la mejor estabilidad a pH 8.0 a temperatura ambiente.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de microorganismos capaces de crecer sobre tejidos vegetales de forma saprófita o como patógenos. La capacidad de los microorganismos de invadir los tejidos vegetales se debe, entre otros factores, a la producción de enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular de las plantas como son: las celulasas, las hemicelulasas y las pectinasas. En algunos casos, estas enzimas han sido consideradas como factores de patogenicidad. Este es el caso de las enzimas pectinolíticas.

Aspergillus flavus, un hongo fitopatógeno, es de importancia en la industria agropecuaria ya que contamina cultivos de importancia económica con aflatoxinas, las cuales representan un potencial riesgo de salud para los humanos. Hasta el momento se ha reportado que este hongo produce tres enzimas con actividad poligalacturonasa (PG), una pectinmetilesterasa (PME) y un complejo con actividad de trans-eliminación. De estas enzimas pectinolíticas, la denominada P2c ha sido identificada como factor de patogenicidad. Esta es una enzima que presenta actividad de poligalacturonas, es inducida por pectina y no presenta represión por glucosa.

Por otro lado, es interesante resaltar que para *Aspergillus niger*, un hongo saprófita, se ha reportado que produce hasta 26 enzimas pectinolíticas diferentes bajo diferentes condiciones de cultivo. Esto hace pensar que probablemente *Aspergillus flavus*, estando filogenéticamente relacionado con *Aspergillus niger*, tiene la capacidad de producir, además de las enzimas reportadas, otras enzimas pectinolíticas que le permitan degradar de manera eficiente la pectina.

La identificación y estudio de las enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular de las plantas de *A. flavus*, en particular las enzimas pectinolíticas, permitiría entender cual la función fisiológica de estas en el proceso de infección a plantas. Esta información podría ser de gran relevancia en las áreas de control biológico de cultivos y de almacenamiento post-cosecha, así como en el área de interacción planta-patógeno.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus es un hongo fitopatógeno que infecta cultivos de importancia económica como maíz, cacahuate y algodón, y los contamina con aflatoxinas (Marsh and Payne, 1984, Cleveland and McCormick, 1987, Cleveland and Cotty, 1991 y Brown *et al*, 1992.). Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos no solo por *A. flavus*, si no también por *Aspergillus parasiticus*. Es conocido que estos compuestos son tóxicos y carcinogénicos para los animales y representan un gran riesgo para los humanos (Yu *et al.*, 1995 y 2000).

La capacidad de degradar eficientemente los tejidos de las plantas es una característica que poseen muchos hongos fitopatógenos. Esta capacidad está dada por su habilidad de producir enzimas que degradan sinérgicamente la pared celular de las plantas, de entre las cuales destacan las que degradan la pectina. Cleveland y McCormick, (1987) identificaron que *Aspergillus flavus* producía cuatro enzimas con actividad pectinolítica cuando el hongo era cultivado en algodón y en pectina como fuente de carbono. Las enzimas fueron parcialmente caracterizadas y se identificaron tres poligalacturanasas (PG) y una pectinmetilesterasa (PME). De las tres enzimas con actividad PG, la denominada P2c fue la que se produjo en mayor cantidad y su frecuencia de corte era de una enzima con actividad tipo “endo”. Todas las enzimas presentaron represión por glucosa excepto la P2c (Cleveland and McCormick, 1987). La capacidad de *Aspergillus flavus* de producir la enzima P2c fue relacionada directamente con la agresividad con la que este hongo invadía los tejidos de la planta de algodón. Las cepas que no fueron capaces de producir esta enzima fueron también incapaces de colonizar exitosamente los tejidos (Cleveland and Cotty, 1991 y Brown *et al*, 1992).

El gen que codifica para la endo-PG P2c se aisló y se caracterizó. Este gen (*pecA*) consiste de 1228 pares de bases que codifican para una proteína de 363 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 37.6 kDa

(Whitehead *et al*, 1995). En otro estudio se observó que la interrupción de este gen, en cepas de *Aspergillus flavus* de altamente patógenas, ocasionó que las cepas perdieran su agresividad, y la restauración de este gen dio como resultado que la recuperaran (Shieh *et al*, 1997).

Famurewa *et al*, (1993) reportaron la identificación de un complejo pectinolítico producido por *Aspergillus flavus* con actividad de trans-eliminación. De acuerdo con los autores, este complejo fue inducido por pectina como fuente de carbono y fue reprimido cuando el hongo fue cultivado sobre glucosa, sacarosa, maltosa y fructosa. Se encontró que las únicas dos fracciones que presentaron actividad de trans-eliminación, al purificar parcialmente el complejo, tenían una masa molecular de aproximadamente 33 kDa. Estas dos fracciones presentaron un pH óptimo de 8.5 y una temperatura óptima de 35°C. En cuanto a la especificidad hacia el sustrato, las dos fracciones presentaron actividad sobre pectina y sobre ácido poligalacturónico. La capacidad de estas fracciones de degradar este último sustrato sugiere la presencia de, al menos, una enzima con actividad pectato liasa, debido a que este tipo de enzimas despolimerizan las cadenas de homogalacturonano de bajo grado de esterificación. Además, las fracciones enzimáticas fueron estimuladas por Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ , y fueron inhibidas por EDTA y DNP.

Debido a que la pectina no es el único compuesto presente en la pared celular de las plantas se han reportado otras enzimas que, además de las pectinolíticas, actúan sinérgicamente para degradar la pared celular de las plantas. *Aspergillus flavus* produce xilosidasas intracelulares (Yoshikawa *et al*, 1993a y 1993b), α -amilasas, xilanasas y proteasas (Brown *et al*, 2001), y muy probablemente estas intervengan en el proceso de infección.

2.2. Generalidades sobre la pared celular de plantas

La pared celular de las plantas está constituida principalmente por polisacáridos y proteínas. Los polisacáridos constituyen el 90 % de la pared celular y se dividen en tres tipos de acuerdo a su composición (de Vries and Visser, 2001). La celulosa es el principal de estos tres polisacáridos y está

formada por cadenas lineales de hasta 1200 residuos de D-glucosa unidos en posición β -1,4. Estas cadenas están ordenadas en estructuras llamadas microfibrillas (Figura 1) y su principal función es la de asegurar la rigidez de la pared celular (de Vries and Visser, 2001).

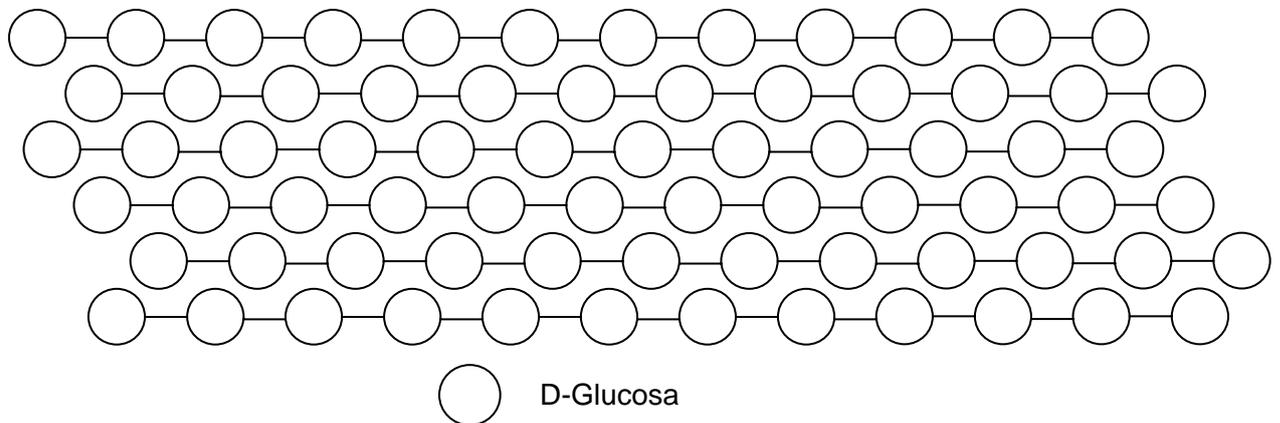


Figura 1. Representación esquemática de las microfibrillas de celulosa.

La hemicelulosa es la segunda estructura orgánica más abundante en la pared de las plantas y está compuesta por diferentes tipos de polímeros, esta composición depende del origen de la planta. Entre estos polímeros se encuentran el xilano (Figura 2), el xiloglucano (Figura 3) y el galacto(gluco)manano (Figura 4). La estructura de estos polisacáridos depende de la composición y distribución de los residuos de azúcar que contienen como son: D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa, ácido glucurónico, entre otros (de Vries and Visser, 2001). Por ejemplo, el xilano (Figura 2) es el principal polímero de la hemicelulosa en cereales y su estructura está definida por una cadena principal de residuos de D-xilosa unidos por enlaces glicosídicos en posición β -1,4 y pueden estar sustituidos por diferentes cadenas laterales con diferentes azúcares como L-arabinosa, D-galactosa, D-ácido glucurónico, grupos acetilo, feruloilo y *p*-cumaroilo (de Vries and Visser, 2001).

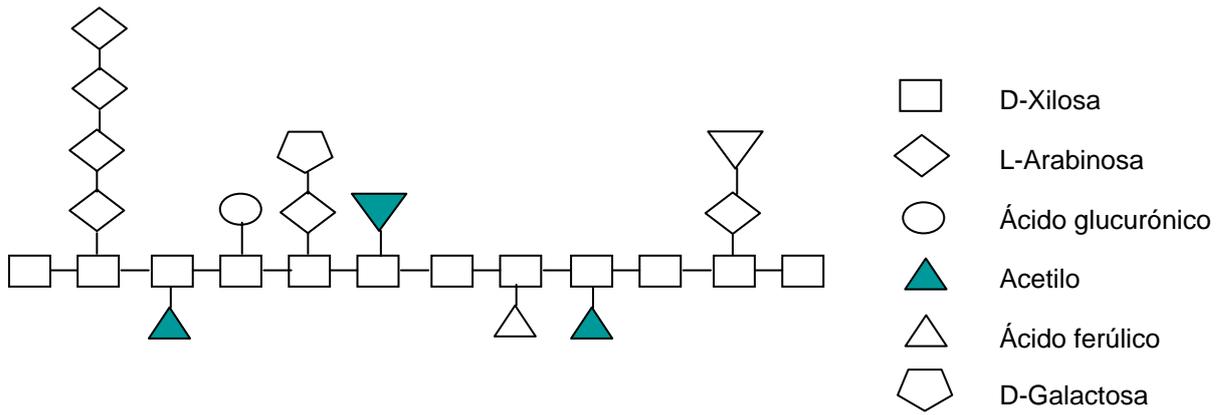


Figura 2. Representación esquemática del xilano.

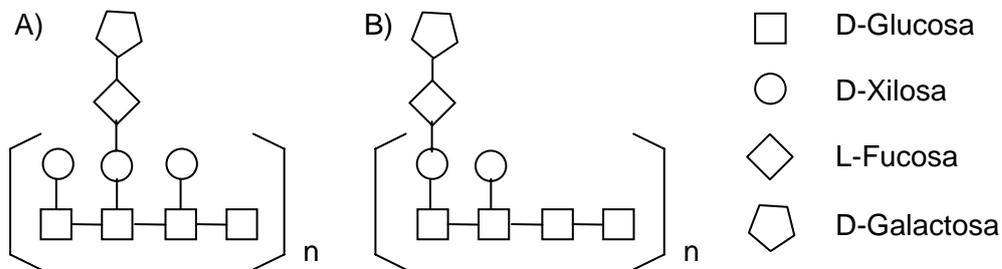


Figura 3. Representación esquemática del xiloglucano. A) unidades repetidas de tres residuos de D-glucosa sustituidos con D-xilosa en posición -1,6 seguidos de un residuo de D-glucosa sin sustitución. B) unidades de dos residuos de D-glucosa sustituidos por residuos de D-xilosa en posición -1,6 seguidos de dos residuos de D-glucosa sin sustituir.

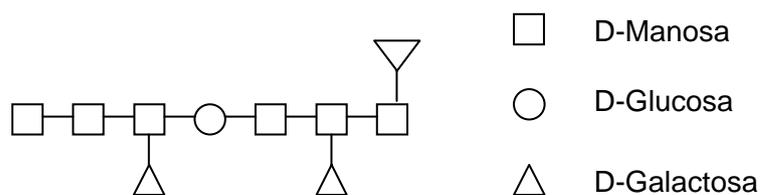


Figura 4. Esquema de la estructura del galacto(gluco)manamo.

La función estructural de los polisacáridos de la hemicelulosa es interconectar a las fibrillas de celulosa con las cadenas de polisacárido de la pectina, esto basado en la capacidad de los polisacáridos de la hemicelulosa de unir no-covalentemente a la celulosa y unir covalentemente a la pectina (Figura 5) (de Vries and Visser, 2001).

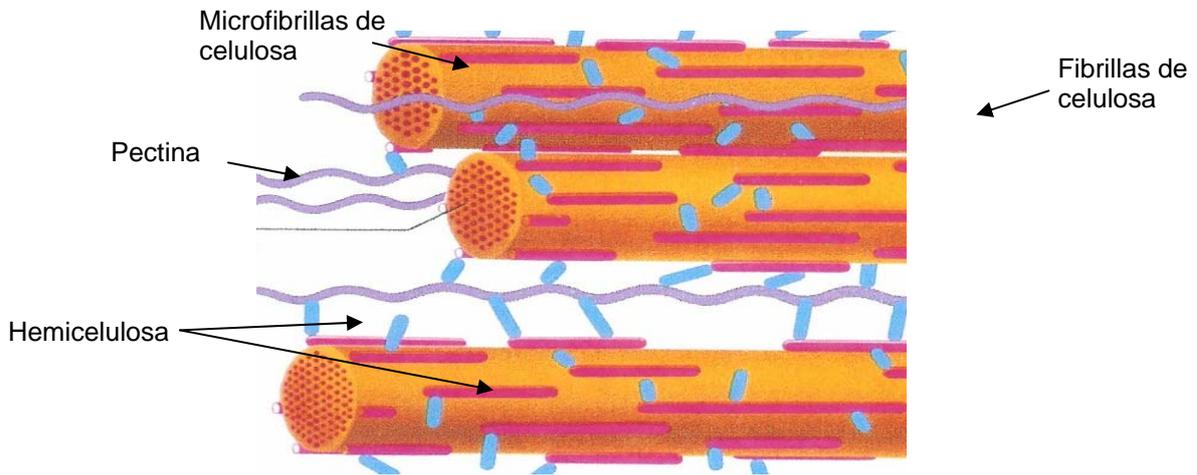


Figura 5. Esquema de la interacción de los polisacáridos de la pared celular de las plantas.

La pectina es el compuesto más abundante en la matriz de la lámina media de la pared primaria de las plantas y está casi ausente en la pared celular secundaria. Su función es la de regular la porosidad de la pared celular y la adhesión entre las células (Willats *et al*, 2001). En la estructura de la pectina se han identificado dos regiones diferentes (Figura 6). La región lisa está formada por una cadena principal de residuos de ácido D-galacturónico unidos en posición α -1,4 y pueden estar sustituidos por grupos acetilo o metoxilo. A esta región también se le conoce como homogalacturonano (HG) (de Vries and Visser, 2001). La región ramificada o “peluda”, esta formada principalmente por el ramnogalacturonano I (RGI). Este está constituido de una cadena principal de ácido D-galacturónico y la cadena está interrumpida por residuos de L-ramnosa en posición α -1,2. Los residuos de L-ramnosa están sustituidos por cadenas laterales de arabinanos y galactanos en posición O-4. El ramnogalacturonano II (RGII) es un polisacárido de aproximadamente 30 unidades con una cadena principal de residuos de ácido D-galacturónico unidos en posición α -1,4. Esta cadena principal está sustituida con cadenas

laterales de hasta 11 azúcares diferentes poco comunes como son la apiosa, el ácido acerínico, el ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico y el 2-O-metil-L-fucosa. Esta región de la pectina está muy conservada tanto en su composición como en su estructura (de Vries and Visser, 2001).

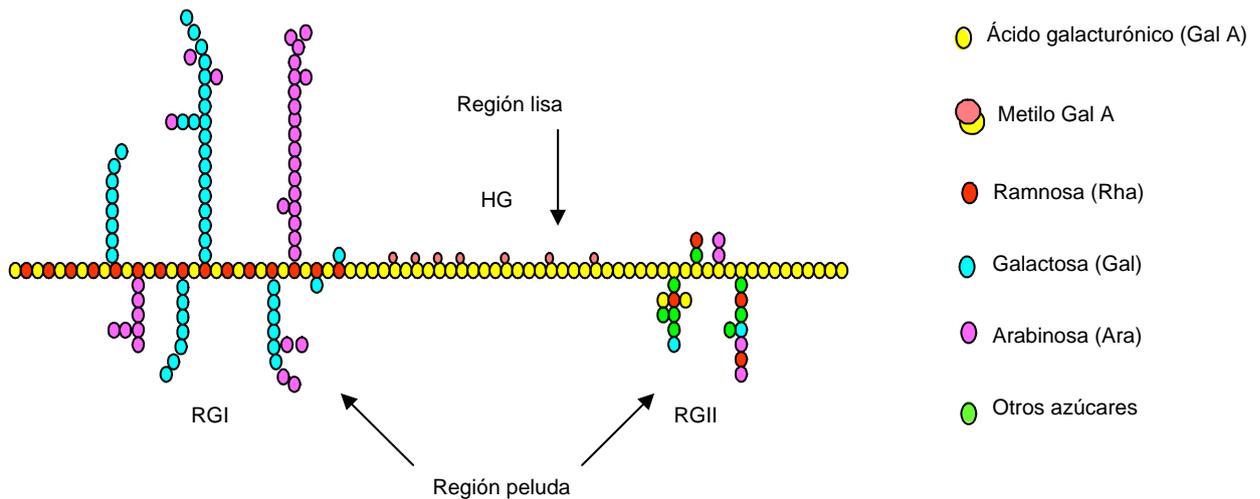


Figura 6. Esquema general de la estructura de la pectina.

2.3. Pectinasas

Las pectinasas son un grupo muy amplio y variado de enzimas que catalizan diferentes reacciones para modificar la estructura de la pectina. Estas enzimas han sido clasificadas de acuerdo a diferentes criterios. Se han clasificado en hidrolasas y liasas debido al mecanismo por el cual despolimerizan a la pectina. El mecanismo de acción de las hidrolasas (Figura 7) es mediante la adición de una molécula de agua para poder romper el enlace glicosídico. Las liasas (Figura 8) rompen el enlace glicosídico por un mecanismo de acción conocido como trans-eliminación, y se basa en la formación de una doble ligadura entre los átomos de carbono 4 y 5 de la molécula de ácido galacturónico (Lineweaver and Jansen, 1951). Otra clasificación se basa en la forma o frecuencia con la que estas enzimas rompen la molécula de pectina (frecuencia de corte) y pueden ser de tipo “exo” o

“endo”. Las enzimas de tipo “exo” (Figura 9) rompen el enlace glicosídico en el extremo reductor de la molécula de la pectina formando monómeros, dímeros y trímeros como productos finales. Las de tipo “endo” (Figura 9) tienen su sitio de corte en sitios no reductores de la molécula de pectina y generan oligómeros de entre 5 y 7 unidades, lo que ocasiona la disminución de la viscosidad de una solución de pectina (Stutzenberger, 1992 y Benen *et al*, 1999).

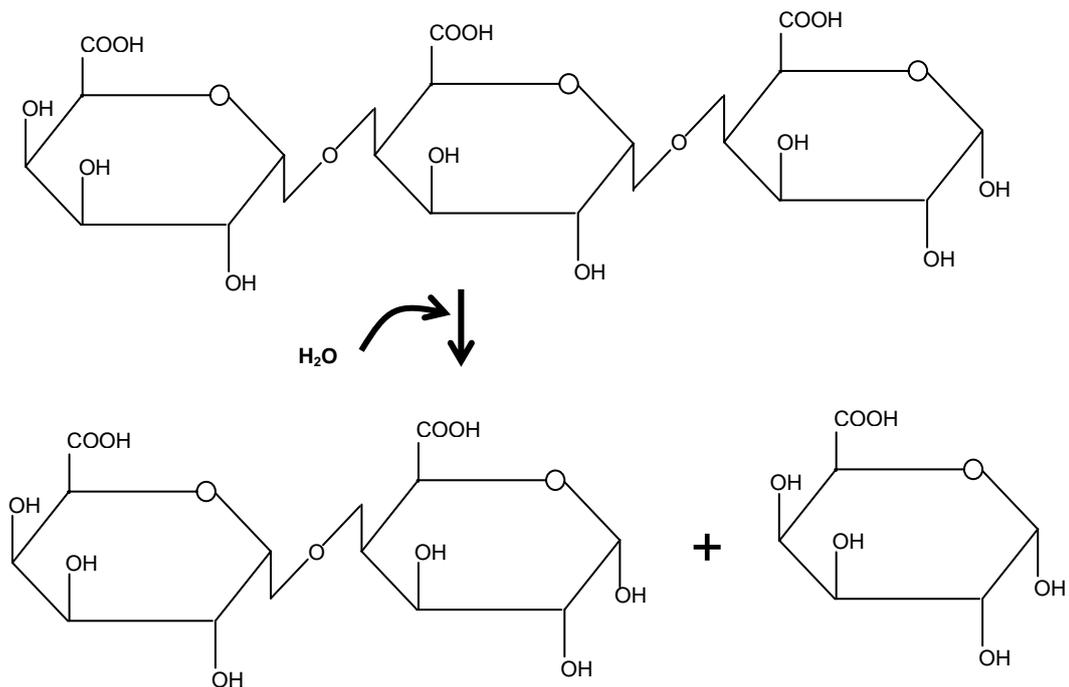


Figura 7. Mecanismo de acción de las poligalacturonasas (hidrolasas).

Las pectinasas también se clasifican de acuerdo a la región de la pectina donde actúan y pueden denominarse como: poligalacturonasas (hidrolasas y liasas) y ramnogalacturonasas (hidrolasas y liasas) (de Vries and Visser, 2001). Las enzimas que desesterifican a la región lisa de la pectina se denominan esterases y son muy importantes para la degradación eficiente de la pectina, ya que, las poligalacturonasas frecuentemente se ven inhibidas por los grupos metilo y acetilo y necesitan que estos grupos sean removidos previamente para poder actuar (de Vries and Visser, 2001y Stutzenberger, 1992).

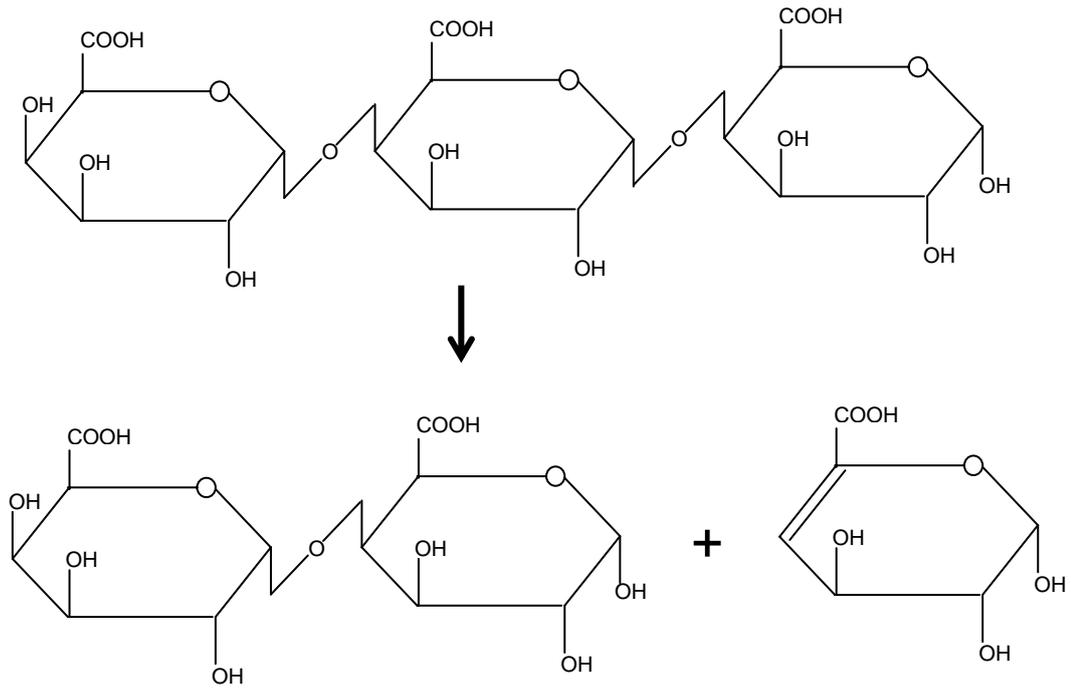


Figura 8. Mecanismo de acción de las pectin y pectatoliasa

Existe otro grupo de enzimas involucradas en la despolimerización de la pectina y son conocidas como enzimas accesorias. Estas enzimas actúan sobre las cadenas laterales de la pectina. De estas enzimas destacan las arabinasas, galactanasas, feruloil estererasas, glucuronidasas, xilosidasas, etc (de Vries and Visser, 2001).

Debido a la complejidad de la pectina, las enzimas que la degradan también pueden llegar a ser complejas en cuanto al orden en que actúan. Se ha reportado que las enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular de las plantas interactúan de una forma sinérgica para hacerlo de forma eficiente (de Vries *et al*, 2000). Esto permite pensar que los microorganismos que infectan a los tejidos vegetales no solo dependen de la producción de las enzimas pectinolíticas, si no también dependen de la producción de otras enzimas que degradan a otros polisacáridos de la pared celular son las xilanasas y las celulasas.

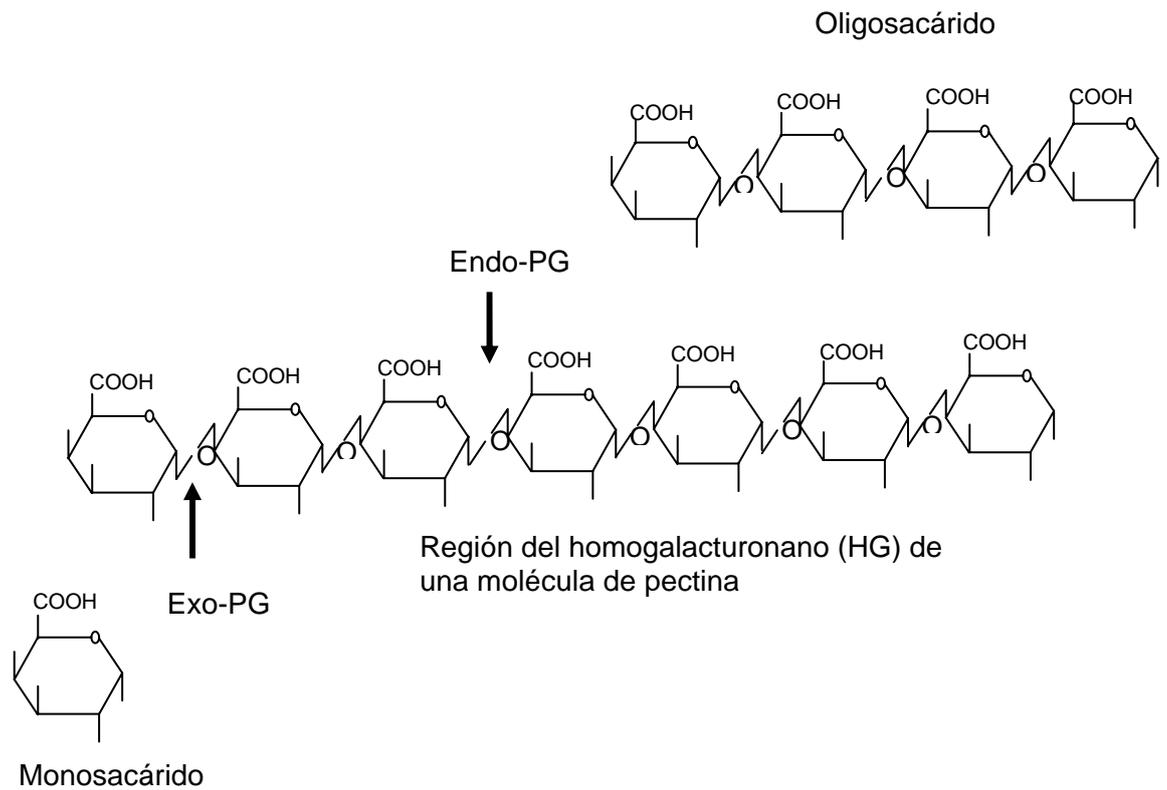


Figura 9. Representación esquemática de la frecuencia de corte de las enzimas pectinolíticas con actividad tipo "exo" y "endo".

2.4. Enzimas que degradan polisacáridos en otros patógenos de plantas

Existe mucha literatura acerca de la síntesis y regulación de las enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular de las plantas en diferentes microorganismos fitopatógenos. Uno de ellos es la bacteria *Erwinia crhythanthemi* que causa el reblandecimiento prematuro de plantas, ya sea en cultivo o en almacenamiento (Heron *et al*, 2000). Se ha reportado que esta bacteria produce dos pectinmetilesterasas, ocho isoenzimas de una pectato liasa que presentan actividad tipo endo, una exopoligalacturonato liasa y una exo-poli- α -D-galacturonosidasa (Surgey *et al*, 1996 y Shevchik *et al*, 1999). Todas estas enzimas están reguladas de diferente forma y de las cuales destaca la

regulación por el producto del gen *pecT*, que puede funcionar como represor o activador (Surgey *et al*, 1996).

Botrytis cinerea es un hongo filamentoso de color gris que infecta hasta 200 tipos diferentes de plantas, ya sea en cultivo o en almacenamiento post-cosecha. Este hongo produce seis endo-poligalacturonasas, de las cuales Bcpg 1 se producen cuando el hongo se cultiva en ácido poligalacturónico, sacarosa y extractos de plantas. Esta enzima es necesaria para una alta patogenicidad, pero no era el único factor (Have *et al*, 1998). Wubben *et al*, (1999) observó que las seis enzimas de tipo “endo” presentaban una expresión diferencial cuando el micelio, pre-crecido en un medio con glucosa, se transfería a un medio nuevo con ácido poligalacturónico o glucosa como fuente de carbono. Se observó que las enzimas Bcpg 1 y 2 se expresaron de forma constitutiva mientras que las endo-poligalacturonasas Bcpg 4 y 6 eran inducidas por ácido galacturónico (Wubben *et al*, 2000). También se observó que los valores de pH bajos también tenía un efecto positivo sobre la expresión de la enzima Bcpg 3. La expresión de la endo-PG Bcpg 4 por ácido galacturónico disminuía cuando en el medio de cultivo se encontraba una fuente de carbono más favorable (Wubben *et al*, 2000).

Botrytis cinerea, además de las endo-PG, produce dos exopoligalacturonasas (exo-PG). Una de ellas tiene una masa molecular de 66 kDa y se produjo sobre pectina cítrica y se acumuló conforme aumentó el tiempo del cultivo. La segunda, de 70 kDa, se produjo durante las primeras horas del cultivo y después desapareció, es decir, su expresión fue transitoria (Rha *et al*, 2001). Este hongo también produjo una enzima con actividad PME, la cual presentó su mayor concentración en lugares cercanos a las zonas de la infección. Esto sugiere que la actividad esterasa es importante para que *Botrytis cinera* pueda infectar a los tejidos de las plantas (Joo An *et al*, 2005).

Otro hongo fitopatógeno es *Fusarium moniliforme*, que infecta las raíces de jitomates. Este hongo produce cuatro endo-PG's con una masa molecular que varía de 38 a 48.5 kDa y están altamente glicosiladas por manosas (Carpari *et al*, 1993). Las endo-poligalacturonasas de este hongo son

susceptibles al grado de esterificación de la pectina, donde los niveles altos de esterificación disminuyen la afinidad de las enzimas por la pectina (Bonnin *et al*, 2002). Sella *et al*, (2004) encontraron que *Fusarium moniliiforme* produce una endo-PG que es insensible los mecanismos de defensa de las plantas, indicando que esta enzima es un factor de patogenicidad. Se sabe que este hongo también produce una enzima con actividad pectato liasa de bajo peso molecular pero a diferencia de las poligalacturonasas, esta enzima no está relacionada como factor de patogenicidad (Dixit *et al*, 2004).

Fusarium oxysporum produce una endo-PG de 35 kDa. Esta enzima es inducida por pectina y ácido galacturónico y reprimida por glucosa. Esta enzima (Pg5) es producida en las primeras etapa de la infección (García-Maceira *et al*, 2001). Dentro de las enzimas que degradan la pared celular de las plantas, producidas por *Fusarium oxysporum*, se han identificado dos endo-xilanasas, las cuales son inducidas por xilano y sujetas a represión catabólica. La endo-xilanasas Xyl4 se produce diferencialmente por la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, esto cuando se utiliza una fuente de carbono inductora. La interrupción del gen *xyl4* no redujo el grado de virulencia del hongo, por lo cual la enzima no es esencial para la virulencia (Gómez-Gómez *et al*, 2002), lo cual no indica que esta enzima no cumpla un papel importante en el proceso de infección.

Colletotrichum lindemuthianum, un patógeno del frijol, produce dos endo-PG's (CLPG1 y CLPG2). La primera es secretada al medio cuando este hongo se cultiva sobre pectina. La segunda es una enzima asociada a la pared celular que se acumula cuando *Colletotrichum* crece sobre pectina y sobre tejidos vegetales (Herbert *et al*, 2004).

Aspergillus niger es un hongo saprófito conocido por su capacidad de producir y secretar una gran variedad de enzimas que degradan la pared celular de las plantas. Se ha reportado que *A. niger* expresa hasta 26 diferentes genes pectinolíticos (de Vries *et al*, 2002). Dentro del género *Aspergillus* se ha reportado la producción, regulación, purificación y caracterización de las enzimas que degradan la pectina. Estas enzimas en general son inducidas por

pectina y sus productos de degradación (de Vries and Visser, 2001). También son sintetizadas diferencialmente de acuerdo al sustrato y al tiempo en el que deben de actuar para degradar eficientemente los polisacáridos de la pared celular de plantas (de Vries *et al*, 2000, 2001 y 2003). En este contexto, llama la atención encontrar en la literatura que para *Aspergillus flavus* solo se han reportado tres enzimas con actividad poligalacturonasa, una con actividad pectinmetilesterasa (Cleveland and McCormick, 1987) y un complejo enzimático que, al parecer, presenta actividad pectato liasa (Famurewa *et al*, 1993). Mientras que para *Aspergillus niger* se ha reportado la expresión de hasta 26 genes que codifican para enzimas pectinolíticas (Parenicová *et al*, 2000 y de Vries *et al*, 2002). Dada la semejanza filogenética de estas dos especies de *Aspergillus* permite pensar que *A. flavus* puede ser capaz de producir enzimas que degradan la pectina diferentes a las ya reportadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo de este trabajo es identificar y comparar las pectinasas extracelulares producidas por dos cepas de *Aspergillus flavus*.

3.2. Objetivos específicos

1) Evaluar el efecto del pH inicial y la temperatura de incubación sobre la producción de pectinasas por dos cepas de *Aspergillus flavus*.

2) Evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de pectinasas por dos cepas de *Aspergillus flavus*.

3) Evaluar el efecto del tipo de inóculo sobre la producción de pectinasas por dos cepas de *Aspergillus flavus*.

4) Comparar bioquímicamente las pectinasas extracelulares producidas por dos cepas de *Aspergillus flavus*.

4. HIPÓTESIS

Se ha reportado que hongos como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, este último relacionado filogenéticamente con *Aspergillus flavus*, son capaces de producir una gran batería de enzimas pectinolíticas en diferentes condiciones de cultivo y dado que estas condiciones influyen en el tipo de enzimas producidas, si se se cultiva a *A. flavus* de forma sistemática en diferentes condiciones de cultivo y fuentes de carbono, entonces será posible determinar el potencial de este hongo para producir enzimas pectinolíticas diferentes a las reportadas para este microorganismo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *Aspergillus flavus*, CECT 2687 y NRRL 6541. Las cepas fueron mantenidas en agar papa-dextrosa a 4 °C y resemebradas cada dos meses.

5.2. Desarrollo de inóculo

Los experimentos en medio líquido fueron inoculados con una suspensión de esporas a una concentración final de 1×10^6 esporas por mililitro de medio de cultivo. Los experimentos en medio sólido se inocularon con 1×10^4 esporas por aplicación. Las esporas fueron cosechadas a partir de la resiembra de las cepas después de 72 h de incubación a 37°C. Para la cosecha se usó una solución salina (NaCl; 0.9%, p/v) con tween 20 (0.1%, v/v) estéril para resuspenderlas. La concentración de esporas se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

5.3. Experimentos de transferencia de micelio

Para estos experimentos los medios de cultivo se inocularon con aproximadamente 0.5 mg en peso seco de micelio vegetativo por cada mililitro de medio. El micelio vegetativo fue propagado en medio basal (ver Tabla I) que contenía glucosa (1%, p/v) y extracto de levadura (0.1%, p/v). El micelio fue recuperado después de 18 h de fermentación y fue lavado tres veces con solución salina estéril y fría.

5.4. Medios y condiciones de cultivo

Los experimentos en medios sólidos se llevaron a cabo en agar papa-dextrosa y se inocularon con la aplicación de veinte puntos diferentes distribuidos en la placa. Las cajas de petri inoculadas se incubaron a 28, 37, 45 y 50°C. Las cajas a 45 y 50 °C se incubaron en una cámara húmeda para evitar la deshidratación del agar.

Los experimentos en medio líquido se llevaron a cabo utilizando medio basal (Tabla I) y la fuente de carbono correspondiente a una concentración de 1% (p/v). Las diferentes condiciones de cultivo que se utilizaron en este trabajo se muestran en la Tabla II. Las distintas fuentes de carbono que se utilizaron fueron: glucosa (Glc), pectina (P), ácido poligalacturónico (APG), ácido galacturónico (AG), xilosa (Xyl), galactosa (Gal), arabinosa (Ara) y ramnosa (Rha). Todos los experimentos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo a una velocidad de agitación de 200 rpm.

Tabla I. Composición del medio basal (MB).

$\text{NH}_4(\text{SO})_2$	0.5% (p/v)
KH_2PO_4	0.2% (p/v)
K_2HPO_4	0.2% (p/v)

Tabla II. Condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo.

pH inicial (pHo)	Temperatura de incubación (°C)	Fuente de carbono	Tipo de inóculo
3.0	28	Pectina	Esporas
4.5	28	Pectina	Esporas
6.0	28	Pectina	Esporas
3.0	37	Pectina	Esporas
4.5	37	Pectina	Esporas
6.0	37	Pectina	Esporas
6.0	37	Glc, P, APG, AG, Xyl, Gal, Ara y Rha.	Esporas
6.0	37	Glc, P, APG y GA	Micelio vegetativo

5.5. Determinación de crecimiento celular

El crecimiento celular se determinó como peso seco. Las muestras se filtraron a través de membranas Millipore de 5 μm de diámetro de poro, prepesadas y a peso constante. La biomasa retenida en la membrana se secó a 80 °C durante 24 h. El peso seco se calculó con la diferencia de pesos entre las membranas con muestra y la membrana sin muestra. El filtrado libre de células se refrigeró para su posterior análisis.

5.6. Determinación de grupos reductores

Los grupos reductores se determinaron usando el método de DNS (Miller, 1959). En un tubo de ensayo se adicionaron 0.1 mL del filtrado libre de células y fueron diluidos con 0.9 mL de agua destilada. A esta solución se le adicionaron 2 mL del reactivo de DNS y se mezcló perfectamente. El tubo con la mezcla se colocó en un baño María a ebullición durante 5 minutos. Después de este tiempo, el tubo se enfrió y se diluyó con 5 mL agua destilada. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 575 nm. Los productos de degradación de la pectina se expresaron como equivalentes de ácido D-galacturónico. La concentración de los demás azúcares se calculó utilizando una curva estándar de glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y ramnosa, respectivamente.

5.7. Determinación de la actividad exo-pectinolítica

La actividad exo-pectinolítica se determinó por la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática. La mezcla de reacción consistió de 0.5 mL de una solución de pectina (1%, p/v) en agua destilada, 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM a pH 5.0 y la reacción se inició con la adición de 0.1 ml de filtrado libre de células. La reacción se incubó durante 20 min a 45°C. La reacción se detuvo adicionando 2 ml de reactivo DNS y se midieron los grupos reductores (*ver determinación de grupos reductores*) producidos por la degradación de la pectina. El blanco se preparó de la misma forma que la muestra pero la reacción se detuvo con el reactivo de DNS antes de adicionar el filtrado libre de células. La actividad se expresó en

unidades enzimáticas (U) definidas como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de ácido D-galacturónico en las condiciones de ensayo.

5.8. Determinación de actividad endo-pectinolítica

La actividad endo-pectinolítica se determinó midiendo la disminución de la viscosidad de 10 mL de una solución de pectina (1%, p/v) en solución amortiguadora de acetatos 100 mM a pH 4.2 con NaCl (0.03%, p/v), utilizando un viscosímetro de Oswald. La reacción se inició adicionando 0.5 mL de filtrado libre de células a la solución de pectina. Todo el sistema se incubó a 30°C. La actividad se expresó en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima que reduce la viscosidad relativa en un 50% de la solución de pectina en las condiciones de ensayo.

5.9. Determinación de actividad pectin liasa

La actividad pectin liasa se determinó siguiendo el incremento en la absorbancia a 235 nm debido a la formación de una doble ligadura entre el átomo de carbono cuatro y cinco del ácido D-galacturónico (ver Figura 8). La mezcla de reacción consistió de 0.5 mL de solución de pectina (1%, p/v) a pH 5.7 y 0.5 mL de solución amortiguadora tris-acetatos 100 mM a pH 9.5 con CaCl (24 mM). El valor final de pH de la mezcla de reacción fue de 8.8. La reacción se inicio con la adición de 0.2 mL de filtrado libre de células y se incubó por una hora a 40 °C. La reacción se detuvo tomando una alícuota de 0.2 mL del tubo de reacción y adicionándola a 1.8 mL de HCl (10 mM). El blanco se preparó de la misma forma pero la reacción se detuvo al tiempo cero. La actividad se expreso en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima necesaria para forma un μmol de producto por minuto de reacción.

5.10. Determinación de estabilidad al pH de la actividad pectin liasa

La estabilidad al pH del filtrado libre de células con actividad pectin liasa se llevo acabo incubando 200 μL del filtrado con 800 μL de la solución

amortiguadora correspondiente a pH de entre 3.0 y 9.0, con un intervalo entre cada valor de 1.0. La solución amortiguadora de citrato-NaOH (200 mM) se utilizó para el intervalo de pH de 3.0 a 6.0. La solución amortiguadora tris-citrato (200 mM) se utilizó para el intervalo de pH de 7.0 a 9.0. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 24 h. Después del periodo de incubación, se realizó el ensayo de actividad pectin liasa para determinar la actividad residual (ver determinación de actividad pectin liasa). El control consistió en el filtrado enzimático diluido con agua destilada en el momento del ensayo enzimático, a la misma proporción.

5.11. Determinación de pH óptimo de la actividad pectin liasa

El pH óptimo de la actividad pectin liasa en el filtrado libre de células se determinó utilizando el mismo intervalo de pH utilizado para determinar la estabilidad. La actividad pectin liasa se determinó como se describe anteriormente en la metodología. El 100% de actividad se refirió a la mayor actividad obtenida en los ensayos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Crecimiento en medio sólido

Las cepas de *Aspergillus flavus* fueron cultivadas en agar papa-dextrosa a 28, 37, 45 y 50°C. Se observó que a 28 y 37°C las dos cepas presentaron claras diferencias morfológicas (Figura 10). A temperaturas mayores de 37°C ninguna de las cepas fue capaz de crecer. Araujo y Gonçalves-Rodrigues (2004) mencionan que la temperatura influye sobre la eficiencia de germinación. Ellos observaron que, para 34 cepas diferentes, la eficiencia de germinación de las esporas de *A. flavus* disminuye hasta 45% a 41°C, respecto a la eficiencia de germinación a 37°C.

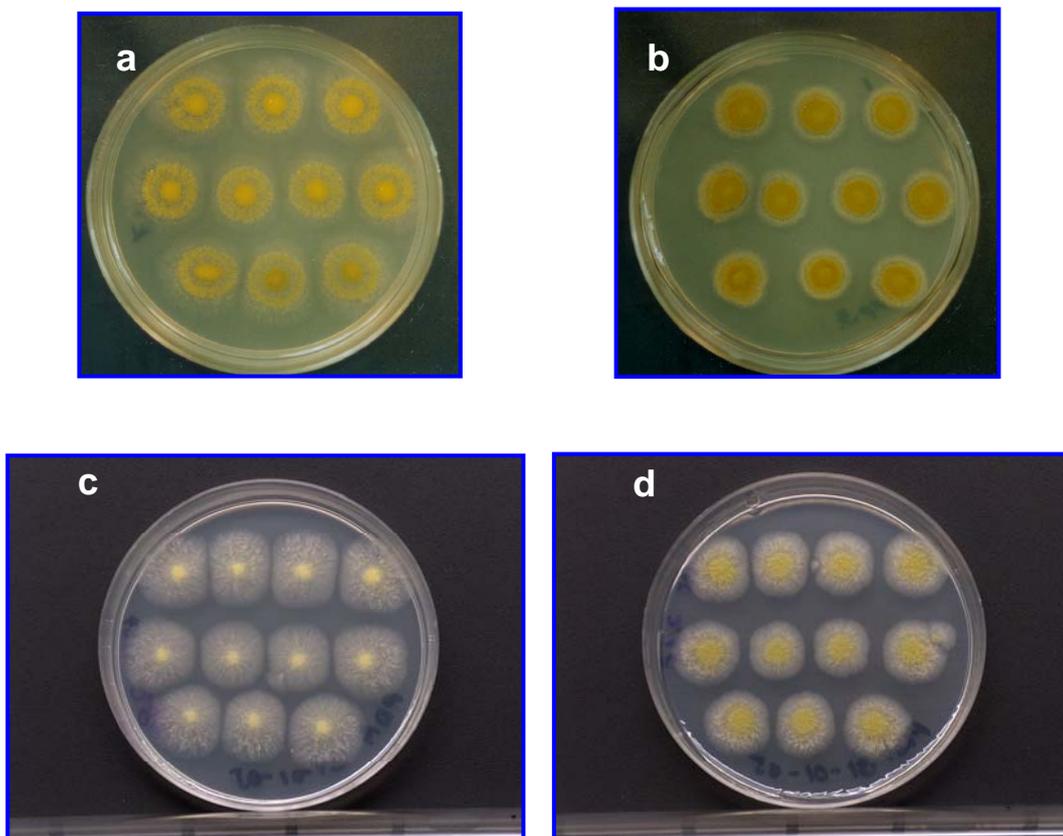


Figura 10. Efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* en medio sólido. a y b) *A. flavus* NRRL-6541 y *A. flavus* CECT-2687 a 28°C, respectivamente y c y d) *A. flavus* NRRL-6541 y *A. flavus* CECT-2687 a 37°C, respectivamente.

Las dos cepas de *Aspergillus flavus* crecieron mejor a 28°C que a 37°C (Tabla III), pero la cepa *A. flavus* CECT-2687 creció 1.13 y 1.22 veces más rápido que la cepa NRRL-6541 a 28 y 37°C, respectivamente (Tabla III). También se observó que la velocidad de extensión radial de ambas cepas presentó una cinética de tipo lineal en el intervalo de tiempo probado (Figura 11).

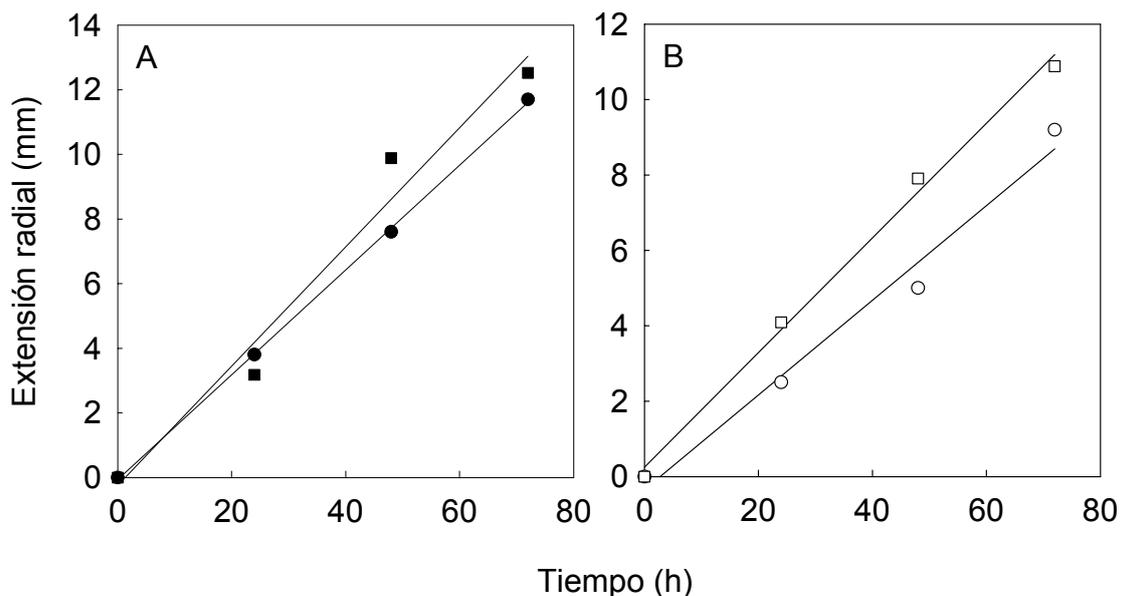


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Aspergillus flavus* en medio sólido (agar papa-dextrosa). A) (●) *A. flavus* NRRL-6541 y (■) *A. flavus* CECT-2687 a 28 °C y B) (○) *A. flavus* NRRL-6541 y (□) *A. flavus* CECT-2687 a 37 °C.

Tabla III. Crecimiento de *Aspergillus flavus* en medio sólido (Agar papa-dextrosa).

Cepa/Temperatura	Velocidad de extensión radial (mm/h)	
	28 °C	37 °C
NRRL-6541	0.162	0.125
CECT-2687	0.184	0.152

6.2. Efecto del pH y la temperatura

6.2.1. Crecimiento celular

En medio líquido con pectina como fuente de carbono, la mejor temperatura para el crecimiento de la cepa CECT-2687 fue 37°C a pHo de 3.5 y 6.0, mientras que a pHo de 4.5 la mejor temperatura fue 28°C (Tabla IV). La cepa NRRL-6541 no presentó grandes diferencias de crecimiento cuando se cultivo a diferentes valores de pH inicial, entre 3.0 y 6.0, a 28 y 37°C.

Tabla IV. Crecimiento celular de cepas de *A. flavus* en pectina.

pHo	Crecimiento máximo en peso seco (mg mL ⁻¹)			
	CECT-2687		NRRL-6541	
	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C
3.5	4.19 (72)	4.48 (72)	3.27 (72)	3.24 (72)
4.5	4.98 (72)	4.26 (48)	3.04 (72)	2.95 (48)
6.0	5.8 (72)	6.6 (72)	3.27 (48)	3.42 (72)

Los valores entre paréntesis representan el tiempo en horas al cual se alcanzó el crecimiento máximo.

Se ha reportado que cuando aumenta la temperatura también aumenta la eficiencia de germinación de las esporas de *Aspergillus flavus*, desde 5% a 20°C hasta casi 35% a 37°C (Araujo y Gonçalves-Rodrigues 2004). A temperaturas de 45 y 50°C no se observó crecimiento en el medio de cultivo. Estos resultados son congruentes con resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, donde las esporas de una cepa termotolerante de *Aspergillus* sp. germinaron entre 6-8 h a 37°C, mientras que a 45°C la germinación se retrasó hasta las 20 h (Mendicuti *et al*, 1997). En el caso de las esporas de *Aspergillus flavus* se ha reportado que la germinación se ve inhibida a temperaturas mayores de 40°C (Araujo y Gonçalves-Rodrigues 2004).

A 28°C y pHo 6.0, el crecimiento de la cepa CECT-2687 aumentó 40% respecto al crecimiento obtenido a pHo 3.5 y 15% respecto al crecimiento a pHo 4.5. A 37°C el crecimiento de esta misma cepa aumento 47% más respecto a pHo 3.5 y 55% más respecto a pHo 4.5 (Tabla IV). Estos resultados

indican que el efecto del pH sobre el crecimiento de la cepa CECT-2687 se potencializa a 37°C, comparado con el crecimiento obtenido a 28°C.

Cuando *Aspergillus flavus* se cultiva en pectina, el crecimiento de la cepa CECT-2687 mejora con valores de pH cercanos a la neutralidad (Tabla VI). Trejo-Aguilar *et al.* (1996) reportaron que en pectina como sustrato a 30°C, la cepa *Aspergillus* FP-180 creció 33% más a pH 5.5 respecto a pH 3.5. A 37°C la misma cepa creció 81% más a pH 5.5 respecto a lo obtenido a pH 3.5. También reportaron que a 30°C la cepa *A. niger* N-402 creció bien (3.2 mg de peso seco mL⁻¹) independiente del pH del medio de cultivo pero a 37°C creció 60% más a pH 5.5 respecto al crecimiento obtenido a pH 3.5. Aguilar *et al.* (1991) también mencionan que el crecimiento de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 en pectina a 37°C, aumentó cuando el pH inicial del medio de cultivo fue de 5.7, esto respecto al crecimiento que observaron a valores de pH ácidos (pH 2.5 y 3.5).

6.2.2. Actividades pectinolíticas

Al cultivar las cepas de *Aspergillus flavus* en pectina como fuente de carbono, a diferentes temperaturas y valores de pH inicial, se identificaron dos actividades pectinolíticas diferentes; la actividad exo-pectinolítica y la actividad pectin liasa. La cinética de producción de actividad exo-PG se presenta en la figura 13 y 14. En la figura 13 se puede observar que a pH 6.0 y 28°C la cepa NRRL-6541 produjo 1.66 veces más actividad exo-PG comparado con la cepa CECT-2687, a las mismas condiciones. También se observa que para ambas cepas a pH 4.5 la mejor temperatura fue 37°C, contrario a lo que se observa a pH 3.5 y 6.0. En esta condición la cepa NRRL-6541 y CECT-2687 produjeron 6.2 y 1.6 veces más actividad, respectivamente, comparado con la actividad exo-PG obtenida a pH 4.5 y 28°C. A pH 3.5 los valores de esta actividad fueron muy semejantes entre las dos cepas a las dos temperaturas probadas (Figura 13A y B).

En la mayoría de las condiciones, la producción de la actividad exo-PG específica de la cepa NRRL-6541 se detuvo después de las 24 h de iniciado el

cultivo y excepto en una condición, la producción de la actividad exo-pectinolítica continuo hasta las 72 h (Figura 14A). Este resultado indica que a pH 6.0 y 28°C la producción de la actividad exo-PG esta asociada al crecimiento. En el caso de la cepa CECT-2687, la producción de esta actividad se detiene a partir de las 24 h bajo todas las condiciones probadas (Figura 14B). La disminución de la actividad exo-PG específica a partir de las 24 h, para las dos cepas de *A. flavus*, coincide con la disminución del pH del medio de cultivo a valores cercanos a 4.0 (Figura 14C). Esto sugiere que la síntesis y/o secreción de esta actividad esta fuertemente regulada por el cambio de pH del medio de cultivo a lo largo del tiempo de fermentación. Nuestros resultados son diferentes a los reportados para otras cepas de *Aspergillus* en pectina como sustrato. Trejo-Aguilar *et al.* (1996) reportaron que la cepa *Aspergillus* FP-180 produce 2.7 veces más actividad exo-PG a pH 2.5 que a pH 6.5 a 30°C y 5 veces más a 37°C. También se ha reportado que la cepa *Aspergillus* CH-Y-1043 produce los máximos niveles de actividad exo-PG a valores de pH inicial ácidos (pH 2.5-3.5) (Aguilar *et al.* 1991). Los resultados de estos autores también indican que la producción de actividad exo-PG está asociada al crecimiento de la cepa, principalmente a valores de pH 5.2.

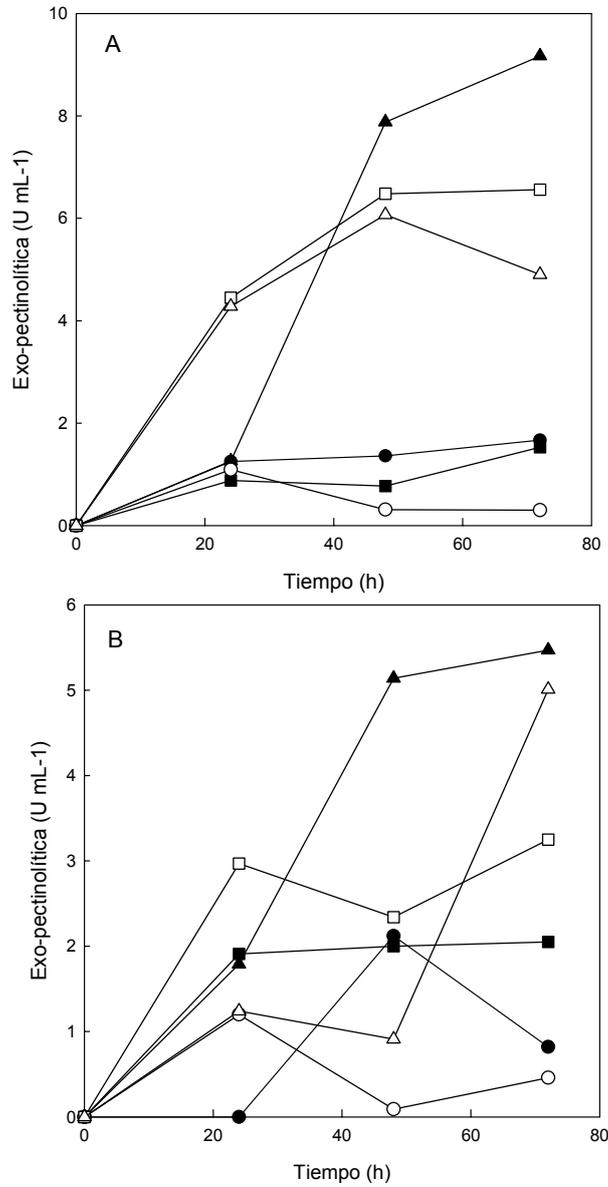


Figura 12. Cinética de producción de actividad exo-pectinolítica volumétrica de *Aspergillus flavus* en pectina como fuente de carbono. A) NRRL-6541 y B) CECT-2687. (●, ■, ▲) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 28°C y (○, □, Δ) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 37°C.

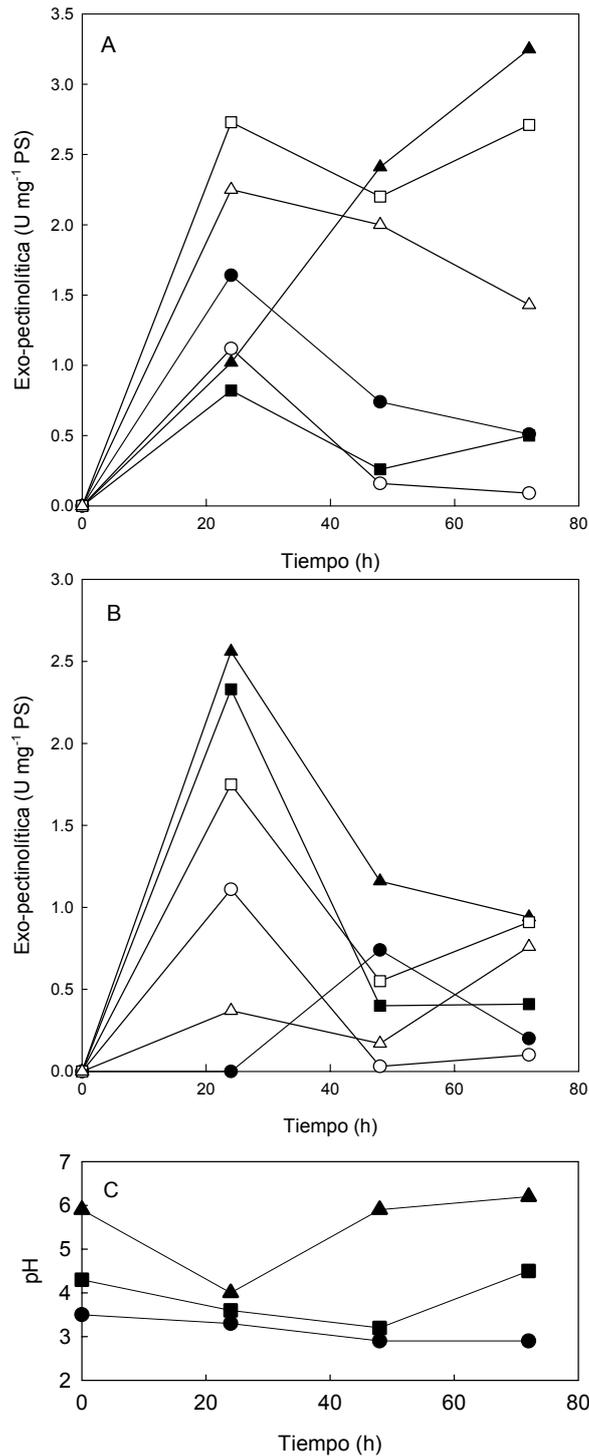


Figura 13. Cinética de producción de actividad exo-pectinolítica específica de *Aspergillus flavus* en pectina como fuente de carbono. A) NRRL-6541, B) CECT-2687 y C) evolución típica del pH del medio de cultivo. (●, ■, ▲) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 28°C y (○, □, Δ) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 37°C.

En pectina como fuente de carbono la cepa *Aspergillus flavus* NRRL-6541 fue la única que produjo actividad pectin liasa. En este caso, la

producción de esta actividad presentó un perfil muy semejante al perfil de producción de actividad exo-PG y además la producción de esta actividad está asociada al crecimiento en una sola condición, pH 6.0 y 28°C (Figura 15). Al parecer esto también podría estar asociado a los cambios del pH del medio de cultivo durante la fermentación (Figura 14C).

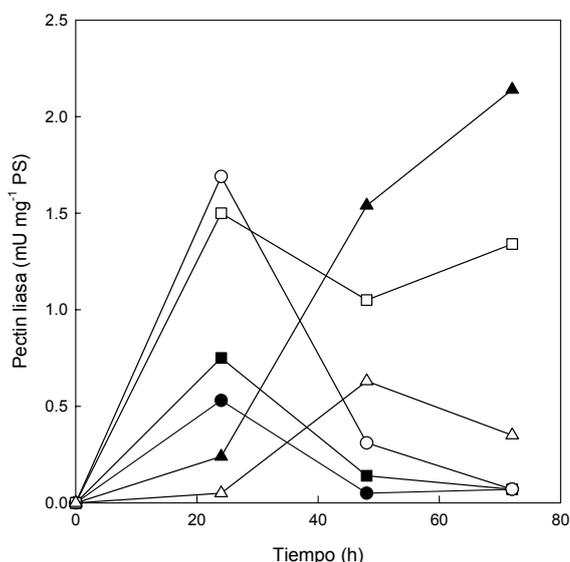


Figura 14. Cinética de producción de actividad pectin liasa específica de la cepa *Aspergillus flavus*.NRRL-6541 en pectina como fuente de carbono. (●, ■, ▲) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 28°C y (○, □, △) pH inicial 3.5, 4.5 y 6.0, respectivamente, a 37°C.

La presencia de actividad exo-PG ya ha sido reportada para cepas de *Aspergillus flavus* y se observó que estas enzimas son inducidas por sustancias que contienen pectina y reprimidas por glucosa (Cleveland and McCormick, 1987). Estos investigadores reportaron la presencia de una enzima con actividad poligalacturonasa de tipo endo, que fue inducida por pectina pero no fue reprimida por glucosa. En el presente trabajo, bajo las condiciones de cultivo probadas, no se identificó la actividad de tipo endo para ninguna de las dos cepas de *Aspergillus flavus*. La deficiencia en la producción de la enzima P2c ha sido asociada a cepas poco virulentas y la frecuencia de este tipo de cepas indica una adaptación a nichos ecológicos donde esta actividad no es necesaria (Cottty *et al.*, 1990).

La actividad pectin liasa en cepas de *Aspergillus flavus* no ha sido claramente demostrada. Cleveland y McCormick (1987) reportaron que en medio líquido con pectina como sustrato no se produjo actividad pectin liasa. Cabe señalar que en estos experimentos los cultivos líquidos se realizaron sin agitación, por lo que el cultivo pudo verse limitado por oxígeno. Se ha reportado que la producción de la actividad pectin liasa de otros microorganismos, como *Penicillium griseoroseum*, se incrementa cuando se incrementan los niveles de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, debido al aumento de la velocidad de agitación y aireación (Piccoli-Valle *et al.*, 2003). Sin embargo, Famurewa *et al.* (1993) reportaron la presencia de un complejo pectinolítico con actividad de tras-eliminación en cultivos líquidos de *Aspergillus flavus*, utilizando pectina como fuente de carbono. No es claro si la presencia de este tipo de actividad se debe a la diferencia entre las cepas de *Aspergillus flavus* o las condiciones bajo las cuales fueron cultivadas, ya que en este último reporte no se indican las condiciones de agitación en las que se incubaron los matraces.

Las pectin liasas son enzimas que han sido ampliamente reportadas para otras especies de *Aspergillus*, de entre las cuales destacan *A. niger* y *A. oryzae* (Benen *et al.*, 2000, Kitamoto *et al.*, 2001a y 2001b). Delgado *et al.* (1993) reportaron que *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 produjo actividad pectin liasa en cultivo sumergido con pectina como fuente de carbono a 37°C. Pero a diferencia de lo que se observó para las cepas de *A. flavus* utilizadas en este trabajo, la actividad pectin liasa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 se produjo mejor a pHo de 3.5.

6.3. Efecto de la fuente de carbono

6.3.1. Crecimiento celular

Las dos cepas de *Aspergillus flavus* fueron cultivadas en medio basal con diferentes fuentes de carbono (10 g/L) a pH inicial de 6.0 y 37°C. Nuestros resultados indican que las cepas de *A. flavus*, contrario a lo que se pensaría normalmente, crecen mejor en polisacáridos que en azúcares sencillos como la glucosa y la xilosa (Tabla V), siendo la pectina y el ácido poligalacturónico las mejores fuentes de carbono para el crecimiento.

Tabla V. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento máximo de *A. flavus*.

Fuente de carbono	Peso seco (mg mL ⁻¹)	
	<i>A. flavus</i> NRRL-6541	<i>A. flavus</i> CECT-2687
Glucosa	0.620 (72)	0.2 (72)
Ácido galacturónico	0.180 (72)	0.16 (72)
Ácido poligalacturónico	1.32 (48)	1.32 (48)
Xilosa	0.140 (72)	0.160 (24)
Galactosa	0.160 (48)	0.180 (72)
Arabinosa	0.140 (24)	0.1 (24)
Ramnosa	1.040 (72)	0.58 (72)
Pectina	3.42 (72)	6.6 (72)

*Los valores entre paréntesis indican el tiempo al cual se alcanzó el crecimiento máximo.

A pesar del poco crecimiento que se obtuvo en fuentes de carbono sencillas, el consumo de los sustratos fue considerable (Tabla VI). Esto indica que las dos cepas de *A. flavus* son capaces de incorporar los azúcares pero no se ve reflejado en el crecimiento celular. Por ejemplo para glucosa y ácido galacturónico, el rendimiento de biomasa respecto al sustrato fue de 0.167 y 0.027 g_{biomasa}/g_{sustrato}, respectivamente, para la cepa NRRL-6541 y de 0.057 y 0.028 g_{biomasa}/g_{sustrato}, respectivamente, para la cepa CECT-2687.

Tabla VI. Consumo de sustratos por cepas de <i>Aspergillus flavus</i> .		
Fuente de carbono	Sustrato consumido a las 72 h (%)	
	NRRL-6541	CECT-2687
Glucosa	37	35
Ácido galacturónico	66	57
Xilosa	31	59
Galactosa	8	26
Arabinosa	31	24
Ramnosa	46	46

Hasta el momento no se sabe cual es la causa de estos resultados. Idealmente se esperaría que el consumo de una fuente favorable como la glucosa o la xilosa diera rendimientos de biomasa respecto al sustrato de 0.15-0.45 $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ (Goudar *et al.*, 1999, Favela-Torres *et al.*, 1998, McIntyre y McNeil, 1997) y contrario a eso, los rendimientos obtenidos en este trabajo son muy bajos comparados con los reportados en la literatura. Hasta el momento esto podría ser atribuido a que el medio de cultivo que se utilizó para cultivar las cepas de *A. flavus* es un medio muy pobre en nutrientes (ver materiales y métodos), mientras que la mayoría de los medios reportados para el crecimiento de cepas del género *Aspergillus* son suplementados, además de la fuente de carbono, con extracto de levadura como fuente de energía y nitrógeno (Wittenveen y Visser, 1995., Cui *et al.*, 1998.). Lo anterior es consistente con lo que se ha observado en nuestro laboratorio. La adición de extracto de levadura (1 g/L) a los medios de cultivo con glucosa como fuente de carbono, promueve el crecimiento de las cepas de *A. flavus* dando rendimientos de aproximadamente 0.33 $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ (datos no reportados).

6.3.2. Actividades pectinolíticas

El efecto de la fuente de carbono sobre la producción de la actividad exo-PG de las dos cepas de *Aspergillus flavus*, a pH inicial de 6.0 y 37°C, se muestra en la figura 16. La cepa NRRL-6145 produjo mayor actividad exo-PG que la cepa CECT-2687. Para ambas cepas, la mayor actividad se obtuvo en ácido galacturónico (24 y 17 U/mg PS para la cepa NRRL-6541 y CECT-2687,

respectivamente). Los azúcares sencillos como la xilosa, la galactosa, la arabinosa y la ramnosa indujeron la producción de esta actividad, pero en menor nivel que el ácido galacturónico, la pectina y el ácido poligalacturónico. Para las dos cepas de *A. flavus*, la actividad exo-PG no se produjo en glucosa, lo cual indica que esta actividad esta dada por una enzima(s) sujetas a represión por carbono. Se sabe que en la represión por carbono, en el género *Aspergillus*, la glucosa y la xilosa son las fuentes de carbono que presentan mayor capacidad de represión, mientras que azúcares como la fructosa, maltosa, manosa, arabinosa y galactosa son considerados como represores intermedios (Ruijter y Visser, 1997). En general, se ha reportado que los productos de la degradación de la pectina (ácido galacturónico, galactosa, arabinosa y ramnosa) son potenciales inductores de sistemas enzimáticos complejos como el pectinolítico y el xilanolítico (de Vries y Visser, 2001).

Es de resaltar que cuando se utilizó ácido galacturónico como fuente de carbono el crecimiento celular de las dos cepas fue muy bajo, pero la actividad exo-PG producida fue muy alta comparado con la actividad que se obtuvo en pectina (24 y 17 U/mg PS en ácido galacturónico y 2.3 y 0.8 U/mg PS en pectina, para la cepa NRRL-6541 y CECT-2687, respectivamente). Esto podría indicar que este carbohidrato, que es el componente mayoritario de la pectina, es el inductor de la síntesis de esta y otras actividades pectinolíticas.

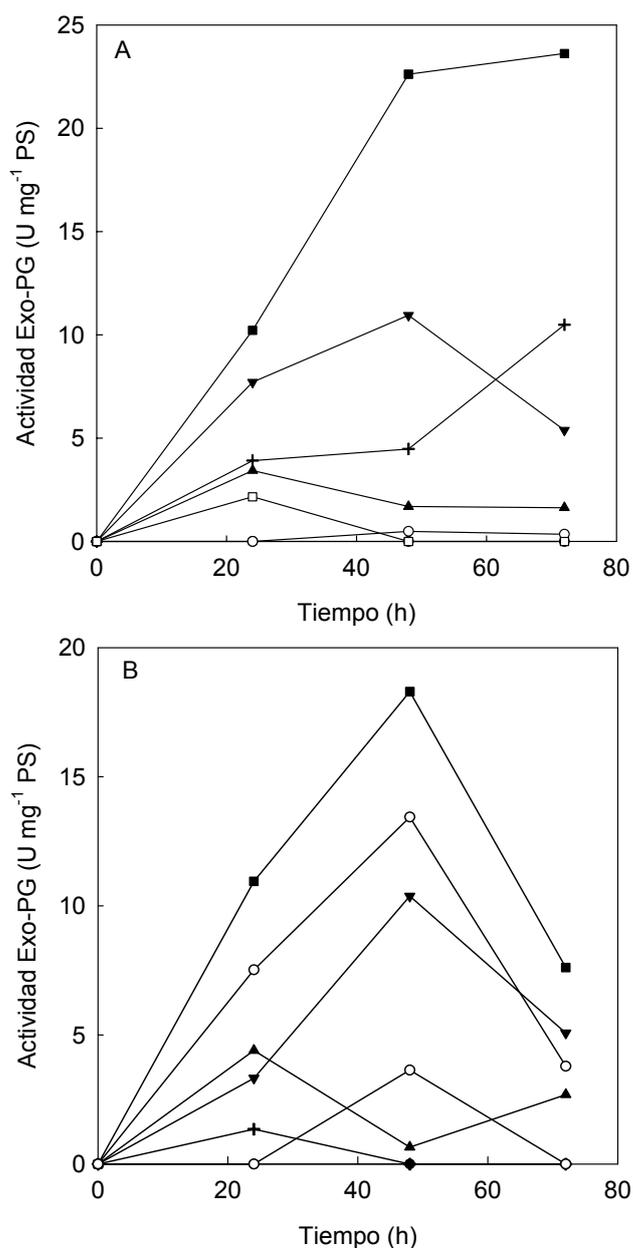


Figura 15. Cinética de producción de actividad exoPG específica de *Aspergillus flavus* en diferentes fuentes de carbono. A) NRRL-6541 y B) CECT-2687. (●) Glucosa, (■) Ácido galacturónico, (▲) Ácido poligalacturónico, (▼) Xilosa, (+) Galactosa, (○) Arabinosa y (□) Ramnosa.

La actividad pectin liasa presentó un perfil de producción diferente al de la actividad exo-PG (Figura 17). En el caso particular en donde se utilizó ácido galacturónico, las dos cepas de *A. flavus* produjeron la actividad pectin liasa desde el inicio hasta el final del cultivo, donde se alcanzó el máximo valor (70 y 23 mU/mg PS, para la cepa NRRL-6541 y CECT-2687, respectivamente). Los

niveles de actividad obtenidos en las demás fuente de carbono son muy bajos comparados con los obtenidos en ácido galacturónico. Al igual que para la actividad exo-pectinolítica, la actividad liasa no se produjo en glucosa, lo que hace pensar que esta enzima(s) también está sujeta a represión por glucosa. No se ha encontrado en la literatura reportado que cepas de *Aspergillus flavus* produzcan enzimas con actividad de trans-eliminación en azúcares sencillos, solo se ha reportado que se producen cuando se utiliza pectina como fuente de carbono (Famurewa *et al.*, 1993).

La fuente de carbono no es el único factor que puede regular la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas como las pectinasas. El pH es un factor ambiental muy importante en la regulación de estas enzimas y puede determinar si la enzima se produce o no, a pesar de que se utilice un sustrato inductor (Aro *et al.*, 2005, MacCabe *et al.*, 1998). En este sentido, se observó que los altos niveles de producción de actividad pectin liasa, obtenidos en ácido galacturónico, para las dos cepas de *Aspergillus flavus*, están asociados al cambio de pH del medio de cultivo (Figura 18). Cuando se utilizó glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y ramnosa, azúcares constituyentes de la pectina, el pH del medio de cultivo disminuyó hasta valores de 3.0 (datos no mostrados), lo cual pudo inhibir la producción de la actividad pectin liasa. El perfil de pH del medio de cultivo en pectina como fuente de carbono fue muy diferente al que se obtuvo con azúcares sencillos. En este, el pH del medio disminuyó hasta valores de 4.0 en las primeras 48 h y después aumentó a valores por arriba de 6.0 al final del cultivo. A pesar de que se considera a la pectina como un sustrato inductor de pectinasas para *Aspergillus flavus* (Cleveland and McCormick, 1987., Cleveland and Cotty, 1991., Famurewa *et al.*, 1993. y Whitehead *et al.*, 1995.), los valores obtenidos de actividad en este sustrato ($0.6 \text{ mU mg}^{-1} \text{ PS}$) son muy bajos comparados con los obtenidos en ácido galacturónico a pH inicial de 6.0 y 37°C , para *A. flavus* NRRL-6541 ($71.21 \text{ mU mg}^{-1} \text{ PS}$). Hay que recordar que la cepa CECT-2687 no produjo actividad pectin liasa en pectina como sustrato.

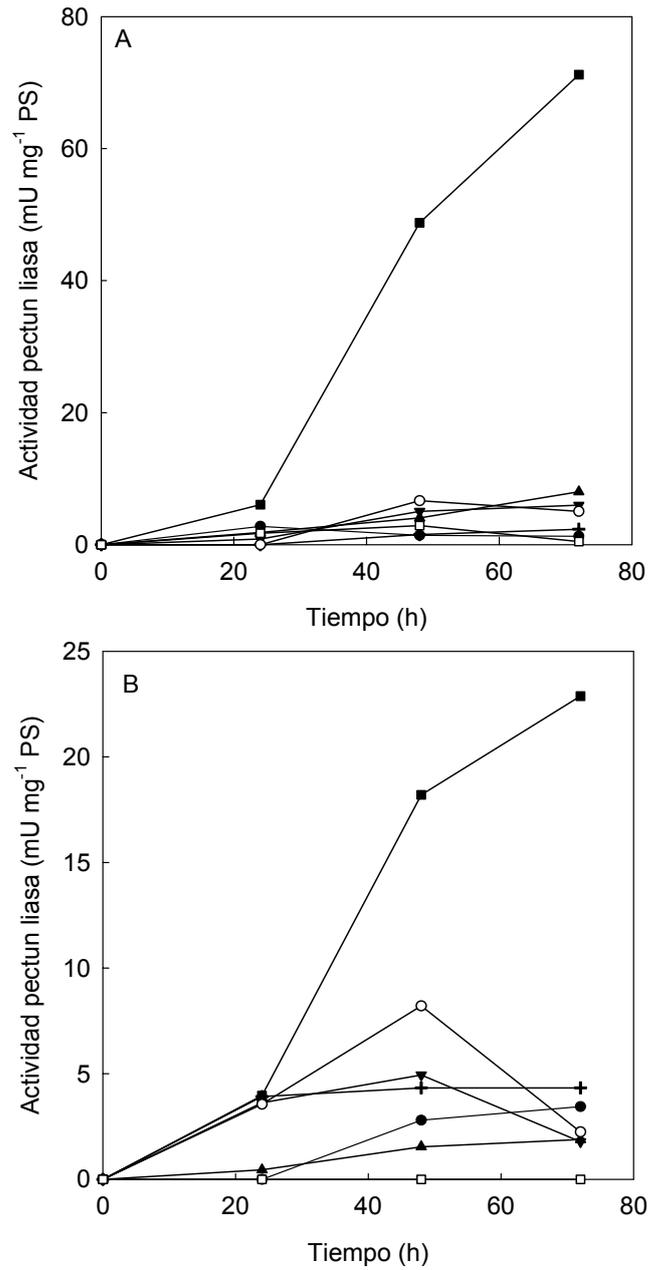


Figura 16. Cinética de producción de actividad pectin liasa en diferentes fuentes de carbono. A) NRRL-6541 y B) CECT-2687. (●) Glucosa, (■) Ácido galacturónico, (▲) Ácido poligalacturónico, (▼) Xilosa, (+) Galactosa, (○) Arabinosa y (□) Ramnosa.

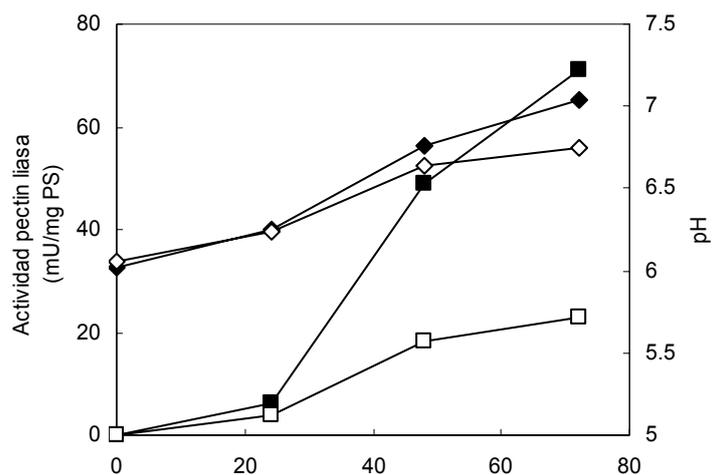


Figura 17. Cinética de producción de actividad pectin liasa y evolución del pH del medio por *A. flavus* NRRL-6541 (◆, ■) y *A. flavus* CECT-2687 (◇, □). pH (◆, ◇), actividad pectin liasa (■, □).

6.4. Experimentos de transferencia de micelio

6.4.1. Crecimiento celular

En los experimentos que se realizaron a partir de un inóculo de esporas, el crecimiento sobre sustratos como la glucosa y el ácido galacturónico fue muy deficiente. Debido a esto, se decidió utilizar un inóculo con un micelio precrecido para evitar la etapa de germinación. El pre-crecimiento se hizo en medio basal con glucosa como fuente de carbono y fue suplementado con extracto de levadura (1 g/L), el cual se ha observado favorece la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio (datos no reportados). Los resultados se muestran en la figura 19. En estos experimentos el crecimiento de la cepa *A. flavus* NRRL-6541 fue mayor que el de la cepa CECT-2687 en glucosa, ácido poligalacturónico y ácido poligalacturónico. Por ejemplo en glucosa y ácido poligalacturónico, la cepa NRRL-6541 creció 1.83 y 2.15 veces más que la cepa CECT-2687, respectivamente. En pectina como fuente de carbono, al igual que en los experimentos inoculados con esporas, la cepa CECT-2687 casi dos veces más que la cepa NRRL-6541.

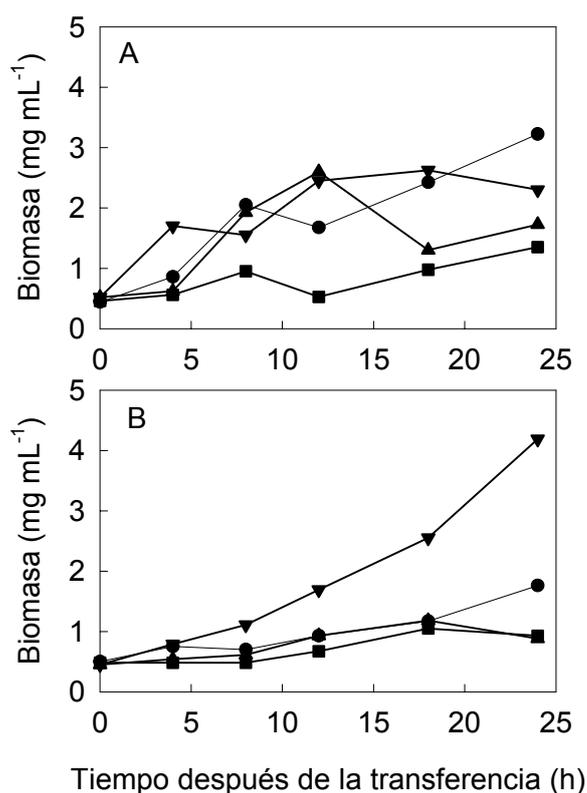


Figura 18. Cinética de crecimiento celular en los experimentos de transferencia de micelio. El precrecimiento se hizo en medio basal con 1% (p/v) de glucosa y 0.1% (p/v) de extracto de levadura. El micelio se recuperó en condiciones asépticas y se lavó tres veces con solución salina fría. A) *A. flavus* NRRL-6541 y B) *A. flavus* CECT-2687. (●) Glucosa, (■) ácido galacturónico, (▲) ácido poligalacturónico y (▼) pectina.

En glucosa la cepa NRRL-6541 presentó un incremento considerable de biomasa respecto al experimento donde se utilizaron esporas como inóculo. En este experimento el incremento de biomasa fue 4.8 veces mayor. La cepa *A. flavus* CECT-2687 solo tuvo un incremento de biomasa de 1.25 mg mL⁻¹ en glucosa y fue 6.25 veces mayor comparado con el incremento de biomasa obtenido en los experimentos inoculados con esporas. El incremento de biomasa en ácido galacturónico fue muy semejante para ambas cepas y fue de casi 3.7 veces mayor respecto al que se obtuvo cuando se inoculó con esporas.

El rendimiento de biomasa respecto al sustrato obtenido en estos experimentos aumentaron respecto a los obtenidos en los experimentos inoculados con una suspensión de esporas. La cepa NRRL-6541 aumentó de

0.0167 y 0.027 $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ a 0.524 y 0.144 $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ en glucosa y ácido galacturónico, respectivamente. Mientras que la cepa CECT-2687 aumentó de 0.057 y 0.028 $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ a 0.228 y 0.1375 $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ en glucosa y ácido galacturónico, respectivamente. Estas diferencias entre los tipos de inóculos han sido observadas para otros hongos filamentosos. Por ejemplo, cuando un cultivo de *Trichoderma harzianum* se inocula con esporas, la concentración celular máxima disminuye conforme se incrementa la velocidad de agitación (Rocha-Valadez *et al.*, 2005.), mientras que, cuando cultivos de *Aspergillus oryzae* y *Penicillium chrysogenum* son inoculados con micelio vegetativo, pasa exactamente lo contrario, el crecimiento celular máximo aumenta cuando incrementa la velocidad de agitación (Amanullah *et al.*, 2002., Justen *et al.*, 1998.). Estos resultados sugieren que la deficiente incorporación de la fuente de carbono en biomasa se ve influenciada en gran medida por el tipo de inóculo que se utilice, ya sea esporas o micelio vegetativo.

Hasta el momento no es claro por que los carbohidratos sencillos son una fuente de carbono mala para el crecimiento celular, mientras que, contrario a lo que pudiera pensarse, los sustratos complejos como la pectina y el ácido poligalacturónico si los son.

6.4.2. Actividades pectinolíticas

La actividad exo-PG presentó perfiles de producción diferentes entre las dos cepas de *A. flavus* (Figura 20) y entre los dos diferentes tipos de inóculo. La cepa NRRL-6541 produjo actividad exo-PG en ácido galacturónico, ácido poligalacturónico y pectina., mientras que la cepa CECT-2687 solo produjo en ácido poligalacturónico. En este último sustrato la cepa CECT-2687 produjo 1.56 veces mas actividad comparada con la actividad máxima obtenida por la cepa NRRL-6541 en ácido galacturónico, la cual fue la mayor obtenida respecto a los demás sustratos.

La producción de la actividad exo-PG se ve favorecida en las cepas de *A. flavus* cuando los medios de cultivos se inoculan con esporas. En este caso la cepa NRRL-6541 produce 4.6 veces más actividad en ácido galacturónico y

4.34 veces más en ácido poligalacturónico, comparado con los niveles de actividad obtenidos en los experimentos de transferencia de micelio, mientras que la cepa CECT-2687 produjo 1.33 veces más en los medios inoculados con esporas que en los experimentos de transferencia de micelio. Esto indica que la producción de esta actividad es diferencial respecto al tipo de inóculo y del tipo de fuente de carbono que se utilice. La producción de actividad pectin liasa también fue diferencial, principalmente respecto al tipo de inóculo. En estos experimentos de transferencia, la cepa NRRL-6541 produjo 2 veces mayor actividad específica en ácido poligalacturónico y 24 veces más actividad en ácido galacturónico que la cepa CECT.2687 (Figura 21). Al igual que para la actividad exo-PG, la actividad pectin liasa se produjo mejor cuando el inóculo fue a partir de esporas.

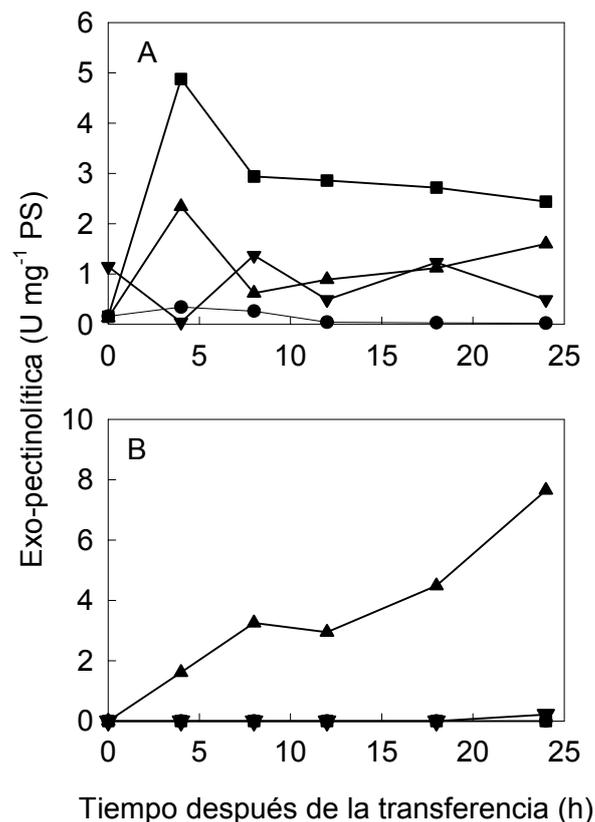


Figura 19. Cinética de producción de actividad exo-pectinolítica en experimentos de transferencia de micelio utilizando distintas fuentes de carbono (10 g/L), a pH 6.0 y 37°C. A) *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y B) *Aspergillus flavus* CECT-2687. (●) Glucosa, (■) ácido galacturónico, (▲) ácido poligalacturónico y (▼) pectina.

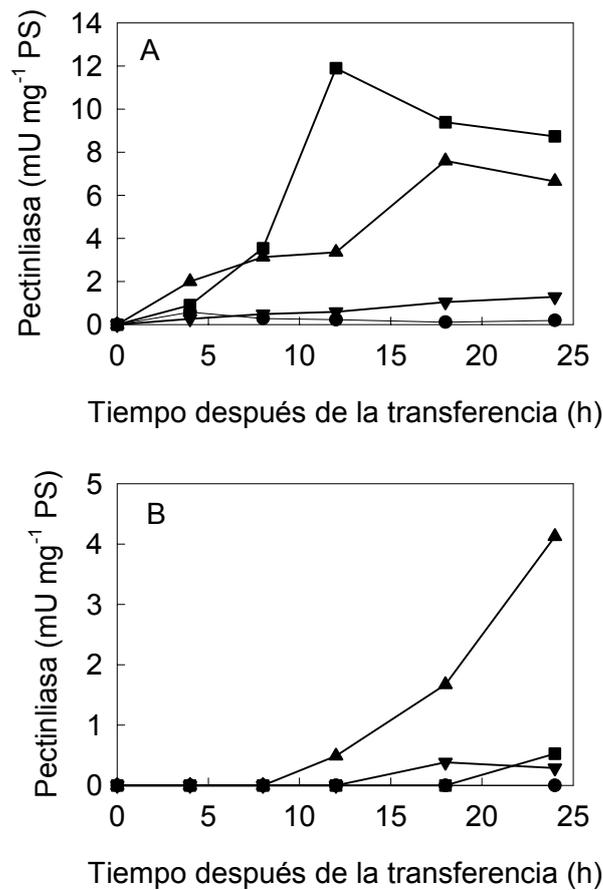


Figura 20. Producción de actividad pectin liasa en experimentos de transferencia de micelio utilizando distintas fuentes de carbono. A) *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y B) *Aspergillus flavus* CECT-2687. (●) Glucosa, (■) ácido galacturónico, (▲) ácido poligalacturónico y (▼) pectina.

En el caso de *Botrytis cinerea*, un hongo fitopatógeno, la expresión de los genes de seis isoenzimas con actividad endo-PG se ven reguladas diferencialmente respecto a la fuente de carbono en experimentos de transferencia de micelio precrecido en glucosa (Wubben *et al.*, 2000.). En estos experimentos las seis isoensimas son inducidas en pectina y en ácido poligalacturónico, mientras que solo cuatro de estas lo son en ácido galacturónico. Esto sugiere que, tal vez, *Aspergillus flavus* es capaz de producir más de una enzima con actividad exo-PG o pectin liasa, las cuales, se producen en mayor cantidad en ácido poligalacturónico cuando se utiliza micelio vegetativo como inóculo que cuando se utilizan esporas (Figura 20 y 21). Cabe señalar que esto solo es consistente para la cepa CECT-2687, la

cual esta reportada según la colección española de cultivos tipo (CECT) como una cepa toxigénica.

6.5. Caracterización de los filtrados enzimáticos con actividad pectin liasa

Existen varios estudios sobre el papel que tienen las enzimas pectinolíticas en el proceso de infección de *Aspergillus flavus* sobre tejidos de plantas y sugieren que las enzimas con actividad endo-PG son los principales factores de virulencia (Marsh and Payne, 1984., Cleveland and McCormick, 1987., Cleveland and Cotty, 1990., Brown *et al*, 1992. y Shieh *et al*, 1997). Cleveland y McCormick (1987), identificaron tres enzimas con actividad poligalacturonasa y una con actividad pectin metil esterasa y reportaron la ausencia de productos de trans-eliminación. Esto sugiere que enzimas como las pectin liasas o pectato liasas no son producidas por *Aspergillus flavus*. Sin embargo, Famurewa *et al.*, (1993) reportaron la presencia de un complejo con actividad de trans-eliminación, el cual era inducido por pectina y reprimida por glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa. A pesar de esto, se identificó claramente a que tipo de enzima o enzimas se debía la actividad de trans-eliminación.

En el presente trabajo se identificó que las dos cepas de *Aspergillus flavus* produjeron actividad de trans-eliminación bajo diferentes condiciones, confirmando los resultados de Famurewa y colaboradores, y los niveles de producción de esta actividad son diferentes entre cada cepa, ya sea en los cultivos inoculados con esporas o con micelio. Debido a que los reportes anteriores son contradictorios, se decidió caracterizar parcialmente los filtrados enzimáticos con actividad de trans-eliminación de las dos cepas de *A. flavus*. Esto para identificar que tipo de enzima(s) estaban involucradas en la actividad, pectin liasa o pectato liasa. El criterio para esto fue el grado de esterificación de la pectina usada como sustrato en la mezcla de la reacción enzimática. Es bien conocido que las enzimas con actividad pectin liasa actúan sobre pectinas de alto grado de esterificación (>50%) y que las pectato liasa tienen actividad sobre pectinas con bajo grado de esterificación (<50%) (Lineweaver y Jansen, 1951).

Se ha reportado que las enzimas con actividad de trans-eliminación presentan diferentes valores de pH óptimo que van desde pH 5.5 hasta pH 8.8, y estas pueden ser activadas por iones divalentes como el Ca^{2+} (Delgado *et al.*, 1993) En este trabajo, la actividad liasa, producida por las cepas de *A. flavus* en ácido galacturónico a pH 6.0 y 37 °C, fue activada, pero no dependiente, por CaCl_2 a una concentración de 10 mM (Figura 22), ya que a concentraciones mayores de CaCl_2 la pectina tiende a formar un gel. Estos resultados son consistentes con lo reportado para otros enzimas con actividad liasa, donde el intervalo de cloruro de calcio que se utiliza es de 0.2 a 1 mM (Benen *et al.*, 2000., Matsumoto *et al.*, 2002., Kobayashi *et al.*, 1999., Dixit *et al.*, 2004.).

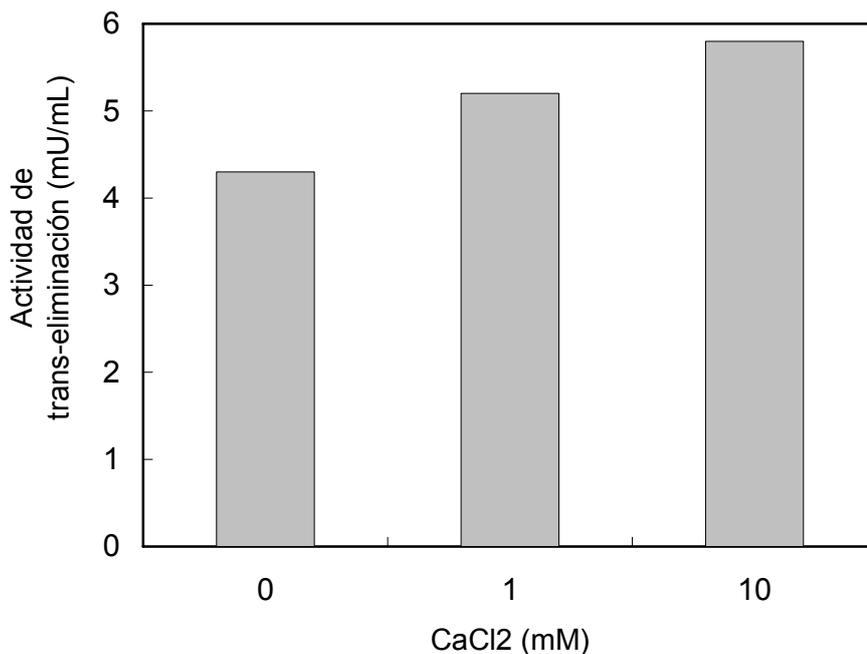


Figura 21. Efecto la concentración de Ca^{2+} sobre la actividad liasa producida por la cepa *A. flavus* NRRL-6541, presente en un filtrado libre de células. La actividad se produjo en pectina a pH inicial de 6.0 y 37 °C.

Para identificar si la actividad de trans-eliminación, producida por las dos cepas de *Aspergillus flavus*, esta dada por una pectin liasa o una pectato liasa, se analizó el efecto del grado de esterificación del sustrato sobre la actividad enzimática (Figura 23). La diferencia entre una pectina de alto grado de

esterificación (>50%) y una de bajo grado de esterificación (<50%) es la cantidad relativa de grupos ester, acetilo o metilo unidos al grupo carboxilo de los residuos de ácido galacturónico. El nivel de esterificación implica que algunas enzimas son inhibidas por estos grupos, o que no sean capaces de unirse al sustrato debido a impedimentos estéricos dado estas sustituciones (Bonin *et al.*, 2002.). En este sentido, las enzimas que degradan la pectina con alto grado de esterificación por trans-eliminación son denominadas como pectin liasas y las enzimas que degradan pectina de bajo grado de esterificación, como el ácido poligalacturónico, son denominadas pectato liasas.

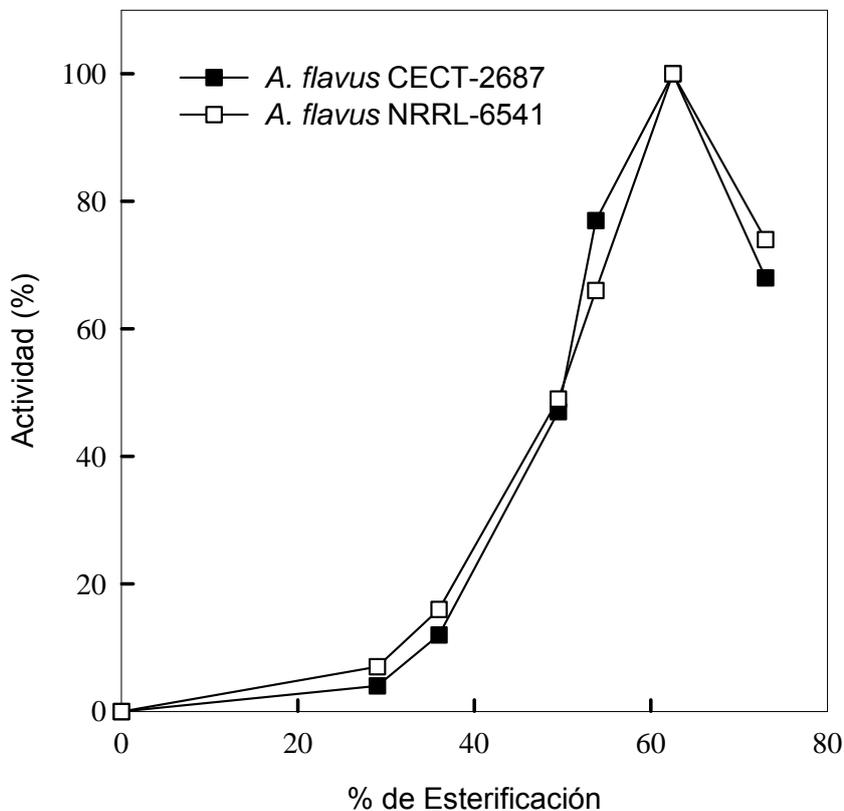


Figura 22. Efecto del grado de esterificación de la pectina sobre la actividad liasa producida por dos cepas de *A. flavus*.

En la figura anterior se ve claramente que la actividad producida por ambas cepas es debido a la presencia al menos una enzima con actividad pectin liasa y que, además, los filtrados enzimáticos libres de células con actividad pectin liasa presentan las mismas características respecto a la especificidad del sustrato, pH óptimo y estabilidad al pH (Figura 23 y 24). Esto

a diferencia de los resultados reportados por Famurewa *et al* (1993), donde sus resultados sugieren que las fracciones obtenidas presentan actividad tanto pectin como pectato liasa, debido a que hay actividad en pectina de alto grado de esterificación (Pectina y ácido péctico) como en pectina de bajo grado (Ácido poligalacturónico y polipectato de sodio) (Tabla VII). Sin embargo, ellos reportaron que el pH óptimo de las dos fracciones con actividad de trans-eliminación se encuentra por arriba de 7.0 a 37 °C y que, ambas fracciones, eran activadas por iones divalentes como, por ejemplo, el Ca²⁺, lo que coincide con lo reportado en este trabajo.

Tabla VII. Comparación de las actividades de trans-eliminación sobre pectinas con diferente grado de esterificación.

Sustrato	Actividad de trans-eliminación			
	*Fracción I (U mg ⁻¹)x10 ⁻²	*Fracción II (U mg ⁻¹)x10 ⁻²	<i>A. flavus</i> NRRL-6541 (mU mL ⁻¹)	<i>A. flavus</i> CECT-2687 (mU mL ⁻¹)
*Pectina	16.9	10.8	ND	ND
*Ä. poligalacturónico	9.2	5.1	0	0
*Äcido péctico	10.5	5.9	ND	ND
*Polipectato de sodio	8.5	3.2	ND	ND
Pectina; 62.5% ester.	ND	ND	6.99	3.92
Pectina; 71-75% ester.	ND	ND	4.724	2.82

*Datos tomados de Famurewa *et al.*, 1993. ND = No determinado

La actividad pectin liasa producida en ácido galacturónico a pH 6.0 y 37°C por las dos cepas de *A. flavus* presento el mismo perfil de pH óptimo y de estabilidad a pH (Figura 23) y se observó que esta actividad fue muy estable a pH 8.0, donde presentó una actividad residual por arriba del 95 % (Figura 23B). A valores de pH por debajo de 6.0 la actividad producida por las cepas disminuyó por abajo del 40% de actividad residual. Estos resultados podrían explicar por qué cuando el pH del medio de cultivo es ácido, los niveles de producción de actividad de pectin liasa son muy bajos, y apoya el hecho de que el pH ácido del medio de cultivo afecta la estabilidad y la actividad de la enzima, y por lo tanto los niveles de producción de estas.

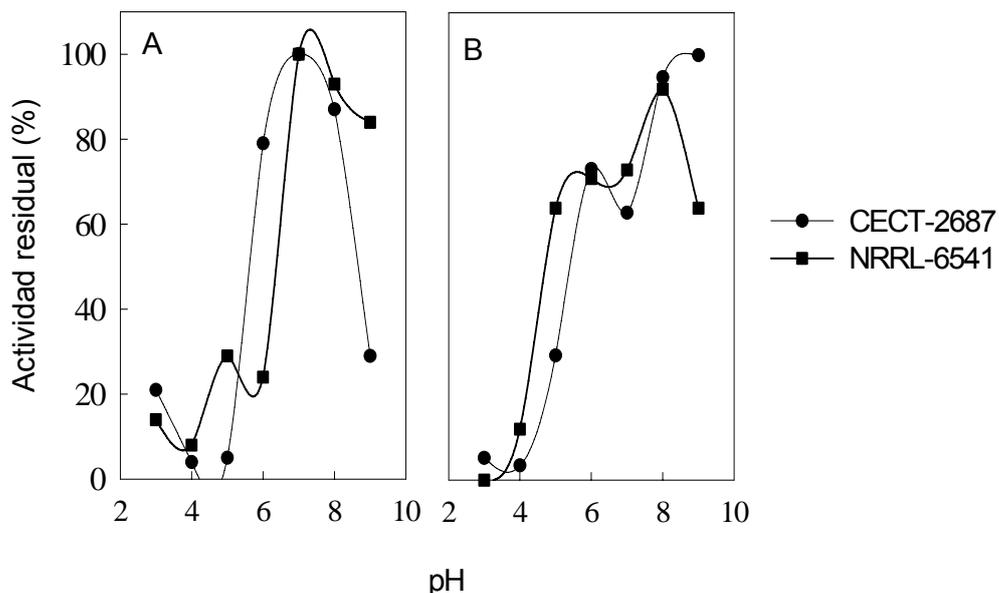


Figura 23. Efecto del pH sobre la actividad liasa presente en los filtrados enzimático producidos por *Aspergillus flavus* en ácido galacturónico a pH6.0 y 37°C. A) pH óptimo y B) estabilidad a pH.

Las enzimas pectin liasa han sido reportadas para otras especies de *Aspergillus* y para otros microorganismos. Delgado *et al* (1992), reportó que *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 produjo actividad pectin liasa, la cual presentó la mayor actividad a pH 8.0-8.5 a temperatura de 40-45°C. Aunado a esto, la especificidad hacia el sustrato fue mayor con pectina con alto grado de esterificación (>50). Este mismo tipo de especificidad se ha reportado para la pectin liasa B de *Aspergillus niger*, donde el número de recambio de la enzima aumenta con forme aumenta el grado de esterificación (Kester y Visser, 1994). Además, la pectin liasa B presenta una masa molecular aproximado de 40 kDa, lo cual coincide con la masa molecular, determinada por geles de electroforeisis SDS-PAGE, de la pectin liasa de las dos cepas de *Aspergillus flavus* reportadas en el presente trabajo (datos no mostrados). En *Aspergillus oryzae* KBN616 se han reportados dos genes que codifican para dos diferentes enzimas con actividad pectin liasa (Kitamoto *et al.*, 2001a y b). El análisis de la secuencia y de los productos de los genes revela que, igual que la pectin liasa de las dos cepas de *A. flavus* y la pectin liasa A de *A. niger*, estas dos enzimas tienen una masa molecular calculada de entre 36 y 40 kDa, además de que presentan una identidad de secuencia del 69% para la pectin liasa A,

68% para la pectin liasa B y 78% para la pectin liasa D, de *Aspergillus niger*. Estos resultados apoyan la idea de que probablemente *A. flavus* es capaz de producir más de una enzima con actividad pectin liasa y que además pueden estar reguladas diferencialmente dependiendo de la fuente de carbono, del pH del medio y del tipo de inóculo.

7. DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se evaluó el efecto del pH inicial, la temperatura, la fuente de carbono y el tipo de inóculo sobre el crecimiento de dos cepas de *Aspergillus flavus* y su capacidad de producir actividades pectinolíticas. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 prácticamente no se ve influenciado por el pH inicial del medio de cultivo y la temperatura de incubación (Tabla IV). Por otro lado, el crecimiento de la cepa *A. flavus* CECT-2687 aumentó de aproximadamente 4 mg mL⁻¹ de peso seco, a pH inicial de 3.0 y 4.5, a casi 7 mg mL⁻¹ a pH inicial de 6.0. También se observó que existe una gran diferencia cuando las dos cepas de *A. flavus* son cultivadas en medio sólido o en medio líquido. Este tipo de eventos es bien conocido y ha sido reportado anteriormente. Minjares-Carranco *et al*, (1997) reportaron que cepas mutantes de *Aspergillus niger* presentaron diferencias morfológicas y de producción de actividades pectinolíticas. Observaron que, de acuerdo a la técnica de cultivo, la esporulación y la velocidad de crecimiento fueron diferentes, y que además, se producían diferentes isoformas de las enzimas pectinolíticas en medio sólido y en medio líquido.

La cepa CECT-2687 presentó mejor capacidad de crecimiento que la cepa *A. NRRL-6541* cuando se utilizó pectina como fuente de carbono. Contrario a lo que se esperaría, se observó que las dos cepas de *A. flavus* crecen mejor sobre sustratos complejos (pectina) que sobre sustrato sencillos (glucosa). En su habitat natural *A. flavus* invade tejidos de plantas, ya sea en cultivo o en post cosecha (Marsh and Payne, 1984, Cleveland and McCormick, 1987, Cleveland and Cotty, 1991 y Brown *et al*, 1992.). En este tipo nichos, el hongo no encuentra disponibilidad de carbohidratos sencillos de forma natural, por lo que su capacidad de producir enzimas que degraden los polimeros de la pared celular de las plantas es indispensable su sobrevivencia (de Vries y Visser, 2001.). En este sentido, la disponibilidad de los carbohidratos asimilables por el hongo depende de la velocidad con la que actuen las enzimas que degradan los polisacáridos, y sería de esperarse que bajo esas condiciones la acumulación de estos fuese mínima. Lo anterior sugiere que

este *Aspergillus flavus*, un hongo fitopatógeno, presenta un grado muy importante de especialización de acuerdo al tipo de ambiente donde habita, el cual le podría favorecerlo para invadir los tejidos vegetales. Cabe aclarar que hasta el momento, no se sabe cómo es que este hongo utiliza mejor los productos de degradación de la pectina que los sustratos sencillos.

El crecimiento de las cepas de *Aspergillus flavus* depende en gran medida de la germinación de las esporas. Debido a que la principal forma de diseminación de los hongos es por esporas, la germinación representa una etapa limitante para una colonización exitosa sobre los tejidos de plantas. Araujo y Goncalves (2004) reportaron que la velocidad de germinación de *Aspergillus flavus* disminuye cuando la temperatura de incubación es por arriba de 40°C, y que la temperatura óptima para la germinación de las esporas es de 37°C, lo cual es consistente con lo observado en el presente trabajo, donde a temperaturas mayores de 40°C las esporas no son capaces de germinar, ya sea en medio sólido o líquido.

La producción de actividades pectinolíticas, al igual que el crecimiento, se vio influenciada por la temperatura y el pH inicial del medio de cultivo. Se observó que estos dos factores ambientales tuvieron un efecto combinado sobre la producción de actividad exo-pectinolítica y pectin liasa (Figura 14 y 15).

El sustrato que favoreció la producción de la actividad exo-pectinolítica y pectin liasa fue el ácido galacturónico, el principal producto de degradación de la pectina (Bonnin *et al*, 2002). Pero a diferencia de la pectina, el crecimiento de las cepas de *A. flavus* sobre ácido galacturónico fue muy deficiente, lo cual no se vio reflejado en el alto consumo del sustrato (Tabla V y VI), dando como resultados rendimientos muy bajos de biomasa respecto al sustrato, 0.01 a 0.1 $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$. Las actividades pectinolíticas fueron sintetizadas diferencialmente de acuerdo a la fuente de carbono y al tipo de inóculo utilizado. Las dos actividades pectinolíticas presentaron represión por glucosa para las dos cepas de *Aspergillus flavus*, lo cual sugiere que estas cepas

podría ser de baja virulencia (Cleveland and McCormick, 1987 y Cleveland y Cotty, 1991).

Las actividades pectinolíticas fueron inducidas por pectina, ácido galacturónico y ácido poligalacturónico, sugiriendo que los carbohidratos relacionados con la constitución de la pectina, como el ácido galacturónico, son inductores de la actividad exo-pectinolítica y la actividad pectin liasa. Wubben *et al.* (2000) reportó que la expresión de genes de varias isoenzimas con actividad PG de *Botrytis cinerea*, se indujeron con ácido galacturónico, poligalacturónico y pectina, mientras que algunos de estos presentaron represión por glucosa. En este mismo trabajo, el valor de pH que favoreció la expresión de los genes fue de entre 5.5 y 6.0. Este reporte es consistente con lo observado en el presente trabajo y sugiere que, al igual que el hongo *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus* puede ser capaz de producir más de una enzima con la misma actividad, exo-PG y/o pectin liasa, y que los niveles y perfiles de expresión de las isoenzimas dependen de los factores ambientales y nutricionales. Por tal motivo, sería importante aislar, purificar y caracterizar las posibles isoenzimas con actividad exo-PG y pectin liasa producidas por *A. flavus*, para estudiar el efecto de los factores ambientales sobre su producción y poder identificar su posible papel en la fisiología de este hongo.

La presencia de actividad pectin liasa en cultivos de *Aspergillus flavus* no ha sido clara. De acuerdo a lo reportado en la literatura, la producción de actividad pectin liasa, así como otro tipo de enzimas, depende de las condiciones en las que el hongo fue cultivado. En este sentido, Cleveland y McCormick (1987) utilizaron cultivos en matraces en condiciones estáticas, mientras que Famurewa *et al.* (1993) utilizaron cultivos en matraces agitados, lo cual pudo haber favorecido debido a la disponibilidad de oxígeno, la producción de pectin liasa en *A. flavus*. Se ha reportado que, por ejemplo, la pectin liasa producida por *Penicillium griseoroseum* aumenta cuando se incrementan los niveles de agitación, lo cual a su vez aumenta la velocidad con la que el oxígeno se transfiere al medio de cultivo (Piccoli-Valle *et al.*, 2003.). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde los cultivos se realizaron en matraces agitados, fortalecen la idea de que la disponibilidad de

oxígeno puede ser un factor que limite la producción de la actividad pectin liasa. Cabe señalar que que existe una gran variabilidad genética en cuanto a la producción de pectinasas en las cepas de *Aspergillus flavus* (Cotty *et al*, 1990 y Pildain *et al*, 2004), y que esta variabilidad entre las cepas puede ser un factor por la cual exista discrepancia entre la presencia de pectin liasa en este hongo.

A diferencia de lo reportado por Cleveland y McCormick, (1987) y Shieh *et al*, (1997), la actividad endo-pectinolítica no se encontró. Esto pudo deberse a que estos investigadores determinaron esta actividad por medio de un ensayo en placa, y debido a que la actividad pectinolítica puede estar dada por un conjunto muy amplio de enzimas, con esta técnica es difícil identificar el modo de acción de las enzimas presentes en el medio. Probablemente, la actividad que ellos denominan como actividad endo-PG sea la misma que la actividad exo-PG reportada en este trabajo. Esto esta basado en que, a diferencia de Cleveland y McCormick (1987) y Shieh *et al*, (1997), la determinación de la actividad endo-PG, en el presente trabajo, se hizo midiendo indirectamente la disminución de la viscosidad, ocasionada por la periodicidad de corte de las enzimas con actividad tipo “endo” (Lineweaver y Jansen, 1951), de una solución de pectina utilizando un viscosímetro de capilar. Esta metodología permite identificar de forma más precisa el tipo de corte de la enzima, lo cual no se puede observa en el ensayo en placa.

La enzima P2c ha sido relacionada como factor de virulencia para *A. flavus* (Shieh *et al*, 1997), lo cual implica que sin esta enzima, este hongo no sería capaz de crecer sobre los tejidos de las plantas. Esto no es del todo cierto, ya que se ha reportado que para otros hongos, la interrupción de los genes que codifican para enzimas que degradan los polisacáridos de pared celular de plantas solo disminuyen la agresividad con la que estos hongos invaden los tejidos, y en algunos casos, la virulencia no se ve afectada (Have *et al*, 1998 y Brown *et al*, 2001 y Gómez-Gómez *et al*, 2002). Esto se debe a que los sistemas enzimáticos que degradan la pared celular de las plantas están compuestos por enzimas con diferentes modos de acción y que estas enzimas, además, pueden presentar isoformas, lo que lleva a que puedan producir las

enzimas aún y cuando uno de los genes haya sido interrumpido (Whitehead *et al*, 1995, Wubben *et al*, 1999 y de Vries and Visser, 2001).

Como ya se mencionó, existen enzimas con diferentes modos de acción en un sistema tan complejo como el pectinolítico (de Vries and Visser, 2001). Esto implica que las enzimas del sistema pectinolítico actúan de forma secuencial y sinérgica (de Vries *et al*, 2000). En el caso de *Aspergillus flavus*, para que la enzima denominada P2c actúe (Cleveland and McCormick, 1987), es necesario que una pectin metil esterasa elimine los grupos metoxilo y acetilo que se encuentran unidos a la pectina (Cotty *et al*, 1990). Las cepas que no son capaces de producir esta actividad de esterasa, difícilmente presentarían actividad poligalacturonasa. Esto haría pensar que estas cepas no son capaces de degradar la pectina y por lo tanto no crecerán a partir de ella. En este sentido, la presencia de la actividad pectin liasa apoya el hecho de que las cepas deficientes en actividad pectin metil esterasa, si son capaces de crecer sobre pectina (Cotty *et al*, 1990). Esto dado que las enzimas con actividad pectin liasa son más activas sobre pectinas con alto grado de esterificación (Figura 24) (Delgado *et al.*, 1992., Kester and Visser, 1994.), lo que indica que estas enzimas no necesitan de la acción previa de la pectin metil esterasa. Esto hace que la presencia de las enzimas con actividad pectin liasa sea aún mucho más importante de lo que se había pensado, y que la presencia de estas podrían contribuir como factor de virulencia en cepas de *Aspergillus flavus*.

No es claro, y no ha sido reportado, si este tipo de enzimas juegan un papel importante como factor de virulencia de *A. flavus*. Lo que si es claro es que, dada la gran variabilidad genética que presentan las cepas de esta especie de *Aspergillus* en cuanto a la producción de la poligalacturonasa P2c y la pectin metil esterasa (Cotty *et al*, 1990), la presencia de estas enzimas confiere una gran ventaja a este hongo sobre las plantas para poder invadir sus tejidos exitosamente. Esto basado en que la pectina que constituye la pared celular de las plantas tiene un alto grado de esterificación (Willats *et al*, 2001) y que, además, el posible valor de pH en las plantas es de 6.0 (Gavilanes, M., 2005), el cual es muy cercano el pH óptimo determinado para estas enzimas. También es de resaltar que los mecanismos de defensa en plantas, que

inactivan a las enzimas que degradan la pared de las plantas, solo están reportadas para poligalacturonasas y hasta el momento no han sido reportados para enzimas con actividad de de liasa (Esquerré-Tugayé *et al*, 2000 y D'Ovidio *et al*, 2004). Trabajos realizados en nuestro laboratorio (datos no reportados) indican que cuando *A. flavus* es cultivado en medio líquido sobre residuos agroindustriales como fuente de carbono, la producción de la actividad pectin liasa, de ambas cepas, se incrementa hasta dos veces comparado con lo reportado en este trabajo. Esto también apoya el hecho de que las cepas de *Aspergillus flavus* están mejor adaptadas a crecer sobre sustratos complejos que sobre sustratos sencillos como la glucosa. En este contexto es interesante e importante, dada la relevancia de este hongo en la industria agrícola y alimentaria, realizar estudios donde se identifique cual es la función de la pectin liasa en el proceso de infección de tejidos vegetales tales como los del algodón, maíz, etc.

8. CONCLUSIONES

1. Las cepas de *Aspergillus flavus* crecen muy bien en sustratos complejos como la pectina y el ácido galacturónico. El crecimiento de ambas cepas es muy deficiente en azúcares sencillos como la glucosa, xilosa, galactosa, ácido galacturónico, arabinosa y ramnosa, cuando los cultivos se inoculan con esporas. En estas condiciones el rendimiento de biomasa con base en el sustarto ($Y_{x/s}$) es muy bajo (0.167 y 0.027 $g_{\text{biomasa}}/g_{\text{sustrato}}$ para glucosa y ácido galacturónico, respectivamente). Cuando los cultivos son inoculados con micelio metabólicamente activo, el $Y_{x/s}$ en azúcares sencillos mejora considerablemente comparado con los rendimientos anteriores (0.524 y 0.144 $g_{\text{biomasa}}/g_{\text{sustrato}}$ para glucosa y ácido galacturónico, respectivamente). Por el momento no es claro cual es la razón de que las cepas de *A. flavus* utilicen mejor los polisacáridos que los azúcares sencillos, pero esto podría estar implicado como una adaptación de este hongo a su habitat, donde predominan los tejidos vegetales y la disponibilidad de nutrientes es escasa (Cotty *et al.*, 1990). En este sentido sería interesante estudiar cómo y por qué, este hongo asimila tan deficientemente azúcares como la glucosa, la cual se sabe es la fuente de carbono por excelencia en el metabolismo energético de los seres vivos.
2. En este trabajo se identificó la presencia de actividad pectin liasa en los filtrados del caldo de fermentación de dos cepas de *Aspergillus flavus*, la cual hasta el momento no ha sido reportada para este hongo. La producción de esta actividad por la cepa NRRL-6541, en pectina, fue mejor a pHo de 6.0 (2.2 mU mgP^{-1} PS) que a pHo de 3.0 (0.3 mU mgP^{-1} PS) a $37^{\circ}C$. En este mismo sustarto, la cepa CECT-2687 no produjo actividad pectin liasa bajo las condiciones probadas. Las fuentes de carbono que inducen la producción de la actividad pectin liasa son la pectina (2.2 mU mg^{-1} PS para la cepa NRRL-6541), el ácido poligalacturónico (7 y 3 mU mg^{-1} PS para la cepa NRRL-654 y CECT-2687, respectivamente) y el ácido galacturónico (72 y 23 mU mg^{-1} PS para la cepa NRRL-654 y CECT-2687, respectivamente), siendo este último el mejor sustrato para la producción.

3. Bajo nuestras condiciones de ensayo no se detectó la actividad endo-PG reportada para *Aspergillus flavus* (Cleveland and McCormick, 19987). Pero se encontró que la producción de la actividad pectin liasa y la exo-PG es diferencial respecto al tipo de inóculo y de fuente de carbono para ambas cepas.
4. La actividad de trans-eliminación identificada para las dos cepas de *Aspergillus flavus* esta dada por al menos una enzima con actividad pectin liasa, la cual es diferente a la actividad trans-eliminasa reportada por Famurewa *et al.* (1993). En ese trabajo, al parecer la actividad esta dada por una pectato liasa, mientras que en el presente trabajo se descartó la presencia de esta actividad, debido a que no hubo actividad sobre pectinas de bajo grado de esterificación (<50%).
5. La actividad pectin liasa producida por las dos cepas de *Aspergillus flavus* fue activada, pero no dependiente, de CaCl_2 hasta una concentración máxima de 10 mM. Esta actividad se ve inhibida cuando se utiliza un buffer tris-HCl. El pH óptimo de la actividad pectin liasa es de 7.0 y la máxima estabilidad se obtiene a pH de 8.0, a temperatura ambiente. El grado de esterificación óptimo de la pectina para la actividad pectin liasa, producida por las dos cepas de *A. flavus*, fue de 63 %.

9. REFERENCIAS

- 1) Amanullah, A., Christensen, L. H., Hasen, K. and Nienow, A. W. (2002). Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus Oryzae* and its implications for recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*. 77: 815-826.
- 2) Araujo, R. y Goncalves A., (2004). Variability of germinative potential pathogenic species of *Aspergillus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4335-4337.
- 3) Aro, N., Pakula, Y. and Penttila, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Review*. 29:719-739.
- 4) Benen, J. A. E., Kester, H. C. M., Parenicova, L. and Visser, J. (2000). Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A. *Biochemistry*. 39: 15563-15569.
- 5) Benen, J., Kester, H. and Visser, J., (1999). Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *European Journal of Biochemistry*, 259: 577-585.
- 6) Bonin, E., Le Goff, A., Korner, R., Vigouroux, J., Roepstorff, P. and Thibault, J. F. (1996). Hydrolysis of pectin with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1596: 83-94.
- 7) Brown, R., Chen, Z., Cleveland, T., Cotty, P. and Cary, J., (2001). Variation in *in vitro* α -amylase and protease activity is related to the virulence of *Aspergillus flavus* isolates. *Journal of Food Protection*, 64: 401-404.
- 8) Brown, R., Cleveland, T., Cotty, P. and Mellon, E., (1992). Spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls, decay of intercapillary membranes, and production of fungal pectinases. *Phytopathology*, 82: 462-467.
- 9) Caprari, C., Bergmann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., Cervone, F. and de Lorenzo, G., (1993). *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43: 453-462.
- 10) Cleveland, T. and McCormick, S., (1987). Identification of pectinases produced in cotton bolls infected with *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 77: 1498-1503.
- 11) Cleveland, T. E. and Cotty, P. J., (1991). Invasiveness of *Aspergillus flavus* in wounded cotton bolls is associated with production of a specific fungal polygalacturonase. *Phytopathology*. 81: 155-158.
- 12) Cotty, P., Cleveland, T., Brown, R. and Mellon, J., (1990). Variation in polygalacturonase production among *Aspergillus flavus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*: 56: 3885-3887.
- 13) Cui, Y. Q., van der Lans, R. G. J. M., Giuseppin, M. L. F. and Luyben, K. C. A. M. (1998). Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. *Enzyme and Microbial Technology*. 23: 157-167.
- 14) D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. and Bellincampi, D., (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic

- oligomers in plant-pathogen interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696: 237-244.
- 15) 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.
 - 16) de Vries, R. P., (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 10-20.
 - 17) de Vries, R. P., Kester, H., Poulsen, C., Benen, J. and Visser, J., (2000). Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 327-401-410.
 - 18) de Vries, R., Jansen, J., Aguilar, G., Parenicova, L., Jooste, V., Wulfert, F., Benen, J. and Visser, J., (2002). Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters*, 530: 41-47.
 - 19) Delgado, L., Trejo-Aguilar, B., Huitrón, C. and Aguilar, G. (1993). Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39: 515-519.
 - 20) Dixit, V. S., Kumar, A. R., Pant, A. and Khan, M. I. (2004). Low molecular mass pectate lyase from *Fusarium moniliforme*: similar modes of chemical and thermal denaturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 315: 477-484.
 - 21) Esquerré-Tugayé, M. T., Boudart, G. and Dumas, B., (2000). Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology Biochemistry*. 38: 157-163.
 - 22) Famurewa, O., Oyede, M. and Olutiola, P., (1993). Pectin transeliminase complex from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiology*, 38: 459-466.
 - 23) Favela-Torres, E., Cordova-López, J., García-Rivero, M. and Gutiérrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*. 33: 103-107.
 - 24) García-Maceira, F., Di Prieto, A., Huertas-González, M., Ruíz-Roldán, M. and Roncero, M., (2001). Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2191-2196.
 - 25) Gavilanes, M., (2005). Comunicación personal. Facultad de Química, UNAM.
 - 26) Gómez-Gómez, E., Ruíz-Roldán, M., Di Pietro, A., Roncero, M. and Hera, C., (2002). Role in pathogenesis of two endo- β -1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, 35: 213-222.
 - 27) Goudar, C. T., Strevett, K. A. and Shah, S. N. (1999). Influence of microbial concentration on the rheology of non-Newtonian fermentation broths. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 310-315.
 - 28) Have, A., Mulder, W., Visser, J. and van Kan, J., (1998). The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 11: 1009-1016.
 - 29) Herbert, C., O'Connell, R., Gaulin, E., Salesses, V., Esquerré-Tugayé, M. and Dumas, B., (2004). Production of cell wall-associated

- endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 140-147.
- 30) Heron, S., Benen, J., Scavetta, R., Visser, J. and Jurnak, F., (2000). Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *PNAS*, 97: 8762-8769.
 - 31) Joo An, H., Lurie, S., Greve, L., Rosenquist, D., Kirmiz, C., Labavitch, J. and Lebrilla, C., (2005). Determination of pathogen-related enzyme action by mass spectrometry analysis of pectin breakdown products of plant cell wall. *Analytical Biochemistry*, 338: 71-82.
 - 32) Justen, P., Paul, G. C., Nienow, A. W. and Thomas, C. R. (1998). Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering*. 59: 762-775.
 - 33) Kester, H. C. M. and Visser, J. (1994). Purification and characterization of pectin lyase B, a novel pectinolytic enzyme from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology letters*. 120: 63-68.
 - 34) Kitamoto, N., Yoshido-Yasuda, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. (2001a). Sequence analysis and overexpression of a pectin lyase gene (*pel1*) from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 65: 209-212.
 - 35) Kitamoto, N., Yoshido-Yasuda, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. (2001b). A second pectin lyase gene (*pel2*) from *Aspergillus oryzae* KBN616: its sequence analysis and overexpression, and characterization of the gene product. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 65: 209-212.
 - 36) Kobayashi, T., Hatada, Y., Higaki, N., Lusterio, D. D., Ozawa, T., Koike, K., Hawaii, S. and Ito, S. (1999). Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolates. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1427: 145-154.
 - 37) Lineweaver, H. and Jansen, E., (1951). Pectic enzymes. *Advances in Enzymology*, 11: 267-295.
 - 38) MacCabe, A. P., Orejas, M., Pérez-González, J. A. and Ramón, D. 1998. Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *Journal of Bacteriology*. 180: 1331-1333.
 - 39) Marsh, S. and Payne, G., (1984). Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 74: 1284-1289.
 - 40) Matsumoto, T., Katsura, D., Kondo, A. and Fukuda, H. (2002). Efficient secretory overexpression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase in *Escherichia coli* and single-step purification. *Biochemical Engineering Journal*. 12: 175-179.
 - 41) McIntyre, M. and McNeil, B. (1997). Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A60. *Enzyme and Microbial Technology*. 20: 135-142.
 - 42) Mendicuti, L., Trejo-Aguilar, B. and Aguilar, G., (1997). Thermostable xylanases produced at 37 °C and 45 °C by a thermotolerant *Aspergillus* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 146: 97-102.
 - 43) Minjares-Carranco, A., Trejo-Aguilra, B., Aguilar, G. y Viniegra-González, G., (1997). Physiological comparison between pectinase-producing

- mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 25-31.
- 44) Parenicova, L., Benen, J., Kester, H. and Visser, J., (2000). *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 345: 637-644.
 - 45) Piccoli-Valle, R. H., Passos, F. J. V., Brandi, I. V., Peternelli, L. A. and Solva, D. O. 2003. Influence of different mixing and aeration regimens on pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*. *Process Biochemistry*. 38: 849-854.
 - 46) Pildain, M., Vaamonde, G. and Cabral, D., (2004). Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 31-40.
 - 47) Rha, E., Park, H., Kim, M., Chung, Y., Lee, C-W. and Kim, J., (2001). Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*, 201: 105-109.
 - 48) Rocha-Valadez, J. A., Hassan, M., Corkidi, G., Flores, C., Galindo, E. and Serrano-Carreón, L. (2005). 6-Pentyl- α -Pirone production by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implication on fungal physiology. *Biotechnology and Bioengineering*. 91: 54-61.
 - 49) Ruijter, G. J. G. and Visser, J. (1997). Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiology Letters*. 151: 103-114.
 - 50) Sella, L., Castiglioni, C., Roberti, S., D'Ovidio, R. and Favaron, F., (2004). An endo-polygalacturonase (PG) of *Fusarium moniliforme* escaping inhibition by plant polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) provides new insights into the PG-PGIP interaction. *FEMS Microbiology Letters*, 240: 117-124.
 - 51) Shevchik, V., Kester, H., Benen, J., Visser, J., Robert-Baudouy, J. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., (1999). Characterization of the exopolygalacturonase lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology*, 181: 1652-1663.
 - 52) Shieh, M., Brown, R., Whitehead, M., Cary, J., Cotty, P., Cleveland, T. and Dean R., (1997). Molecular genetic evidence for involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3548-3552.
 - 53) Stutzenberger, F., (1992). Pectinase production. *Encyclopedia of Microbiology*, 3: 327-337.
 - 54) Surgey, N., Robert-Baudouy, J. and Condemine, G., (1996). The *Erwinia chrysanthemi pecT* gene regulates pectinase gene expression. *Journal of Bacteriology*, 178: 1593-1599.
 - 55) Whitehead, M., Shieh, M., Cleveland, T., Cary, J. and Dean, R., (1995). Isolation and characterization of polygalacturonase genes (*pecA* and *pecB*) from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3316-3322.
 - 56) Willats, W., McCartney, L., Mackie, W. and Knox, P., (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47: 9-27.

- 57) Witteveen, C. F. B. and Visser, J. (1995). Polyols pools in *Aspergillus niger*. FEMS Microbiology Letters. 134: 57-62.
- 58) Wubben, J., Have, A., van Kan, J. and Visser, J., (2000). Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambiente pH and carbon catabolite repression. Current Genetics, 37: 152-157.
- 59) Wubben, J., Mulder, W., Ten Have, A., Van Kan, A. and Visser, J., (1999). Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1596-1602.
- 60) Yoshikawa, K., Yamamoto, K. and Okada, S., (1993a). Isolation of *Aspergillus flavus* MO-5 producing two types of intracellular α -D-xylosidase: Purification and characterization of α -D-xylosidase I. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 57: 1275-1280.
- 61) Yoshikawa, K., Yamamoto, K. and Okada, S., (1993b). Purification and characterization of an intracellular α -D-xylosidase II from *Aspergillus flavus* MO-5. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 57: 1281-1285.
- 62) Yu, J., Chang, P., Bhatnagar, D. and Cleveland, T., (2000). Cloning of a sugar utilization gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. Biochimica et Biophysica Acta, 1493: 211-214.
- 63) Yu, J., Chang, P., Cary, J., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Payne, G. and Linz, J., (1995). Comparative mapping of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 2365-2371.