



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Purificación Parcial y Análisis Electroforético de
las Pectina Liasas de Aspergillus Sp. CH-Y-1043 y
un Híbrido Obtenido por Fusión de Protoplastos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

BIÓLOGO

PRESENTA :

FELIPE DELFINO RÍOS VALDEZ

Tutor:

CARLOS HUITRÓN VARGAS



2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Ríos
Valdez
Felipe Delfino
56 43 91 75
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
095362719

2. Datos del tutor

Dr
Carlos
Huitrón
Vargas

3. Datos del sinodal 1

Dra
María Elena del Carmen
Flores
Carrasco

4. Datos del sinodal 2

Dr
Pavel
Petrosyan

5. Datos del sinodal 3

Dra
Laura
Kawasaki
Watanabe

6. Datos del sinodal 4

Biól
Paola
Moreno
Alvarez

7. Datos del trabajo escrito

Purificación Parcial y Análisis Electroforético de las Pectina Liasas de Aspergillus
Sp. CH-Y-1043 y un Híbrido Obtenido por Fusión de Protoplastos
79 p
2006



FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
Purificación Parcial y Análisis Electroforético de las Pectina Liasas de Aspergillus Sp. CH-Y-1043 y
un Híbrido Obtenido por Fusión de Protoplastos.
realizado por Felipe Delfino Ríos Valdez

con número de cuenta 09536271-9 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario Dr. Carlos Huitrón Vargas

Propietario Dra. María Elena del Carmen Flores Carrasco

Propietario Dr. Pavel Petrosyan

Suplente Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Suplente Biól. Paola Moreno Alvarez

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 25 de septiembre
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE

del 2006

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



Esta tesis se realizo en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos Huitrón Vargas.

Así como no entiendo cómo los orbes flotan en el espacio, así también pueden existir cosas sobre la tierra que no acierte a comprender.

Marques de Sade.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Dr. Carlos Huitrón por dejarme participar en su grupo de trabajo, por su asesoramiento, apoyo y por su gran ayuda en mi formación profesional.

A la Dra. Maria Elena del Carmen Flores Carrasco por su asesoramiento en la última etapa de esta tesis.

Al Dr. Pavel Petrosyan y en especial a la técnico académica QFB Rosalba Pérez Villalva, por su asesoramiento técnico en la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Fermín, Ale Cruz, Evelin, por hacer divertida la estancia en laboratorio.

A mis amigos Paola y Alfonso al alentarme en cada momento.

A la familia Valdez por su apoyo.

A mis padres, Delfino y Esperanza Olivia, y a mi hermano Isaac, con los que he crecido, compartido, disfrutado y me he formado, por darme su apoyo y ayuda incondicional, gracias.

A Ale que quien con su amor y apoyo me ayuda a afrontar los diferentes obstáculos y a ser una mejor persona, gracias Amor. Je t'aime.

INDICE.

| | PAGINA. |
|---|---------|
| RESUMEN. _____ | 9 |
| INTRODUCCIÓN. _____ | 10 |
| ENZIMAS. _____ | 10 |
| IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS. _____ | 11 |
| ORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS. _____ | 12 |
| PRODUCCIÓN DE ENZIMAS. _____ | 12 |
| MEJORAMIENTO DE CEPAS. _____ | 14 |
| MUTAGÉNESIS. _____ | 14 |
| FUSIÓN DE PROTOPLASTOS. _____ | 16 |
| PECTINAS. _____ | 17 |
| ENZIMAS PÉCTICAS. _____ | 21 |
| MODO DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS. _____ | 21 |
| APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS. _____ | 24 |
| PECTINA LIASA. _____ | 26 |
| IMPORTANCIA DE LA PECTINA LIASA. _____ | 28 |
| DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE PECTINA LIASA. _____ | 29 |
| ANTECEDENTES. _____ | 30 |
| OBJETIVO. _____ | 32 |
| MATERIALES Y MÉTODOS. _____ | 33 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN. _____ | 47 |

CONCLUSIONES._____74

BIBLIOGRAFÍA._____75

RESUMEN.

Las pectinas o sustancias pécticas son nombres colectivos para un grupo de polisacáridos cercanamente asociados, los cuales están presentes en las paredes celulares vegetales, participan en complejos procesos fisiológicos y determinan la rigidez del tejido vegetal. Las sustancias pécticas son responsables de la consistencia, turbiedad y apariencia de los jugos de frutas; su presencia causa un considerable aumento en la viscosidad, afectando los procesos de filtración, clarificación y concentración. Las sustancias pécticas son degradadas naturalmente por enzimas pectinolíticas. Estas enzimas han tenido considerables aplicaciones industriales en la degradación de los tejidos vegetales, particularmente en las industrias de procesamiento y manufactura de jugos y purés de frutas y vegetales, incrementando la producción de jugos y sólidos de los frutos. Dentro de las enzimas pécticas, la pectina liasa es hasta ahora la única enzima conocida que es capaz de hidrolizar pectina sin la necesidad de la acción anterior de otra enzima. Un paso importante durante el proceso de producción de enzimas de interés industrial es el mejoramiento genético de las cepas. Esta actividad ha estado dirigida principalmente a obtener cepas que incrementen los rendimientos del producto para reducir los costos del proceso. Dentro de nuestro grupo de investigación, se utilizó la fusión de protoplastos para mejorar dos cepas con diferentes características que complementan las actividades del complejo pectinolítico, obteniéndose híbridos interespecie con un alta producción de pectinasas extracelulares, pero sobresaliendo la cepa HZ, la cual presenta una producción de actividad de pectina liasa 4.5 veces mayor que las cepas parentales. Ya que la cepa HZ es el resultado de la fusión de protoplastos interespecie, es posible que la cepa HZ presente una mayor inducción de la pectina liasa de alguna de las cepas parentales o la producción de una enzima diferente que sea más activa, ambas posibilidades resultado de una recombinación genética. Se decidió aislar la pectina liasa de cada cepa, obtenida de la fermentación en cáscara de limón como única fuente de carbono y comparar por electroforesis y zimogramas a la pectina liasa de cada una de ellas. Los resultados mostraron que cada cepa presenta una especie distinta de pectina liasa, presentando el híbrido HZ una pectina liasa intermedia a la de los progenitores, resultado de una recombinación genética a través de la fusión de protoplastos. Asimismo se logró purificar parcialmente la pectina liasa de HZ y de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043, identificando el peso molecular de cada una, la de HZ con un peso de 30 KD y la de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 con un peso de 26 KD.

INTRODUCCIÓN.

ENZIMAS.

Las enzimas son moléculas proteicas complejas presentes en las células, donde actúan como catalizadores que llevan a cabo cambios químicos en las sustancias. Sin las enzimas no podría haber vida. Con el desarrollo de la bioquímica se ha conocido la gran variedad de enzimas presentes en las células vivas y su modo de acción. Aunque las enzimas son sintetizadas únicamente en las células, muchas de ellas pueden ser separadas de las células para seguir llevando a cabo su función catalítica. Esta habilidad para realizar transformaciones químicas específicas fuera de la célula, ha incrementado el uso de las enzimas en procesos industriales, así como en aplicaciones médicas [Smith, 1996].

La actividad de una enzima se debe a su naturaleza proteica, dada por la presencia y arreglo de los aminoácidos que la integran y generalmente lleva a cabo su actividad sin ser destruida en la reacción. Las enzimas son altamente específicas y llevan a cabo su función solo sobre ciertos tipos de compuestos, los substratos, de tal manera que una mínima cantidad de enzima puede actuar sobre grandes cantidades de substrato, al unirse al substrato a través de una orientación óptima hacen y rompen enlaces químicos generando nuevos compuestos. La función catalítica de la enzima no se debe únicamente a su estructura primaria y

secundaria, sino también, a la terciaria que genera un intrincado plegamiento configuracional. Es esta configuración la que dota a la proteína con una función catalítica específica. La modificación de esta configuración debido a, por ejemplo, un cambio en el pH o en la temperatura, puede generar la pérdida de la actividad. Para algunas enzimas hay una necesidad obligada por factores adicionales para realizar su función, llamados cofactores; éstos pueden ser iones metálicos, nucleótidos, etc. Debido a su especificidad, las enzimas pueden diferenciar químicos con estructuras semejantes y pueden catalizar reacciones a temperaturas relativamente bajas y a pH bajo en comparación con los catalizadores químicos. En aplicaciones industriales, esto puede dar como resultado productos de una alta calidad [Smith, 1996; Groot *et al.*, 2000].

IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS.

Los catalizadores químicos que suelen emplearse en la industria carecen generalmente de especificidad para la reacción que catalizan y, a menudo, han de ser usados en condiciones extremas de temperatura y presión. En comparación, las enzimas presentan una elevada especificidad para las reacciones que catalizan y son capaces de mantener su actividad en condiciones suaves de temperatura y presión [Walker, 1988]. Además, las enzimas son biodegradables y no tóxicas y pueden ser producidas por microorganismos en grandes cantidades sin la necesidad de equipos especiales [Smith, 1996]. Por lo tanto, no es sorprendente que las enzimas hayan encontrado una serie de aplicaciones como

catalizadores en distintos procesos industriales, particularmente en la química fina, las industrias de alimentos, farmacéutica y en los análisis clínicos [Walker, 1988].

ORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS.

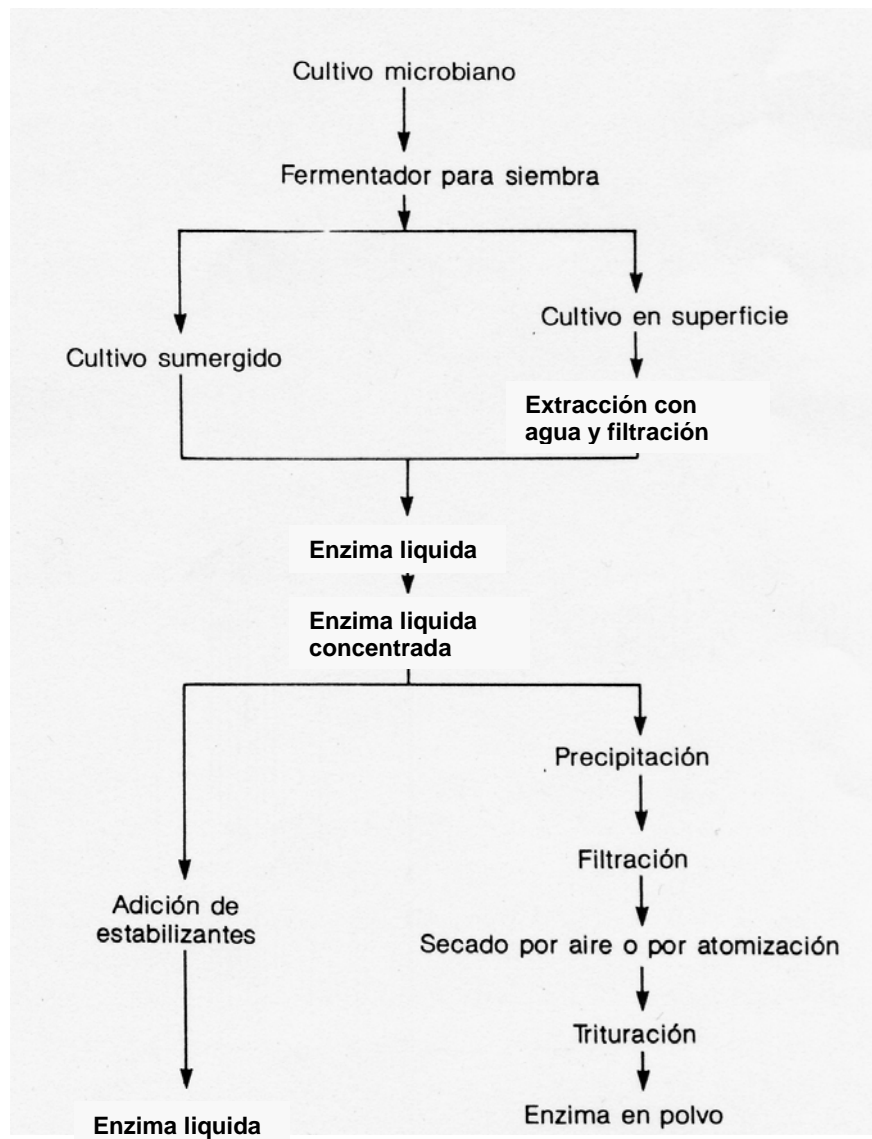
La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria son enzimas extracelulares de origen microbiano [Ward, 1989], así encontramos que más de 50 bacterias y hongos producen enzimas para la industria. Las más prominentes son las especies de *Bacillus*, como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y los hongos filamentosos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*. Estos organismos no son patógenos, no producen toxinas y tienen un conocido registro de seguridad, ya que son consideradas GRAS (Generally Recognized as Safe) [Glazer y Nikaido, 1995].

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS.

Las enzimas microbianas se obtienen por fermentación en condiciones controladas utilizando cepas de alto rendimiento, ya sea en cultivos en superficie o sumergidos. En la figura I, se muestran las diversas etapas del proceso de producción de enzimas extracelulares industriales. Las células pueden excretar a algunas enzimas al medio de cultivo y la primera etapa de recuperación de éstas, a partir de los cultivos sumergidos consiste en la separación del líquido libre de células, que contiene a las enzimas, mediante, filtración o centrifugación. En el caso de los procesos de fermentación en cultivos en superficie que se utilizan

principalmente para la producción de enzimas extracelulares fúngicas, la masa semisólida de la post-fermentación se extrae usualmente con agua antes de ser filtrada. El sobrenadante o el filtrado que contiene la enzima se concentra y se puede vender como una preparación enzimática líquida normalizada que contiene conservadores y/o estabilizantes, o se precipita, se seca y se muele con objeto de obtener una enzima en forma de polvo o de gránulos [Ward, 1989].

Figura 1. Diagrama de flujo para la producción de enzimas industriales mediante fermentación [Ward, 1989].



MEJORAMIENTO DE CEPAS.

Un paso importante durante el proceso de producción de enzimas de interés industrial es el mejoramiento genético de las cepas. Esta actividad ha estado dirigida principalmente a obtener cepas mutantes que incrementen los rendimientos del producto para reducir los costos del proceso. Aunque los mecanismos bioquímicos y genéticos que controlan la expresión de la síntesis de las enzimas ahora ya son conocidos, la experiencia ha mostrado que el mejoramiento de cepas puede ser logrado aún en ausencia de un conocimiento detallado de dichos mecanismos. Un buen ejemplo de mejoramiento es el logrado en *Penicillium chrysogenum* en donde se incrementó hasta 500 veces la producción de penicilina con respecto a la cepa silvestre [Rowlands, 1984].

MUTAGÉNESIS.

La modificación o mejoramiento de la cepas ha sido realizada en gran parte utilizando el método tradicional de mutagénesis mediante el empleo de agentes físicos y químicos, como lo son entre otros, la nitrosoguanidina (NTG) y el metil etano sulfonato (MES) que reaccionan con el ADN, transfiriendo un grupo metilo, causando transiciones (cambio de una purina por otra o de una pirimidina por otra) y transversiones (cambio de una purina por una pirimidina) [Eder et al., 1989; Brookes, 1990]; el ácido nitroso (AN) causa desaminaciones oxidativas en la adenina, citosina y guanina que dan lugar a la hipoxantina, uracilo y xantina respectivamente [Schuster, 1960] y la luz ultravioleta (UV) que provoca

dimerizaciones entre pirimidinas adyacentes o de la pirimidinas que se encuentran entre cadenas complementarias causando entrecruzamiento [Glickman et al., 1986]. La aplicación de un programa de mejoramiento genético en el hongo celulolítico *Penicillium pinophilum* 87160III, permitió seleccionar durante tratamientos sucesivos de mutagénesis con UV y NTG a la mutante NTGIII/6 en la que se incrementó 5 veces la actividad de carboximetilcelulasa, 2 veces la actividad de xilanasas, 2 veces la actividad de beta glucosidasas y 3 veces la actividad en papel filtro con respecto a la cepa progenitora [Brown et al., 1987].

En el sistema pectinolítico, hay poca información de trabajos sobre mejoramiento genético. Algunos estudios realizados con éxito han sido reportados por Szanjer [1974], quien llevó a cabo la mutagénesis de *Penicillium* sp. 74/B con luz ultravioleta y etileneimina y obtuvo mutantes hiperproductoras que incrementaron de 2 a 3 veces la producción de poligalacturonasas al ser crecidas en pectina, aunque la producción de pectinesterasas disminuyó. Por otro lado, han sido obtenidas mutantes insensibles a represión catabólica por glucosa en *Aspergillus niger* que incrementaron 3.8 veces la producción de endopectinasas en pectina [Antier et al., 1993] y también mutantes insensibles a la represión catabólica por glicerol de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 que produjeron mayor cantidad de endopectinasas cuando crecieron en cáscara de limón [Solis et al., 1990].

FUSIÓN DE PROTOPLASTOS.

Otra alternativa para el mejoramiento de cepas es la fusión de protoplastos para la obtención de híbridos, la cual es una metodología que ha demostrado ser útil para realizar diferentes tipos de estudios con microorganismos y células vegetales, para lograr recombinaciones genéticas intraespecie, interespecie e intergenéricas [Peberdy, 1979]. Es decir, se puede complementar información genética que de otra forma no podría ocurrir en la naturaleza. Este sistema permite superar los problemas de incompatibilidad que pudieran presentarse entre los hongos [Wangemann-Budde y Schauz, 1991].

Para poder llevar a cabo la fusión es necesaria la obtención de protoplastos, que son células desprovistas de la pared celular por la acción de enzimas líticas [Anné, 1982]. Los protoplastos representan entidades organizadas con un metabolismo activo y transferencia de energía [Davis, 1985], por lo que ofrecen un modelo interesante para llevar a cabo estudios bioquímicos y morfológicos en los hongos. En estos organismos, las poblaciones de protoplastos pueden ser heterogéneas con respecto a los organelos que contienen y son capaces de regenerar a células normales cuando se encuentran en los medios adecuados [Bos, 1985].

La fusión de protoplastos ha sido utilizada en estudios genéticos básicos, sin embargo, su aplicación práctica más importante es el mejoramiento genético de cepas productoras de enzimas u otros compuestos de importancia industrial [Peberdy, 1991]. En hongos filamentosos se ha llevado a cabo la fusión de

protoplastos para mejorar la producción del antibiótico penicilina en híbridos obtenidos por fusión interespecie de *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium stoloniferum* [Anné, 1982], la producción de β -glucosidasa en *Aspergillus niger* [Hoh et al., 1992], el mejoramiento de *Trichoderma harzanium* como agente biocontrol contra patógenos de plantas [Pe'er y Chet, 1990] y la actividad lipolítica en híbridos intraespecie de *Penicillium caseicolum* [Reymond et al., 1988]. También la fusión de protoplastos ha sido aplicada para el mejoramiento de cepas industriales que son utilizadas para la elaboración de alimentos fermentados como el sake, el miso y la salsa de soya, en donde se requiere la participación de varias enzimas [Ushijima, 1993]. De esta manera se han obtenido híbridos que producen mayor actividad de proteasa, amilasa y peptidasa que cualquiera de las dos cepas progenitoras [Ushijima et al., 1990].

PECTINAS.

Las pectinas o sustancias pécticas son nombres colectivos para un grupo de polisacáridos cercanamente asociados, los cuales están presentes en las paredes celulares vegetales, participan en complejos procesos fisiológicos, como crecimiento celular, diferenciación celular y determinan la rigidez del tejido vegetal. También tienen un papel importante en el mecanismo de defensa contra los fitopatógenos [Schols y Voragen, 2003].

Las sustancias pécticas son polisacáridos de un alto peso molecular, que como ya se mencionó constituyen una importante parte de la pared celular primaria [Konno

y Yamasaki, 1982; Fogarty y Kelly, 1983], además, de ser el principal componente de la lamela media, una delgada capa de material adhesivo extracelular encontrado entre las paredes primarias de células vegetales jóvenes adyacentes [Fogarty y Kelly, 1983; Alkorta et al., 1998].

La Sociedad Americana de Química (American Chemical Society) clasifica a las sustancias pécticas dentro de cuatro grupos principales: protopectinas, ácidos pectínicos, pectinas y ácidos pécticos, donde la protopectina es insoluble en agua, y las otras tres son totalmente o parcialmente solubles [Alkorta et al., 1998].

Las protopectinas son aquellas sustancias pécticas presentes en las plantas y de las cuales se originan las sustancias pécticas; los ácidos pectínicos son ácidos coloidales poligalacturónicos que contienen una pequeña porción de grupos éster metilo; las pectinas son ácidos pectínicos que presentan variaciones en la cantidad de grupos éster metilo y los ácidos pécticos o pectato son ácidos coloidales poligalacturónicos que esencialmente no presentan grupos éster metilo [Fogarty y Kelly, 1983]. Una esterificación del 100% en los ácidos poligalacturónicos conlleva a un contenido teórico de metoxilación del 16.3% en las pectinas [Kertesz, 1951].

Químicamente, las sustancias pécticas son esencialmente heteropolisacáridos ramificados, con una cadena central constituida de ácidos galacturónicos, parte de los cuales están metilesterificados. La Sociedad Americana de Química ha acordado que la molécula pectínica (Figura II) consiste de una cadena estructural formada por unidades de ácido D-galacturónico unidos por enlaces axial-axial α -(1,4) (este segmento es llamado smooth region o región lisa). Esta cadena

contiene regiones ricas en L-ramnosa, con cadenas laterales de arabinosa y xilosa (esta región es llamada hairy region o región ramificada). Los grupos carboxílicos de los ácidos galacturónicos están parcialmente esterificados por grupos metilo y parcialmente o completamente neutralizados por iones de sodio, potasio o amonio. Algunos de los grupos hidroxilo C₂ y C₃ pueden estar acetilados [Alkorta et al., 1998; Schols y Voragen, 2003].

Las sustancias pécticas son responsables por la consistencia, turbiedad y apariencia de los jugos de frutas. De hecho, la presencia de las sustancias pécticas en los jugos de frutas causa un considerable aumento en su viscosidad, afectando los procesos de filtración, clarificación y una subsiguiente concentración [Alkorta et al., 1998].

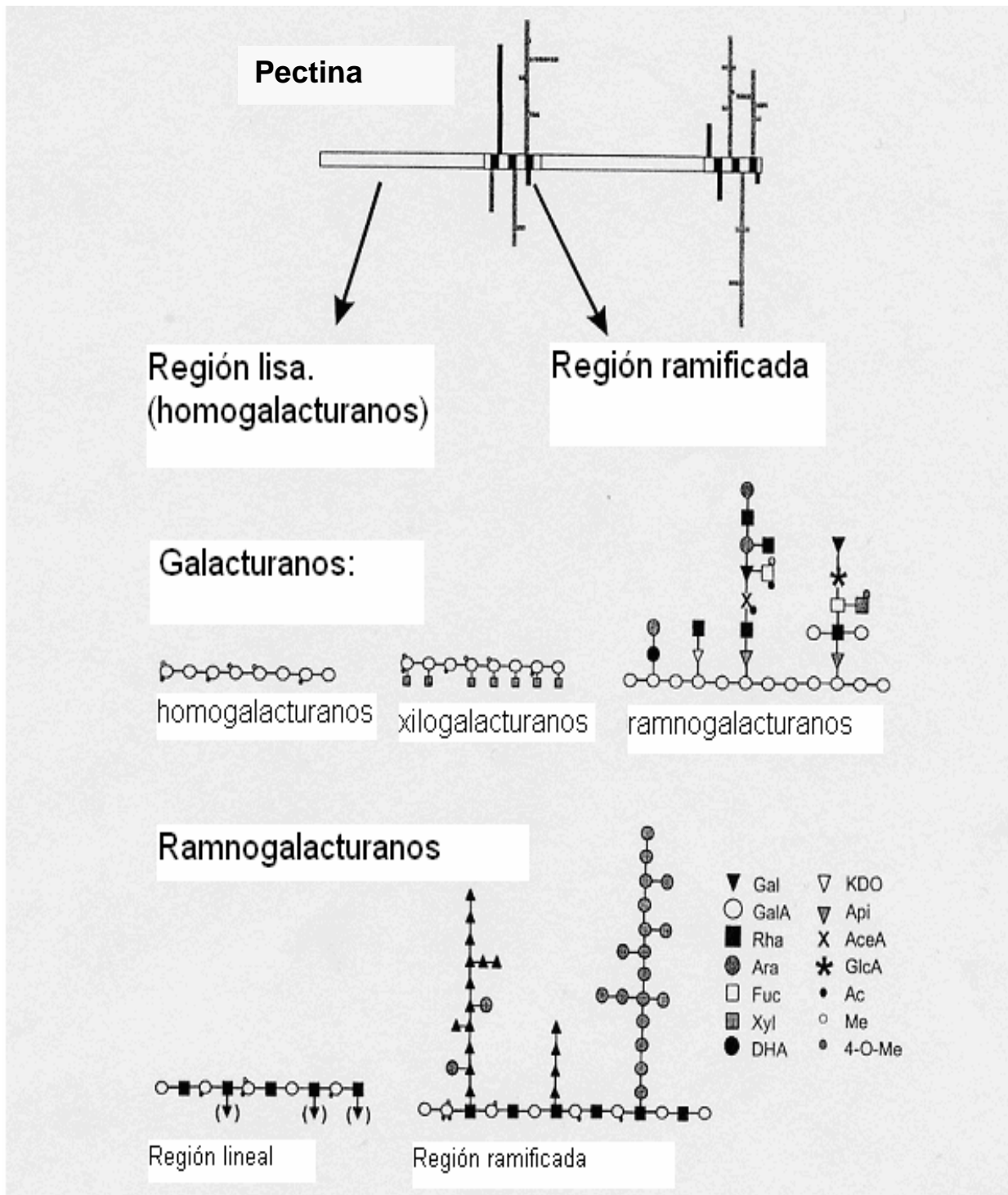


Figura II. Elementos estructurales de pectina. La presencia, la cantidad y la estructura química en los segmentos puede variar dependiendo del origen de la pectina. Gal. Galactosa; GalA, ácido galacturónico; Rha, ramnosa; Fuc, fucosa; Xyl, xilosa; DHA, ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico; KDO, ácido 2-keto-3-deoxi-D-mano-octulosónico; Api, apiosa; AceA, ácido acérico; ALCA, ácido glucurónico; Ac, grupo acetil; Me, ester metilo; 4-O-Me, 4-O-eter metil [Schols y Voragen, 2003].

ENZIMAS PÉCTICAS.

Las sustancias pécticas son degradadas naturalmente por enzimas pectinolíticas.

La clasificación de las enzimas pécticas está basada en su modo de ataque a las uniones de galacturonatos en la molécula de la sustancia péctica. Básicamente existen tres tipos de enzimas pécticas: enzimas de-esterificadoras (pectinesterasas), enzimas depolimerasas (pectinasas: hidrolasas y liasas) y protopectinasas [Takuo, 1992; Alkorta *et al.*, 1998; Benen y Voragen, 2003].

MODO DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS.

Las pectinesterasas catalizan la desesterificación del grupo metoxilo de la pectina (Figura III) formando ácido péctico o pectato y metanol y son producidas por hongos, bacterias, levaduras y plantas vasculares. Estas pectinesterasas están presentes prácticamente en todas las preparaciones pectinolíticas comerciales y pueden estar involucradas en cambios en las sustancias pécticas de frutas y vegetales durante la maduración, almacenamiento y procesamiento. Las depolimerasas rompen los enlaces glicosídicos α -(1-4) entre los monómeros de ácido galacturónico en las sustancias pécticas, ya sea por hidrólisis (hidrolasas) o por β -eliminación. Las hidrolasas han sido divididas en cuatro grupos: aquellas que prefieren pectato fueron llamadas poligalacturonasas, mientras que aquellas que prefieren degradar pectina fueron llamadas polimetilgalacturonasas. Los prefijos endo y exo usados junto con estos nombres denotan un patrón de acción interno o externo de la molécula de pectina. Las endopoligalacturonasas son

producidas por una gran variedad de organismos como hongos y bacterias, unas pocas levaduras y plantas vasculares. Las exopoligalacturonasas, sin embargo, se han presentado en diferentes frutos y vegetales, así como también, en hongos y en pocas bacterias. Las liasas que también son llamadas trans-eliminadas, rompen el enlace glicosídico tanto de pectato (endo y exopoligalacturonato liasa) como en pectina (endopolimetilgalacturonato liasa). Las polimetilgalacturonato liasas (de las cuales todas presentan actividad endo) son las únicas que hidrolizan pectina [Roumbots y Pilnik, 1980; Fogarty y Kelly, 1983; Alkorta, et al., 1998].

Finalmente, las protopectinasas son las enzimas solubilizadoras que liberan de la protopectina a una pectina altamente polimerizada y soluble en agua. Estas son clasificadas en dos tipos: el tipo A, que actúa en la región de protopectina compuesta por ácido poligalacturónico y el tipo B que actúa en las cadenas de polisacáridos que conectan a la cadena de ácido poligalacturónico con los constituyentes de la pared celular [Takuo, 1992; Alkorta, et al., 1998].

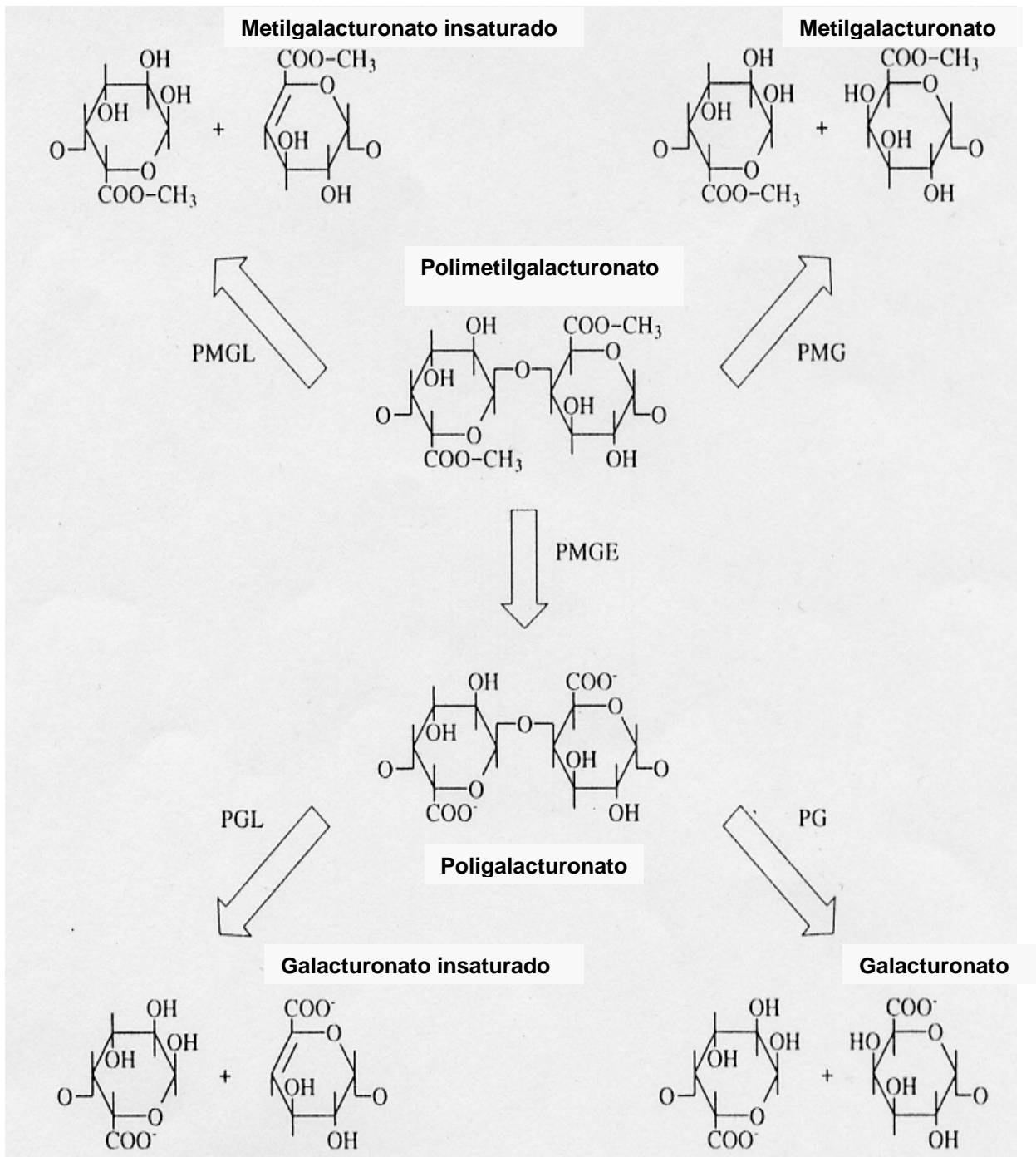


Figura III. Modo de acción de las pectinasas sobre la molécula de pectina. PMGL, polimetilgalacturonato liasa (pectina liasa); PMG, polimetilgalacturonasa (pectina hidrolasa); PMGE, polimetilgalacturonato esterasa (pectinesterasa); PGL, poligalacturonato liasa (pectato liasa); PG, poligalacturonasa (pectato hidrolasa) [Alkorta, *et al.*, 1998].

APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS.

Aunque las enzimas pécticas llevan a cabo su mejor papel en la destrucción y descomposición de frutas y vegetales, éstas también han tenido considerables aplicaciones industriales en la descomposición de los tejidos vegetales, particularmente en las industrias de procesamiento y manufactura de jugos y purés de frutas y vegetales. La utilización de las enzimas tiene las siguientes ventajas: 1) incremento en la producción de jugos y sólidos de los frutos; 2) reducción de la viscosidad de concentrados y 3) modificación y solubilización de las estructuras pécticas en los frutos, para la sedimentación y clarificación de jugos [Fogarty y Kelly, 1983]. En este sentido la adición de enzimas exógenas, por ejemplo, pectinasas, permiten una mayor degradación específica, necesaria para obtener texturas uniformes, no posibles con calor y al mismo tiempo preservan el color y las vitaminas. Estas enzimas son aún más importantes cuando se producen concentrados claros algo que no es posible obtener sin el uso de las pectinasas exógenas. Además, las enzimas exógenas, refuerzan las bajas actividades de las pectinasas endógenas presentes en las frutas, liberadas durante la maceración de la fruta. Las pectinasas utilizadas son pectina liasa (PL), pectina esterasa (PE) y poligalacturonasa (PG), las cuales se agregan al macerado, en cantidades de 40-200 g ton⁻¹ de fruta, por 30-60 min a 15 a 30°C. Estas enzimas bajan la viscosidad de la pectina a través de su hidrólisis e incrementan la prensabilidad de la fruta conforme el gel de la pectina se colapsa. También durante este proceso, el jugo y el color de los pigmentos localizados en las cáscaras son más fáciles de liberar. En otros casos, las enzimas son

agregadas al jugo, después de prensar, como un paso de despectinización. Las pectinasas hidrolizan a la pectina, permitiendo la clarificación del jugo por la neutralización de las cargas electrostáticas entre los ácidos urónicos, proteínas y taninos. La adición de agentes finos, con una consecuente filtración, o ultrafiltración, permite la clarificación del jugo, el cual puede ser concentrado a más de 70-72°Brix, lo que permite un incremento en la capacidad de almacenamiento y evita la contaminación microbiana [Grassin y Fauquembergue, 1996]

Las enzimas pécticas también han sido aplicadas en la maceración y solubilización de los tejidos de los frutos en el proceso llamado licuefacción de tejidos, donde se requiere la integridad de la pared celular del tejido [Alkorta et al., 1998].

Actualmente la mayoría de las preparaciones comerciales de enzimas pécticas son usadas en la industria de procesamiento de frutos y considerando que las enzimas pécticas por sí mismas representan un cuarto de la producción de enzimas a nivel mundial, se puede concluir que se está tratando con un inmenso mercado que puede ser beneficiado por la aplicación de innovaciones tecnológicas que reduzcan los costos e incrementen la producción [Alkorta et al., 1998].

PECTINA LIASA.

La pectina liasa o endopolimetilgalacturonato liasa es hasta ahora la única enzima conocida que es capaz de hidrolizar pectina altamente esterificada, como la pectina de la manzana, sin la necesidad de la acción anterior de otra enzima [Fogarty y Kelly, 1983; Alaña et al., 1991; Sakiyama et al., 2001]. La pectina liasa (Figura III) rompe el enlace D-galacturonosídico α -1,4 [Sutherland, 1995] por β eliminación, dando como resultado la formación de ácidos galacturónicos insaturados con un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 de la molécula [Albersheim y Killias, 1962; Szajer y Szajer, 1982]. Esta enzima requiere que los residuos de ácido galacturónico que están formando el enlace cuenten con un grupo metilesterificado para poder actuar [Van Alebeek et al., 2002; Benen y Visser, 2003].

La mayoría de las pectina liasas son de origen fúngico con el reporte de algunas endopolimetilgalacturonato liasas de origen bacteriano; todas cuentan con actividad endo y causan un rápido decremento en la viscosidad de las pectinas [Roumbots y Pilnik, 1980; Fogarty y Kelly, 1983; Benen y Visser, 2003]. Las propiedades de algunas pectina liasas se muestran en la Tabla I, donde se puede observar que algunas de las pectina liasas de origen fúngico que han sido aisladas provienen de los géneros *Neurospora*, *Botrytis*, *Penicillium* y *Aspergillus* [Benen y Visser, 2003].

Tabla I. Propiedades de algunas pectina liasas [Rombouts y Pilnik, 1980].

| Fuente de la enzima | Peso Molecular | Punto Isoeléctrico | Actividad específica (unidades/mg de proteína) | pH óptimo | K _m por pectina (mg/ml) |
|-------------------------------|----------------|--------------------|--|-----------|------------------------------------|
| Hongos | | | | | |
| <i>Alternaria mali</i> I | 28000 | | 176 | 8.7 | |
| II | 31000 | | 577 | 8.2 | |
| <i>Aspergillus fonsecaeus</i> | | | 19 | 5.2 | |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | 32000 | 7.7 | 355 | 6.0 | |
| <i>Aspergillus niger</i> | | 3.5 | 24 | 5.2 | |
| <i>Aspergillus niger</i> I | 35400 | 3.65 | 17 | 6.0 | |
| II | 33100 | 3.75 | 44 | 6.0 | 5.0 |
| <i>Aspergillus sojae</i> | 32000 | | 77 | 5.5 | 0.9 |
| <i>Dothidea ribesia</i> | 31200 | 8.9 | | 8.4 | 3.2 |
| Bacterias | | | | | |
| <i>Erwinia aroideae</i> | 30000 | | 400 | 8.1 | |

Basándose en su nombre y en la clasificación que da la Comisión de Enzimas (Enzyme Commission) se podría esperar una estricta separación basada en la especificidad por el sustrato tanto de la pectina liasa, como de la pectato liasa (poligalacturonato liasa), sin embargo, esto no ocurre. Para muchas pectina liasas, la actividad específica se incrementa al aumentar el grado de metilesterificación [Rombouts y Pilnik, 1980; Fogarty y Kelly, 1983; Benen y Visser, 2003], ya que algunas de ellas tienen su más alta actividad específica cuando actúan sobre pectinas con un moderado grado de metilesterificación (20-50%) en lugar de pectina con un grado de metilesterificación de 0% [Benen y Visser, 2003]. El único factor discriminativo entre la pectina y la pectato liasa es que la pectato liasa presenta un requerimiento absoluto de iones de calcio (Ca²⁺) para llevar a cabo la catálisis [Benen y Visser, 2003].

El mejor sustrato para la endopolimetilgalacturonato liasa es pectina altamente metilesterificada, por lo tanto el ácido galacturónico y el éster glicil del poligalacturonato no son hidrolizados. El incremento en la afinidad de la pectina liasa por pectina con mayor grado de metilesterificación se demostró en un pH óptimo de 5-6, pero a un menor pH, el grado de metilesterificación puede cambiar a un valor más bajo. Aunque el calcio no es requerido por la pectina liasa para llevar a cabo su actividad, varios autores han observado que el calcio y otros cationes influyen sobre la actividad de la enzima dependiendo del pH y del grado de esterificación del sustrato [Roumbots y Pilnik, 1980; Fogarty y Kelly, 1983]. A valores de pH arriba del óptimo, el calcio (Ca^{2+}) promueve la actividad notablemente en sustratos alcalinos parcialmente desesterificados. La adición de Ca^{2+} a la mezcla de reacción también trae como resultado una disminución del pH óptimo [Benen y Visser, 2003].

IMPORTANCIA DE LA PECTINA LIASA.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la pectina liasa es la única enzima capaz de hidrolizar pectina sin la ayuda de otra enzima [Szajer y Szajer, 1982; Fogarty y Kelly, 1983; Alaña, et al., 1991; Alkorta, et al., 1998; Sakiyama et al., 2001]. Esto a pesar de que se ha reportado la presencia de actividad de polimetilgalacturonasa, la existencia de estas enzimas parece ser cuestionable ya que es posible que preparaciones con poligalacturonasa conteniendo pectinesterasa hayan sido tomadas como preparaciones conteniendo polimetilgalacturonasa [Fogarty y Kelly, 1983; Alkorta, et al., 1998].

La enzima pectina liasa actualmente se utiliza junto con las enzimas poligalacturonasa y la pectin esterasa en diferentes preparaciones para llevar a cabo diferentes procesos, como son: el mejoramiento de la maceración de la manzana y la extracción de jugo del macerado; así como, el mejoramiento de la maceración de las moras, para obtener productos con un color más intenso; separación de fibras del macerado, produciendo jugos vegetales de baja viscosidad; producción de jugos claros a través de una extracción continua; clarificación de jugos de frutas; producción de concentrados de jugos de frutas cítricas y tropicales; aumento del color de los vinos tintos y en la eliminación de problemas de filtración en la producción de vinos jóvenes [Uhlig, 1998].

Por otro lado, trabajos recientes han mostrado que la pectina liasa pura, usada a pH de 3 a 4, puede clarificar jugo de manzana. Esta investigación también muestra que el jugo de manzana conteniendo pectina esterificada en un 91-92% puede ser fácilmente clarificado por pectina liasa pura [Kashyap *et al.*, 2001].

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PECTINA LIASA.

La actividad de endopolimetilgalacturonato liasa (pectina liasa) puede ser determinada por la aparición de dobles enlaces, producto de la actividad de pectina liasa sobre la pectina, a través del incremento de la absorbancia a una longitud de onda de 235 nm, causada por la presencia del doble enlace del ácido metilgalacturónico insaturado [Roumbots y Pilnik, 1980; Fogarty y Kelly, 1983].

ANTECEDENTES.

La cepa *Aspergillus* sp. CH-Y-1043, aislada del suelo de una zona henequera del estado de Yucatán, produce pectinasas extracelulares (endopectinasa, exopectinasa, pectina liasa y pectina esterasa) [Saval et al., 1982; Saval y Huitrón, 1983; Huitrón et al., 1984], observándose que esta cepa sintetiza mayor cantidad de pectinasas cuando crece en desechos agroindustriales que contienen pectina [Larios et al., 1989]. También se ha reportado que los filtrados libres de células cuentan con una actividad específica mayor que la de algunas preparaciones comerciales y por lo tanto tiene un gran potencial para la producción de pectinasas a gran escala [Saval et al., 1982; Saval y Huitrón, 1983].

La cepa *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 presenta también producción de pectinasas y producción de pectina liasa bajo ciertas condiciones de temperatura y pH [Ortiz, 1991]. Delgado y colaboradores [1993] demostraron que la cepa *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 produce actividad de pectina liasa en buenos niveles (160 unidades de pectina liasa por mililitro).

La enzima pectina liasa es la única enzima capaz de degradar pectina sin la acción anterior de otra enzima [Szajer y Szajer, 1982; Fogarty y Kelly, 1983; Alaña et al., 1991; Alkorta et al., 1998; Sakiyama et al., 2001], siendo esta característica de suma importancia para la industria.

Al contar estas dos cepas con diferentes características que las hacen buenas productoras del complejo pectinolítico se decidió llevar a cabo la obtención de

híbridos interespecie por medio de la fusión de protoplastos como un paso en el mejoramiento genético de estos dos microorganismos [Solis et al., 1997]. De esta manera se obtuvieron híbridos con un alta producción de actividad de pectinasas (endopectinasa y pectina liasa), sobresaliendo entre éstos la cepa HZ la cual presenta una producción de actividad de pectina liasa 4.5 veces mayor que las cepas parentales [Solis, 1997].

OBJETIVO.

Dado que la cepa HZ que es un híbrido obtenido por fusión de protoplastos produce elevada actividad de pectina liasa extracelular, mayor a la que producen las cepas parentales *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y *Aspergillus flavipes* ATCC-16795, es posible que en la cepa HZ se presente una mayor inducción de la pectina liasa de alguna de las cepas parentales o la producción de una enzima diferente que sea más activa, ambas posibilidades como resultado de una recombinación genética.

En este trabajo el objetivo fue analizar y comparar la pectina liasa de cada cepa, obtenida de la fermentación en cáscara de limón como única fuente de carbono, a través de la electroforesis y zimogramas, y posteriormente purificar por cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex A-50 la pectina liasa de la cepa parental *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y la del Híbrido HZ, para compararlas entre si.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Microorganismos utilizados.

Las cepas utilizadas para llevar a cabo este estudio son hongos filamentosos saprófitos. La cepa *Aspergillus* sp. CH-Y-1043, aislada del suelo de una zona henequera del estado de Yucatán y seleccionada en nuestro laboratorio [Saval y Huitrón, 1983]; *Aspergillus flavipes* ATCC-16795, cepa adquirida en la ATCC (American Type Culture Collection) de E.U.A. y el híbrido HZ, obtenido por fusión de protoplastos interespecie entre las dos cepas mencionadas anteriormente [Solís, 1997]. Estos microorganismos presentan actividad de pectina liasa extracelular al crecer sobre un sustrato inductor, como es la pectina cítrica o de manzana, así como en materiales vegetales que contienen pectina.

Reactivos utilizados.

Papa dextrosa agar (PDA) [MERCK], agar bacteriológico [DIFCO], fosfato de potasio monobásico [J.T. Baker], fosfato de potasio dibásico [J.T. Baker], sulfato de amonio [J.T. Baker], pectina cítrica [SIGMA], pectina de manzana [GRINDSTED], cáscara de limón [DANISCO de México], Trizma Base [SIGMA], Tris-HCl [SIGMA], ácido clorhídrico [J.T. Baker], hidróxido de sodio [J.T. Baker], albúmina serica bovina [SIGMA], sulfato de cobre [J.T. Baker], tartrato de sodio y

potasio [MERCK], carbonato de sodio [J.T. Baker], reactivo de Fenol Folin-Ciocalteu [SIGMA], acetona [J.T. Baker], acetato de amonio [J.T. Baker], DEAE Sephadex A-50 [Pharmacia Biotech], cloruro de sodio [J.T. Baker], acrilamida [SIGMA], bis-acrilamida [BIO-RAD], persulfato de amonio [BIO-RAD], Temed [BIO-RAD], ácido tiobarbitúrico [SIGMA], ácido poligalacturónico [SIGMA], glicina [SIGMA], azul de bromo fenol [BIO-RAD].

Medios de cultivo.

Medio A (para la propagación y conservación de cepas): Se preparó al 3.9% (w/v) de PDA (papa, dextrosa, agar) y suplementado con 2.0% (w/v) de agar bacteriológico. Posteriormente, 30 ml se vaciaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml y se esterilizó 20 min a 121°C. Se dejó solidificar y se le realizó la prueba de esterilidad a cada matraz, la cual consiste en dejar los matraces a 37°C por 24 horas observando si hay crecimiento de microorganismos.

Medio B (para la producción de pectina liasa por las cepas *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y HZ): Se preparó en agua destilada conteniendo 0.05% (w/v) de KH_2PO_4 , 0.05% (w/v) de K_2HPO_4 , 0.4% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1.0% (w/v) de cáscara de limón como fuente de carbono. Las sales fueron esterilizadas por separado de la fuente de carbono; tanto las sales como la fuente de carbono se ajustaron a un pH de 3.0 y se esterizaron a 121°C durante 20 minutos. Después de la esterilización las sales se vaciaron al matraz que contenía la fuente de carbono.

Medio C (para la producción de pectina liasa por la cepa *A. flavipes* ATCC-16795): fue preparado en agua destilada conteniendo 0.2% (w/v) de KH_2PO_4 , 0.2% (w/v) de K_2HPO_4 , 0.2% (w/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1.0% (w/v) de cáscara de limón como fuente de carbono. Y se aplicó el mismo procedimiento descrito en el **Medio B** tanto a las sales como a la fuente de carbono.

Conservación y propagación de las cepas.

Las cepas se conservaron y propagaron a través de la resiembra por estría en tubos inclinados de 16x150 mm con **Medio A**; después de haber sido propagadas se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Las cepas de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y de HZ fueron incubadas a 37°C y la cepa *A. flavipes* ATCC-16795 a 29°C, por 72 horas.

Preparación del inóculo.

En condiciones de esterilidad se tomó uno de los tubos donde se propagó la cepa y se colectaron las esporas resuspendiéndolas en agua destilada estéril, para después tomar 1.0 ml de esta suspensión de esporas y dispersarla sobre 30 ml de **Medio A** sólido contenido en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Los matraces con esporas de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y HZ se incubaron 144 horas a 37°C y los matraces con esporas de *A. flavipes* ATCC-16795 a 29°C por 72 horas. Posteriormente en condiciones de esterilidad a cada matraz se le agregaron 10 ml de agua destilada estéril y con ayuda de una barra magnética y un agitador, las esporas fueron resuspendidas. A la suspensión de esporas obtenida se le determinó la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 21D). Para la cepas de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y HZ se tomó 1.0 ml de la suspensión de esporas que tenga una densidad óptica de 3.0 a 540 nm, el cual fue empleado como inóculo por cada 100 ml de **Medio B**. Para la cepa *A. flavipes* ATCC-16795 se toma 1.0 ml de la suspensión de esporas que tenga una densidad óptica similar, el cual fue empleado como inóculo por cada 100 ml de **Medio C**.

Producción de pectina liasa extracelular.

La producción de pectina liasa por las cepas *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y HZ se realizó en matraces Fernbach de 2800 ml, conteniendo 800 ml de **Medio B**. Los

matraces ya inoculados con la cepa se incubaron a 37°C, con una agitación de 200 rpm en una agitadora rotatoria Psychrotherm G-26 (New Brunswick Scientific). Se utilizaron 5 matraces Fernbach por cepa, para una fermentación de 120 horas. Los matraces son incubados simultáneamente, retirando un matraz cada 24 horas. Al parar la fermentación, de cada matraz se tomaron 15 ml y se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos en una centrifuga clínica (Solbat), separando el sobrenadante. Todo el medio residual se pasó a través de gasa y algodón obteniendo el filtrado enzimático.

La producción de pectina liasa por la cepa *A. flavipes* ATCC-16795 se realizó en un matraz Fernbach de 2800 ml, conteniendo 1000 ml de **Medio C**. El matraz ya inoculado con la cepa se incubó a 29°C a una agitación de 200 rpm en una agitadora rotatoria Psychrotherm G-26 (New Brunswick Scientific). El contenido de un solo matraz Fernbach se utilizó para una fermentación de 72 horas. Cada 24 horas en condiciones de esterilidad se tomó una muestra de 15 ml y se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos en una centrifuga clínica (Solbat), separando el sobrenadante. Todo el medio residual se pasó a través de gasa y algodón obteniendo el filtrado enzimático.

Determinación de la actividad de pectina liasa extracelular.

La actividad de pectina liasa se determinó monitoreando el incremento en absorbancia a 235 nm, el cual es causado por la formación de una doble ligadura entre los carbonos 4 y 5, generados a partir del rompimiento de la molécula de ácido polimetilgalacturónico por la pectina liasa (Fogarty y Kelly, 1983). La mezcla de reacción contenía 1.0 ml de pectina cítrica al 0.8%, 1.0 ml de buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.8, y 0.5 ml de la muestra problema (ya sea sobrenadante libre de células, filtrado enzimático, concentrado enzimático, precipitado enzimático o fracciones de la cromatografía). La mezcla de reacción fue incubada a 45°C por 60 min. Posteriormente, para detener la reacción se tomó 0.5 ml de la mezcla de reacción y se llevó a un tubo conteniendo 4.5 ml de HCl 0.01 M frío. Los tubos control contenían exactamente lo mismo que los tubos con la mezcla de reacción, pero después de agregar la muestra problema y agitar, se tomó inmediatamente 0.5 ml y se llevó al tubo que contiene HCl, para que no se lleve a cabo la reacción.

Una unidad (U) de actividad de pectina liasa se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.1 en la absorbancia a 235 nm en la mezcla de reacción [Albersheim y Killias, 1962; Delgado, *et al.*, 1993].

Determinación de proteína extracelular.

La determinación de proteína se realizó siguiendo el método reportado por Lowry y colaboradores [1951] utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina (25-250 µg). Antes de determinar la cantidad de proteína extracelular, las muestras fueron dializadas, para lo cual se tomaron de 2.0 a 4.0 ml de la muestra problema y se depositaron en bolsas de diálisis (Spectra/Por) con una capacidad de corte de 12,000 a 14,000 daltons previamente hidratadas en agua destilada, dializándose contra agua destilada a una temperatura constante de 4°C por 3 horas con cambios de agua cada 45 min, para las muestras de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y HZ; para las muestras de *A. flavipes* ATCC-16795 se llevó a cabo la diálisis por 6 horas con cambios de agua cada 45 min, ya que estas muestras provenían de una fermentación que contaba con una mayor cantidad de sales.

Mezcla de filtrados enzimáticos

Para poder contar con una mayor actividad enzimática inicial de pectina liasa, se mezclaron los filtrados enzimáticos obtenidos del cultivo de la cepa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y de la cepa HZ, cultivados en cáscara de limón al 1.0% como única fuente de carbono. Los filtrados enzimáticos que se mezclaron fueron aquellos que presentaron una actividad mayor a las 100 unidades de actividad de pectina liasa por ml. Los filtrados enzimáticos de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 con 24, 48, 72 y 120 horas de incubación fueron mezclados entre si constituyendo el filtrado enzimático denominado Filtrado Enzimático-1043 (F E-1043). Los filtrados

de HZ con 48, 72, 96 y 120 horas de incubación también fueron mezclados entre sí, constituyendo el filtrado enzimático denominado Filtrado Enzimático-HZ (F E-HZ).

Al filtrado enzimático obtenido de la fermentación de *A. flavipes* ATCC-16795 con 1.0% de cáscara de limón y 72 horas de incubación se le denominó Filtrado Enzimático-*A. flavipes* (F E-*A. flavipes*)

Cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex A-50.

Para llevar a cabo esta técnica fue necesario llevar a cabo los siguientes pasos y cabe mencionar que sólo se utilizó la mitad del volumen de los Filtrados Enzimáticos-1043 y -HZ, el resto del volumen se utilizó para los procesos de electroforesis y zimograma.

a) Concentración de filtrados enzimáticos.

Previamente a la concentración, los Filtrados Enzimáticos-1043 y -HZ se centrifugaron en una centrifuga Sorvall a 4°C por 20 min a 6500 rpm.

La concentración de filtrados se llevó a cabo en un equipo de ultrafiltración por flujo tangencial Pellicon Millipore con membranas de 10,000 MW.

b) Preparación de la muestra.

Se precipitaron las proteínas de los Filtrados Enzimáticos-1043 y -HZ concentrados en un recipiente previamente enfriado y sumergido en hielo, al que se agregaron poco a poco 2.5 volúmenes de acetona fría (-20°C). Esta solución se agitó suavemente por media hora dentro del hielo. Posteriormente, se centrifugó 5 min a 10,000 rpm a $+4^{\circ}\text{C}$ en una centrifuga Sorvall. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en buffer de acetato de amonio 0.02M pH 5.0 (buffer de equilibrio).

c) Preparación y empaquetamiento de la columna de DEAE Sephadex A-50.

Esta matriz fue hidratada resuspendiéndola en buffer de equilibrio, acetato de amonio 0.02 M pH 5.0, posteriormente fue lavada con el buffer de equilibrio varias veces y al mismo tiempo se eliminaron las partículas finas por decantación. La matriz fue desaerada al vacío por 30 min y empaquetada manualmente en una columna LKB de 56 cm de longitud y con un diámetro interno de 2.6 cm. Se dejó reposar en la columna durante una noche. Finalmente a la matriz se le pasa buffer de equilibrio hasta obtener, a la salida de la columna, el mismo pH con el que cuenta el buffer de equilibrio. Para la cromatografía del Filtrado Enzimático-1043 concentrado se utilizaron 3.85 gramos de matriz y para la cromatografía del Filtrado Enzimático-HZ concentrado se utilizaron 3.07 gramos.

d) Carga de la muestra a la columna y elución.

El Filtrado Enzimático concentrado se pasó por un filtro Swinex de Millipore con una membrana de poro de 5.0 μm antes de cargarlo en la columna. Posteriormente la columna fue cargada con la muestra y fue eluída por etapas, con una velocidad de flujo constante de 30 ml h^{-1} , colectando fracciones de 5.0 ml cada 10 min. Los buffer utilizados para la elución fueron: A) buffer de acetato de amonio 0.02 M, pH 5.0; B) buffer de acetato de amonio 0.1 M más 0.05 M de NaCl, pH 5.0; C) buffer de acetato de amonio 0.1 M más 0.1 M de NaCl, pH 5.0; y D) buffer de acetato de amonio 0.1 M más 0.5 M de NaCl, pH 5.0. A cada fracción recolectada se le determinó su absorbancia a 280 nm, así como la actividad de pectina liasa.

Concentración de los filtrados enzimáticos.

El resto de los Filtrados Enzimáticos-1043 y -HZ, al igual que el Filtrado Enzimático-A. *flavipes*, fueron concentrados de igual manera como se hizo para la cromatografía para llevar a cabo la electroforesis.

Diálisis de los filtrados enzimáticos y fracciones de cromatografía.

Se tomaron de 10 a 13 ml de los del Filtrados Enzimáticos -1043, -HZ y -A. *flavipes* concentrados y se depositaron en bolsas de diálisis (Spectra/Por) con una

capacidad de corte de 12,000 a 14,000 daltons previamente hidratadas en agua destilada, dializándose del mismo modo como en el apartado **Determinación de proteína extracelular**.

2.0 ml de la fracción 12 de la cromatografía del Filtrado Enzimático-1043 y de las fracciones 14, 39, 62 de la cromatografía del Filtrado Enzimático-HZ se depositaron en bolsas de diálisis (Spectra/Por) con una capacidad de corte de 12,000 a 14,000 daltons previamente hidratadas en agua destilada, y se dializaron contra agua destilada a una temperatura de 4°C por 4 horas con cambios de agua cada 45 min.

Determinación de proteína a las fracciones de cromatografía.

Después de que las fracciones se dializaron se cuantificó la proteína por el método colorimétrico D.C. Protein Assay (Bio Rad), utilizándose una curva estándar de albúmina sérica bovina (10-100 µg) para su cuantificación.

Electroforesis no desnaturizante.

Los geles al 10% de poliacrilamida no desnaturizantes (ND-PAGE) se prepararon de acuerdo a la metodología reportada por Bollag *et al.*, [1996], los cuales se corrieron a un voltaje constante de 100 volts por 3.0 a 3.5 horas. Se utilizó un marcador de peso molecular para electroforesis no desnaturizante Amersham Biosciences, el cual esta conformado por 5 proteínas de diferentes pesos moleculares (67 a 669 KD).

Electroforesis desnaturalizante.

La preparación de los geles SDS-PAGE al 10% se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Bollag et al., [1996] y se corrieron a un voltaje constante de 100 volts por 3.0 a 3.5 horas. Se utilizó una mezcla de marcadores moleculares para la electroforesis desnaturalizante SIGMA e INVITROGEN. Antes de cargar las muestras se calentaron por 2 min a 100°C y los marcadores de peso molecular (SIGMA) por 1 min a 100°C. Los geles se tiñeron por el método del nitrato de plata [Bollag et al., 1996].

Zimograma.

Zimograma de emparedado.

Después de haber corrido los geles no desnaturalizantes, éstos se colocaron sobre un gel del mismo tamaño con 10% de acrilamida y 1.0% de pectina cítrica en buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.8 procurando que los geles quedaran bien unidos y alineados. Posteriormente se pusieron en un recipiente, se les cubrió con el mismo buffer y se colocó en un baño de agua a 45°C durante 2 horas. Al término de este tiempo se sacaron los geles y el gel con pectina cítrica se sumergió en una solución con 0.2% (w/v) de Rojo de Rutenio, con agitación, hasta que las bandas de actividad aparecieran. Entonces se eliminó la solución de Rojo de Rutenio y el gel se lavó con agua destilada. Por otro lado, los geles ND-PAGE se tiñeron con nitrato de plata.

Zimograma *in situ*.

En este tipo de zimograma, el gel de electroforesis contiene pectina cítrica al 0.1% (w/v), de acuerdo a la metodología reportada por Manchenko [2003] con ligeras modificaciones. La técnica modificada consistió en poner a un gel ND-PAGE 10% 0.1% de pectina cítrica, se cargó el gel, se corrió a 100 volts y se incubó en un buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.8 a la temperatura de 45°C por 2 horas, y posteriormente se reveló el gel para observar las bandas de actividad por tinción con Rojo de Rutenio al 0.2% (w/v).

Especificidad de la enzima pectina liasa por el tipo de sustrato.

Se utilizó la técnica reportada por Nedjma et al. [2001], en donde se presenta un color rosa por la presencia de los productos formados por la actividad de pectina liasa, los cuales gracias a este color pueden ser cuantificados a través de la densidad óptica en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

La técnica se aplicó de la siguiente manera: 1.0 ml resultado de la actividad *in vitro* de la pectina liasa, se le agregó 1.0 ml de NaOH 1.0 N, se agitó la mezcla, se calentó en un baño a 80°C por 5 min y se enfrió, apareciendo una coloración amarilla. Después se añadió a la mezcla 1.2 ml de HCl 1.0 N, el color amarillo desapareció, la mezcla se agitó y se agregó 1.0 ml de ácido tiobarbitúrico 0.04 M. La mezcla se calentó de nuevo en un baño a 80°C por 5 min y se enfrió para medir la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm.

La actividad *in vitro* se llevó a cabo de acuerdo en lo descrito en el apartado, **determinación de actividad de pectina liasa**, tomándose el mililitro después de

haber pasado el tiempo de incubación, utilizándose 0.1 ml de los Filtrados Enzimáticos -1043, -HZ y -*A. flavipes* concentrados y como sustrato se utilizó pectina cítrica al 0.8%, pectina de manzana al 0.8% y ácido poligalacturónico al 1.0%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Perfiles de producción de pectina liasa por *Aspergillus* sp. CH-Y-1043, *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 y el híbrido HZ.

La pectina liasa es una enzima inducible, por lo que para su producción, las tres cepas fueron incubadas en medio mínimo con cáscara de limón como única fuente de carbono, tomándose los Filtrados Enzimáticos para la comparación de la pectina liasa de cada cepa a través de electroforesis, zimogramas y para su purificación. En la Fig. 1 se muestra el perfil de producción de pectina liasa por la cepa parental *Aspergillus* sp. CH-Y-1043

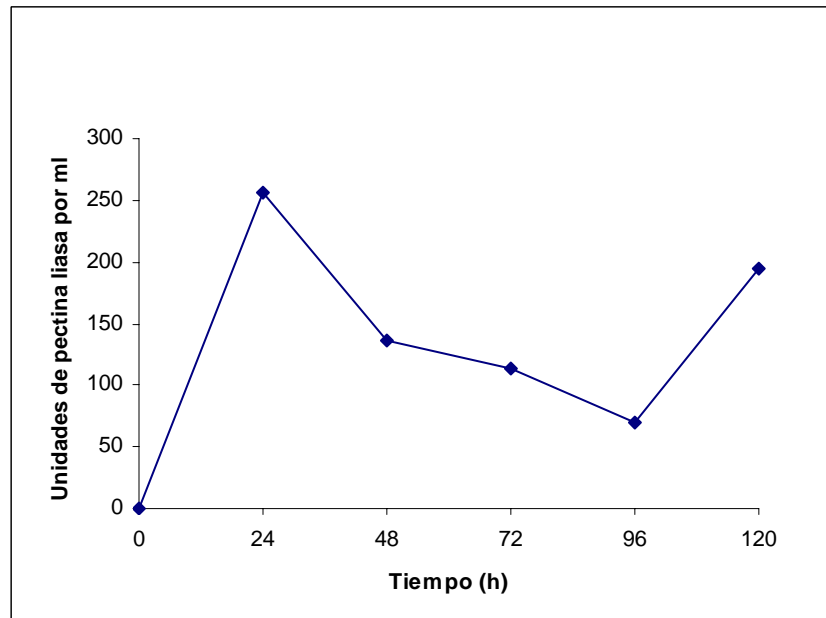


Figura 1. Producción de pectina liasa extracelular por *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 incubado en Medio B con 1.0% (w/v) de cáscara de limón a 37°C con agitación.

En la Fig. 2 se muestra el perfil de producción de pectina liasa por la cepa parental *Aspergillus flavipes* ATCC-16795. La fermentación no se llevó hasta las 120 horas ya que como lo reporta Ortiz [1991] a partir de las 72 horas de incubación la producción de pectina liasa por este método decrece.

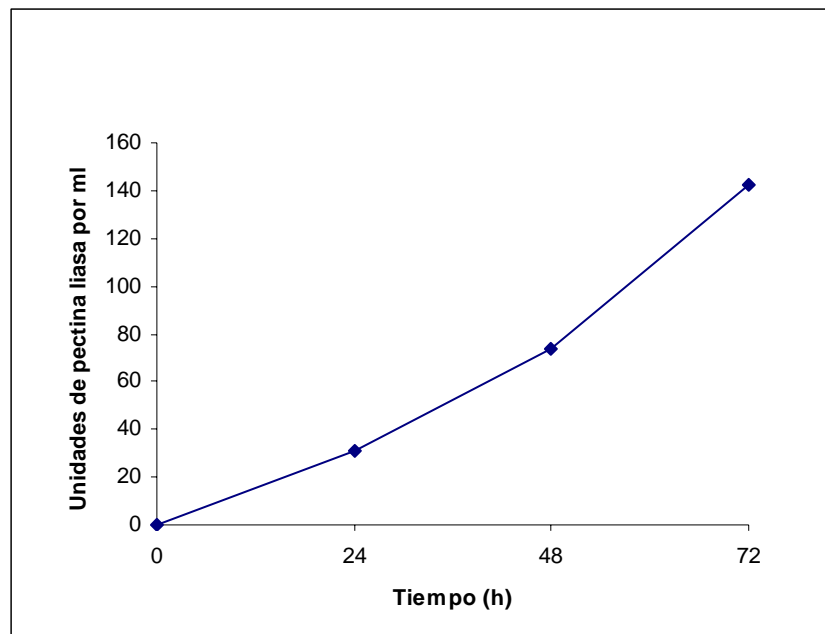


Figura 2. Producción de pectina liasa extracelular por *A. flavipes* ATCC-16795 incubado en Medio C con 1% (w/v) de cáscara de limón a 29°C con agitación.

En la Fig. 3 se muestra el perfil de producción de pectina liasa por el híbrido HZ.

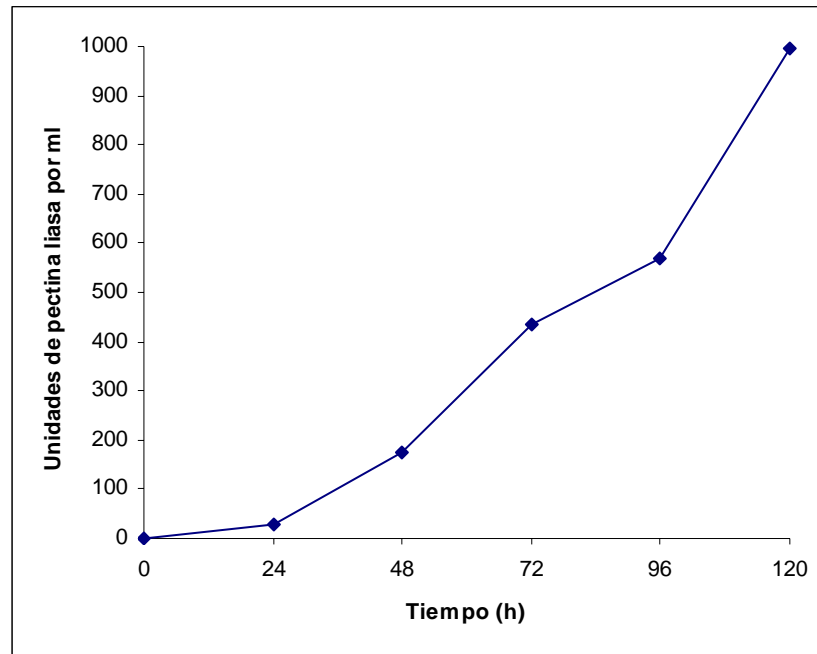


Figura 3. Producción de pectina liasa extracelular por el híbrido HZ incubado en Medio B con 1.0% (w/v) de cáscara de limón a 37°C con agitación.

El patrón de producción de pectina liasa por cada una de las cepas era un patrón esperado pues en experimentos anteriores [Ortiz, 1991; Delgado, *et al.*, 1993; Solis, 1997] ya se había determinado la fuente de carbono, sales y su concentración para obtener la mayor cantidad de pectina liasa a través de cada fermentación.

Antes de concentrar

| Filtrado Enzimático | Volumen (ml) | Unidades de PL ml ⁻¹ | Actividad Total (U) | mg de proteína ml ⁻¹ | Proteína Total (mg) | Actividad Específica (U mg ⁻¹) |
|----------------------|--------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|--|
| -1043 | 1053 | 105 | 110565 | 0.124 | 130.572 | 846.774 |
| -HZ | 1011 | 615 | 621765 | 0.119 | 120.309 | 5168.06 |
| - <i>A. flavipes</i> | 770 | 148 | 113960 | 0.125 | 96.25 | 1184 |

Después de concentrar

| | | | | | | |
|----------------------|-------|------|---------|-------|--------|---------|
| -1043 | 101.8 | 501 | 51001.8 | 0.328 | 33.39 | 1527.45 |
| -HZ | 120 | 1131 | 135720 | 0.377 | 45.24 | 3000 |
| - <i>A. flavipes</i> | 86 | 643 | 55298 | 0.454 | 39.044 | 1416.29 |

Tabla 1. Actividad enzimática de pectina liasa y cantidad de proteína durante la concentración de los Filtrados Enzimáticos-1043, -HZ y -*A. flavipes* (Pectina Liasa PL).

Teniendo los perfiles de producción para las tres cepas se obtuvieron los Filtrados Enzimáticos los cuales fueron concentrados para llevar a cabo las electroforesis y zimogramas.

En la Tabla 1 podemos observar que la actividad específica de los Filtrados Enzimáticos-1043 y –*A. flavipes* aumentó al concentrar la proteína, pero disminuyó en el Filtrado Enzimático-HZ, esto tal vez por que la pectina liasa se encontraba interactuando con otras proteínas de mayor tamaño dentro del Filtrado Enzimático siendo retenidas en la membrana y posteriormente desechadas durante la concentración, sin embargo la actividad de pectina liasa y la concentración de proteína por mililitro aumentó, lo que fue suficiente para continuar con las electroforesis y zimogramas.

Después de haber concentrado los Filtrados Enzimáticos, se decidió separar a las proteínas por electroforesis y comparar las bandas de actividad de cada una de las cepas por zimogramas.

Los patrones de proteínas después de SDS-PAGE se muestran en la Fig. 4 y se observó que cada cepa tiene un patrón diferente de bandeo, lo cual era de esperarse entre *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 al ser cepas diferentes, pero el patrón del híbrido HZ debía ser similar a alguna de las dos cepas parentales, sin embargo no fue así, indicando un proceso de recombinación genética en distintas partes del genoma de ambos padres.

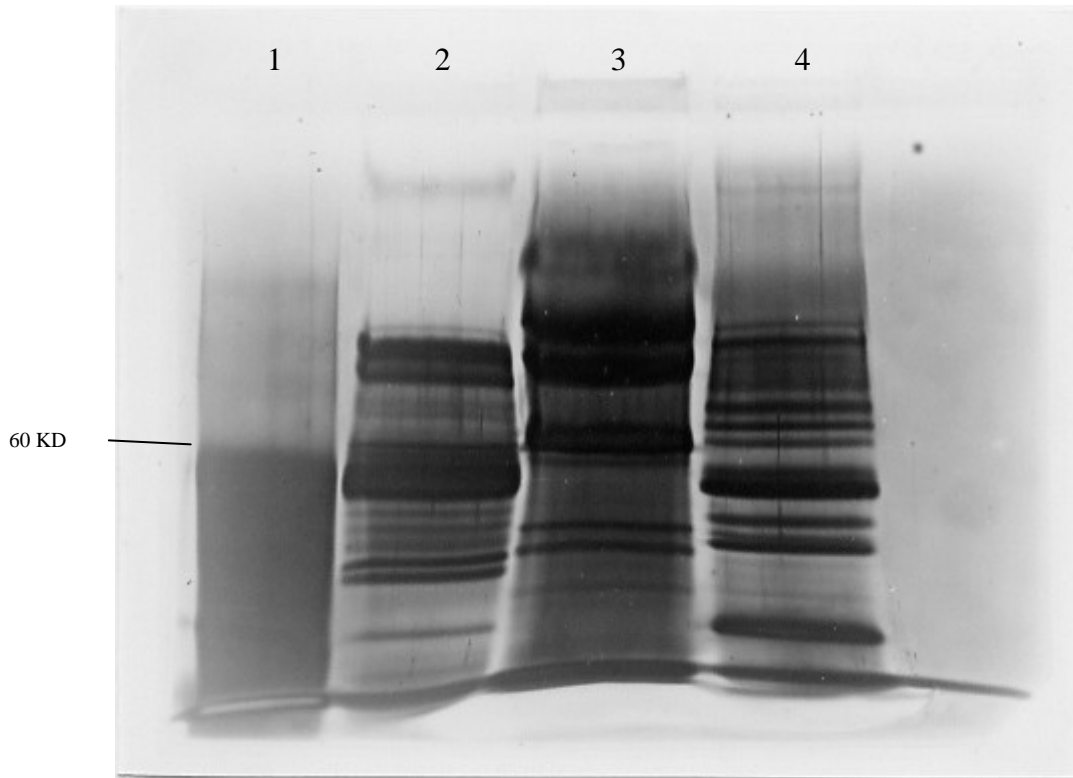


Figura 4. Electroforesis desnaturalizante de los F E-1043 (carril 2), F E-*A. flavipes* (carril 3) y F E-HZ (carril 4). Carril 1 se encuentra albúmina serica bovina como marcador de peso molecular.

Posteriormente se decidió comparar las pectina liasas de los filtrados enzimáticos F E-1043 y F E-HZ a través de zimogramas *in situ* desnaturalizante y no desnaturalizante.

En el zimograma *in situ* no desnaturalizante se observó después de teñir, que el sustrato es degradado durante la electroforesis, no apreciándose una banda clara de actividad de pectina liasa, debido a que el buffer de electroforesis tiene un pH igual que en el que se determina la actividad de pectina liasa *in vitro* (Figura no mostrada)

En cambio en el zimograma *in situ* desnaturalizante no se encontraron bandas de degradación del sustrato correspondientes a las pectina liasas después de teñir el

gel, debido a que la actividad de las enzimas en las muestras pudo haber sido inhibida por la presencia del detergente, perdiendo su actividad (Figura no mostrada).

Habiendo observado que los Filtrados Enzimáticos presentan un patrón diferente de proteínas, se optó por compararlos a través de la electroforesis no desnaturizante, a la vez que se utilizaba este gel para llevar a cabo el zimograma de emparedado y poder comparar las bandas de actividad de la pectina liasa de cada Filtrado Enzimático. En la Fig. 5 se puede observar que los patrones de proteínas de los filtrados enzimáticos F E-1043, F E-*A. flavipes* y F E-HZ son distintos cómo era de esperarse.

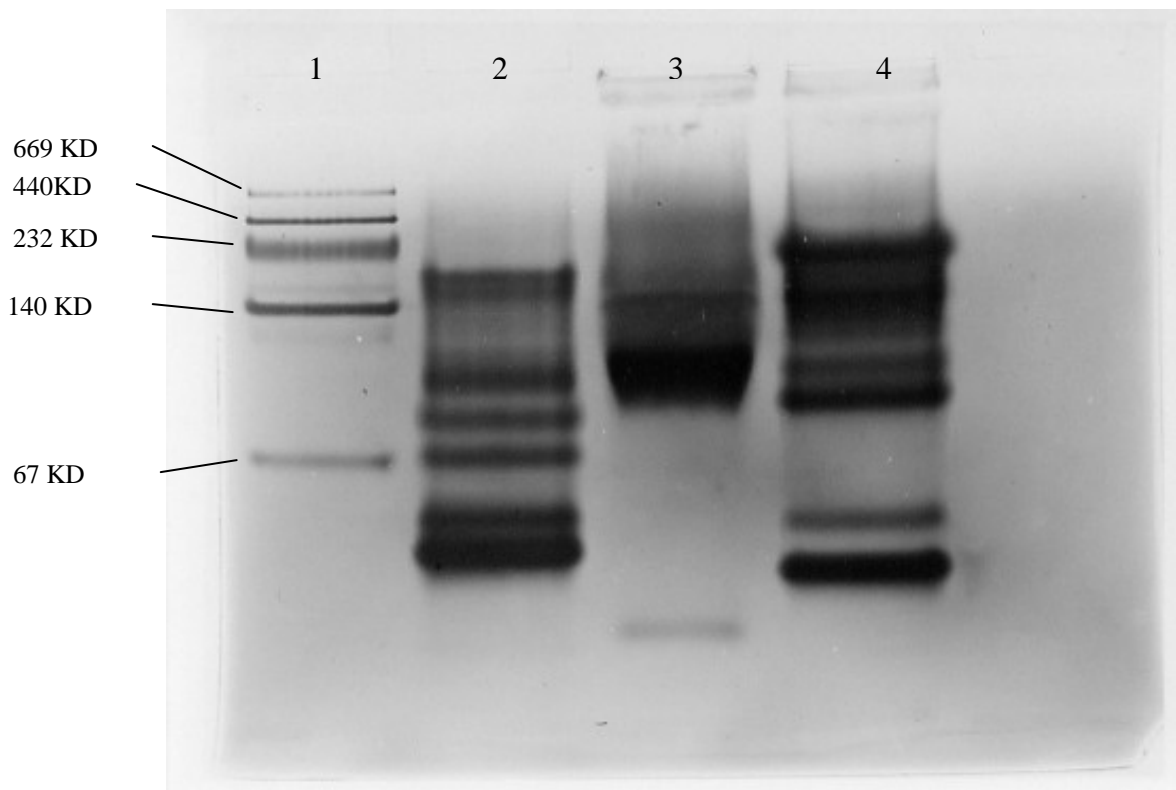


Figura 5. Electroforesis no desnaturizante de los F E-1043 (carril 2), F E-*A. flavipes* (carril 3) y F E-HZ (carril 4). Carril 1 marcador de peso molecular.

En el zimograma de los Filtrados Enzimáticos -1043, -*A. flavipes* y -HZ (Fig. 6) contraparte del gel de electroforesis no desnaturizante se observó una banda clara de actividad de pectina liasa después de teñir, por cada uno de ellos, siendo diferentes en corrimiento ya que la de *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 (carril 2) fue la que migró menos en el gel, mientras que la de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (carril 1) corrió más quedando la de HZ (carril 3) en la parte intermedia entre las dos. Por lo tanto cada enzima mostró características de corrimiento diferentes. Con las reservas del caso se calcularon las masas moleculares aparentes resultando de 137 KD la pectina liasa de *Aspergillus. flavipes* ATCC-16795, siguiendo con un menor peso molecular de 112 KD la pectina liasa de HZ y contando con el menor peso molecular de 94 KD la pectina liasa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. Sin embargo los pesos moleculares que presentan estas enzimas son pesos moleculares aparentes e incorrectos ya que en este tipo de electroforesis (ND-PAGE) como lo menciona Bollag y colaboradores [1996] las proteínas migran dentro del gel debido a su carga y a su forma y no a su peso, pero nos muestra que estas enzimas son diferentes pues dependiendo de los aminoácidos que integran a la proteína ésta contará con cierta carga, al presentar diferentes cargas estas enzimas presentan aminoácidos diferentes dentro de su conformación primaria.

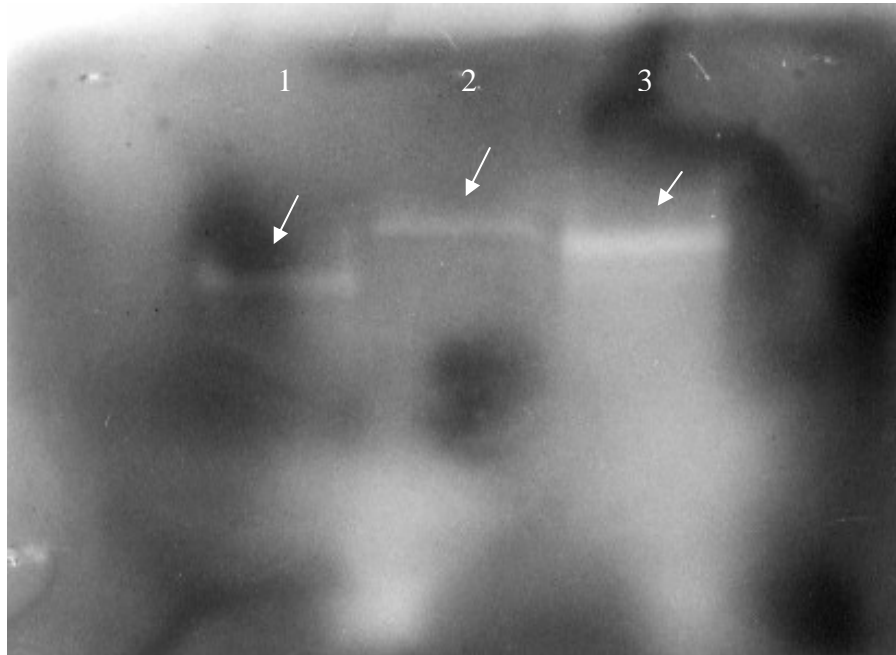


Figura 6. Zimograma de los filtrados enzimáticos F E-1043 (carril 1), F E-A. *flavipes* (carril 2) y F E-HZ (carril 3).

Después de haber identificado a las pectina liasas de cada cepa se optó por purificar a través de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex A-50, a las enzimas de las cepas *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y del híbrido HZ, para conocer más a fondo algunas de sus características.

Para llevar a cabo este proceso fue necesario concentrar más los filtrados después de la ultrafiltración por precipitación de las proteínas para resuspenderlas en buffer de equilibrio y llevar a cabo la cromatografía de cada uno de ellos.

En la Tabla 2, se puede apreciar que se aumentó la actividad específica de pectina liasa al concentrar tanto el F E-1043 como el F E-HZ.

Antes de Concentrar

| Filtrado Enzimático | Volumen (ml) | Unidades de PL ml ⁻¹ | Actividad Total (U) | mg de proteína ml ⁻¹ | Proteína Total (mg) | Actividad Específica (U mg ⁻¹) |
|---------------------|--------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|--|
| -1043 | 1180 | 163 | 192340 | 0.096 | 113.28 | 1697.91 |
| -HZ | 1150 | 807 | 928050 | 0.103 | 118.45 | 7834.95 |

Después de concentrar

| | | | | | | |
|-------|-----|------|--------|-------|-------|---------|
| -1043 | 285 | 334 | 95190 | 0.174 | 49.56 | 1920.7 |
| -HZ | 125 | 1128 | 141000 | 0.284 | 35.5 | 3971.83 |

Después de precipitar y resuspender en buffer de equilibrio

| | | | | | | |
|-------|------|------|-------|-------|--------|---------|
| -1043 | 17 | 2976 | 50592 | 0.978 | 16.626 | 3042.94 |
| -HZ | 12.5 | 5838 | 72975 | 1.236 | 15.45 | 4723.3 |

Tabla 2. Actividad enzimática de pectina liasa y cantidad de proteína durante la concentración de los Filtrados Enzimáticos -1043 y -HZ, por ultrafiltración, la precipitación con acetona y resuspensión en buffer de equilibrio.

En la Fig. 7 se presenta el perfil de proteínas y de actividad de pectina liasa durante la cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex-A50 del Filtrado Enzimático-1043, en donde se observó que la actividad de pectina liasa se eluyó con el Buffer A hasta alcanzar su mayor actividad en la fracción 12 y posteriormente ir disminuyendo hasta llegar a cero en la fracción 26, presentándose solo un pico de pectina liasa, relacionado con un pequeño pico de proteína que eluyó con el Buffer A. Esto indica que la proteína no interactuó con la carga de la resina por lo que fué eluida con el Buffer A, el cual es el buffer de equilibrio. Tal vez ésto se deba a que la carga de la proteína a este pH es positiva igual a la de la resina y por lo tanto no es retenida.

Resultados similares obtuvieron Alaña y colaboradores [1991], quienes observaron que la pectina liasa de la cepa *Penicillium italicum* tampoco es retenida en una columna con DEAE Celulosa y contrario a lo presentado por Kester y Visser [1994] donde la pectina liasa de *Aspergillus niger* es retenida en la columna con DEAE Sepharosa.

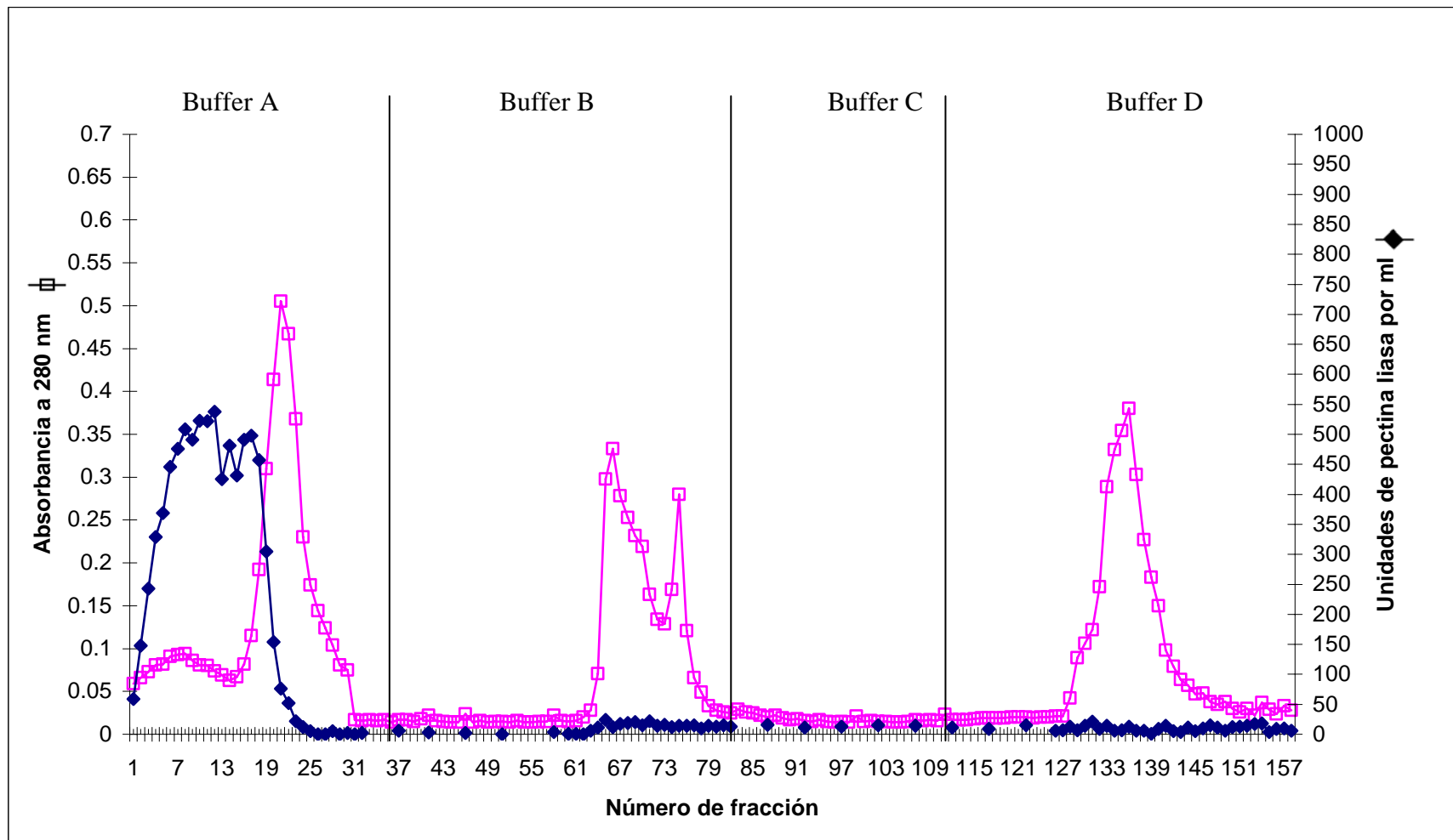


Figura 7. Perfiles de proteína y de actividad de pectina liasa de la cromatografía en DEAE sephadex A 50 del Filtrado Enzimático-1043. La proteína fue eluída con Buffer A) acetato de amonio 0.02 M pH 5.0; B) acetato de amonio 0.1 M más NaCl 0.05 M pH 5.0; C) acetato de amonio 0.1 M más NaCl 0.1 M pH 5.0; D) acetato de amonio 0.1 M más NaCl 0.5 M pH 5.0.

En la Fig. 8 se presentan los perfiles de proteína y de actividad de pectina liasa de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex A-50 del Filtrado Enzimático-HZ, en donde se observa que la actividad de pectina liasa se eluyó en cuatro picos. Apareciendo el primero conforme se eluye la columna con el Buffer A, mostrando este pico la más alta actividad en la fracción 14 y después bajando hasta la fracción 28, pero sin llegar a cero. A partir de esta fracción la actividad comienza a subir de nuevo formándose el segundo pico de actividad de pectina liasa, todavía siendo eluída una parte con el Buffer A y otra con el buffer B. La actividad de pectina liasa más alta del segundo pico se observó en la fracción 39. A partir de esta fracción la actividad de pectina liasa comienza a bajar de nuevo hasta la fracción 55, pero sin llegar a cero ya que partir de este punto la actividad comienza a subir de nuevo, presentándose el tercer pico de actividad, al estar siendo eluída la resina todavía con el Buffer B. La más alta actividad de pectina liasa del tercer pico fue en la fracción 62 para luego decaer hasta cero de actividad de pectina liasa en la fracción 85. El cuarto pico se presenta cuando la resina ya estaba siendo eluída con el Buffer D, mostrando este pico estar relacionado con el pico de proteína que se obtuvo en estas mismas fracciones, pero presentando muy poca actividad de pectina liasa.

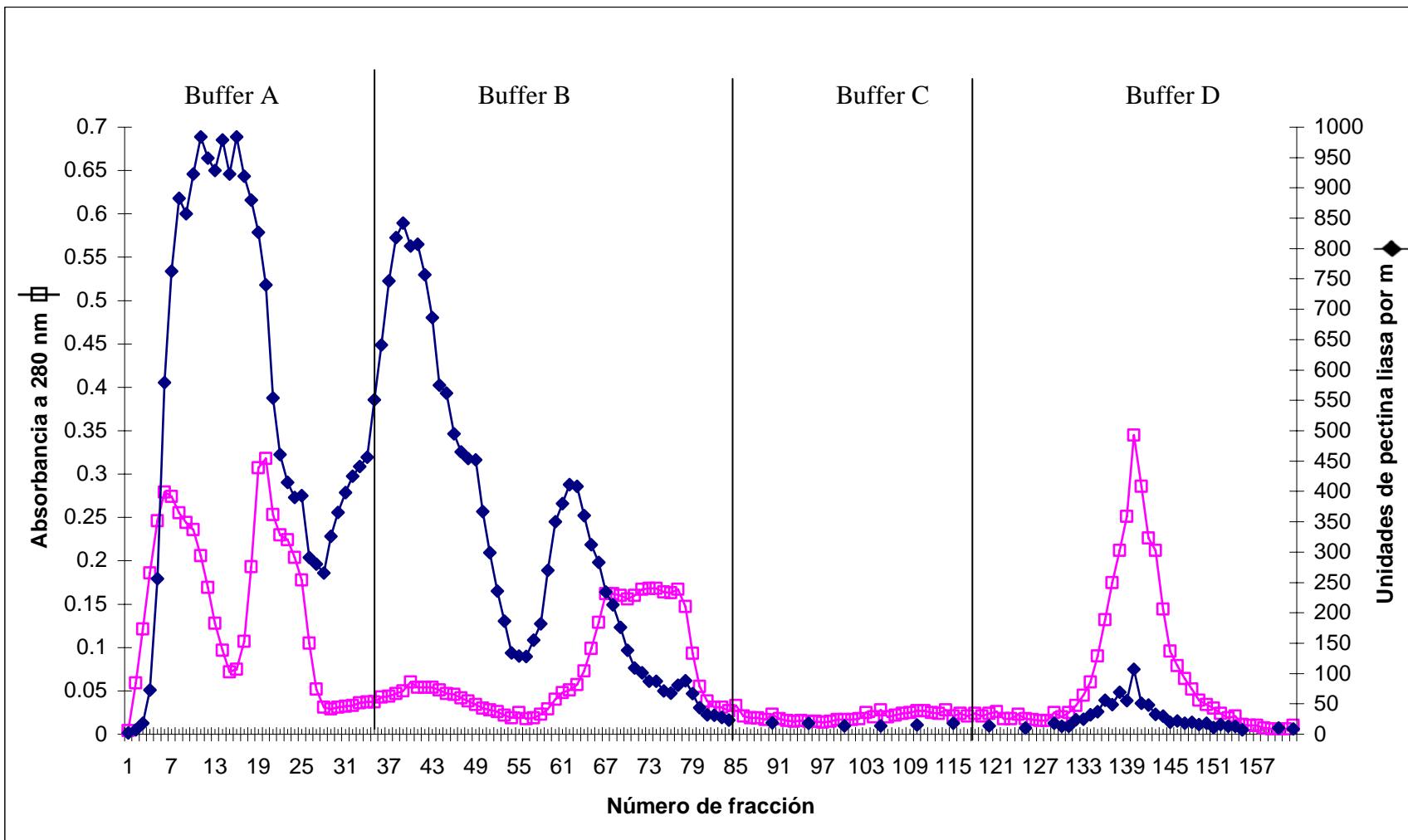


Figura 8. Perfiles de proteína y de actividad de pectina liasa de la cromatografía en DEAE sephadex A 50 del Filtrado Enzimático-HZ. La proteína fue eluída con Buffer A) acetato de amonio 0.02 M pH 5.0; B) acetato de amonio 0.1 M más NaCl 0.05 M pH 5.0; C) acetato de amonio 0.1 M más NaCl 0.1 M pH 5.0; D) acetato de amonio 0.1 M más NaCl 0.5 M pH 5.0.

El perfil de elución de la pectina liasa de HZ dentro de la cromatografía mostró un comportamiento extraño ya que una parte de la actividad se eluye con el buffer de equilibrio, mientras que otra fracción se retuvo en la resina y se eluyó en tres picos bien definidos. Una probable explicación es que fueran varias isoenzimas con diferentes propiedades pero la electroforesis y zimograma muestran que todas las fracciones contienen a la misma proteína con actividad de pectina liasa (Fig. 11 y 12). Otra posibilidad es que la pectina liasa esté interactuando con otras proteínas que le impiden en un caso y le permiten en el otro interactuar con la resina. Sin embargo la razón real se desconoce para este comportamiento. Sería entonces conveniente comparar el perfil de cromatografía de las pectina liasas de HZ y *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 para observar si presentan una perfil de elución similar.

En la Tabla 3 se pueden observar los datos sobre las fracciones de las cromatografías del Filtrado Enzimático-1043 y el Filtrado Enzimático-HZ que respectivamente presentaron una elevada actividad específica de pectina liasa.

| Fracción | Volumen (ml) | Unidades de PL ml ⁻¹ | Actividad Total (U) | mg de proteína ml ⁻¹ | Proteína Total (mg) | Actividad Específica (U mg ⁻¹) |
|---|--------------|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------|---|
| 12 (cromatografía del Filtrado Enzimático-1043) | 5 | 538 | 2690 | 0.0759 | 0.3795 | 7088.27 |
| 14 (cromatografía del Filtrado Enzimático HZ) | 5 | 979 | 4895 | 0.0648 | 0.324 | 15108.02 |
| 39 (cromatografía del Filtrado Enzimático HZ) | 5 | 842 | 4210 | 0.0203 | 0.1015 | 41477.83 |
| 62 (cromatografía del Filtrado Enzimático HZ) | 5 | 411 | 2055 | 0.0277 | 0.1385 | 14837.54 |

Tabla 3. Actividad específica de pectina liasa de las fracciones obtenidas de la cromatografía de los F E-1043 y F E-HZ en DEAE Sephadex A-50.

En la Fig. 9 se muestra el análisis electroforético del Filtrado Enzimático-1043 y la fracción 12 (con la más alta actividad específica) obtenida de la cromatografía de intercambio iónico. En esta figura se observa que la fracción presenta una sola banda mayoritaria contaminada con una serie de proteínas en baja concentración, la cual corresponde exactamente a una banda presente en el Filtrado Enzimático-1043, indicando que casi se logró purificar la pectina liasa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043.

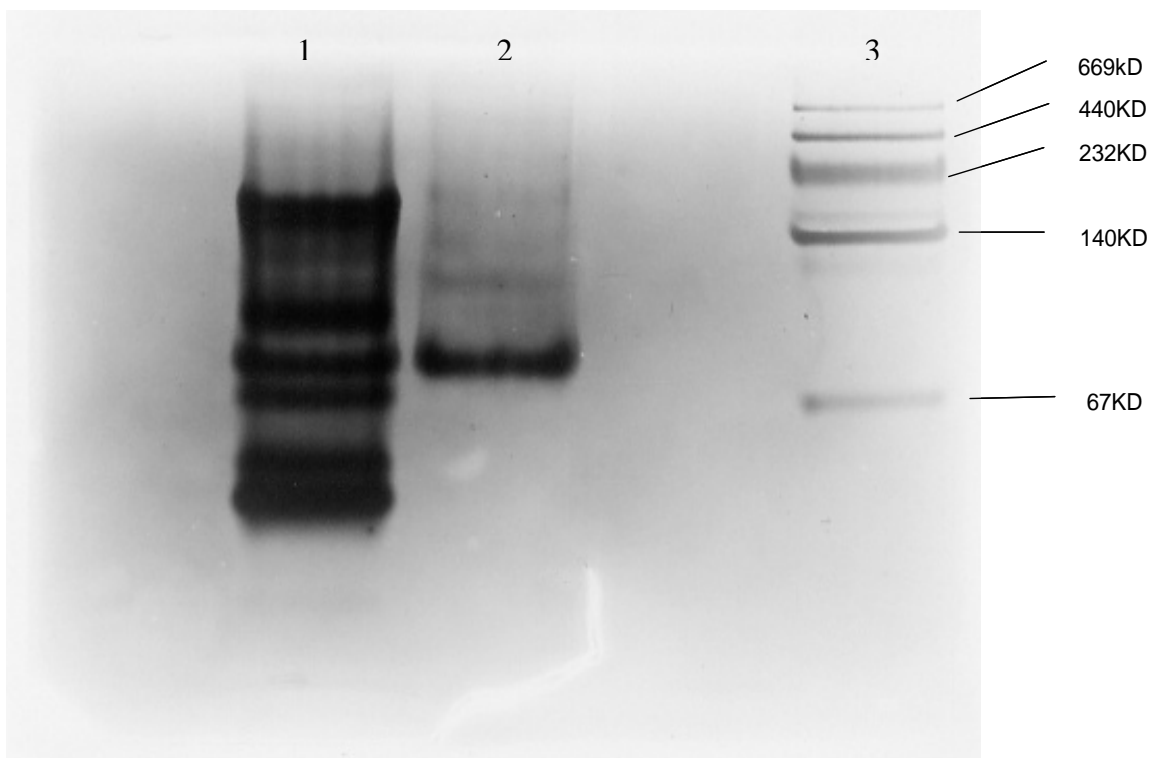


Figura 9. Electroforesis no desnaturalizante del Filtrado Enzimático-1043 concentrado (carril 1) y la fracción 12 (carril 2) de la cromatografía en DEAE Sephadex A-50. En el carril 3 se encuentran los marcadores de peso molecular.

La Fig. 10 muestra el zimograma, contraparte de la electroforesis anterior en donde se observan claramente una banda de actividad de pectina liasa para cada una de las muestras. Las dos bandas se encuentran a la misma altura, lo que nos indica que en la fracción 12 está presente la pectina liasa del Filtrado Enzimático-1043.

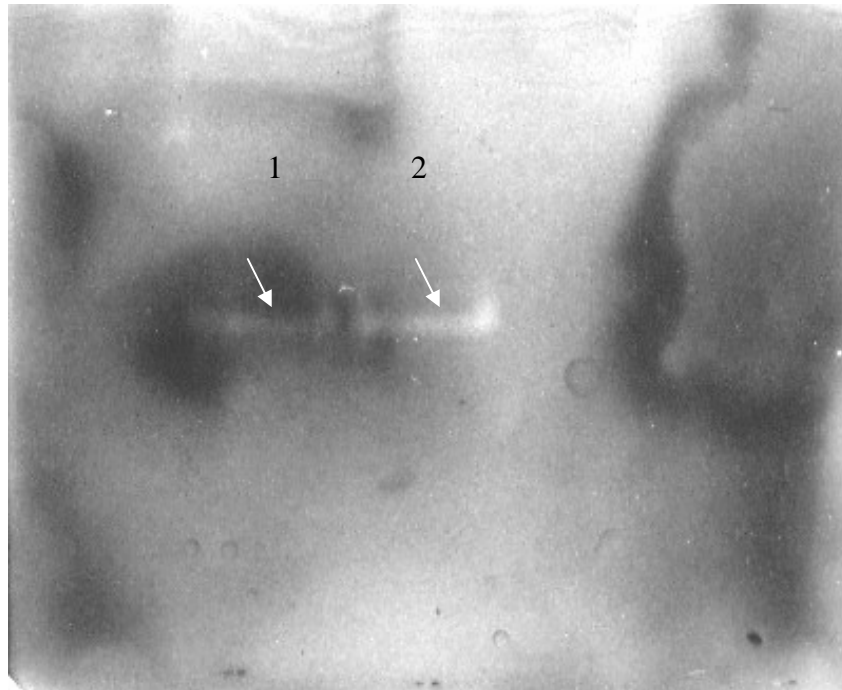


Figura 10. Zimograma de emparedado del Filtrado Enzimático-1043 concentrado (carril 1) y la fracción 12 (carril 2) de la cromatografía en DEAE Sephadex A-50.

De igual manera se llevó a cabo la electroforesis no desnaturizante de la muestras 14, 39 y 62 correspondientes a la cromatografía del Filtrado Enzimático-HZ.

En la Fig. 11 se muestra la electroforesis de las fracciones eluidas del F E-HZ y se observa que la fracción 14 presenta al menos seis bandas de proteína, indicando que la pectina liasa no está pura, en cambio en la fracción 39 (fracción con la mayor actividad específica) solo se percibe una sola banda. Por último en la fracción 62 no se observa ninguna banda, debido a que esta fracción no cuenta con suficiente cantidad de proteína para poder visualizarla por este método de tinción. Lo que hay que hacer notar es que la banda de la fracción 39, presumiblemente la pectina liasa de HZ se presenta también en la fracción 14 y en el Filtrado Enzimático-HZ.

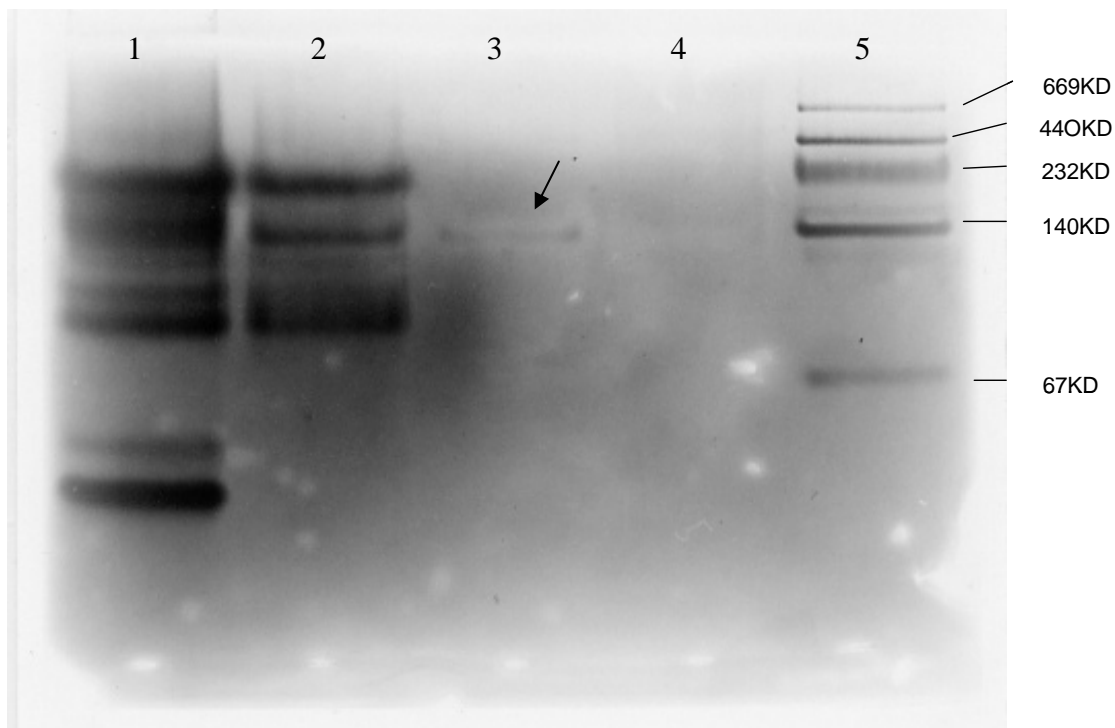


Figura 11. Electroforesis no desnaturalizante del Filtrado Enzimático-HZ concentrado (carril 1) y las fracciones 14 (carril 2), 39 (carril 3) y 62 (carril 4) de la cromatografía en DEAE Sephadex A-50. En el carril 5 se encuentran los marcadores de peso molecular.

En la Fig. 12 se muestra el zimograma de emparedado contraparte de la electroforesis anterior y se puede apreciar una sola banda de actividad de pectina liasa en la misma posición para cada una de las muestras analizadas, lo que nos indica que las fracciones cuentan con la misma pectina liasa que el Filtrado Enzimático-HZ, exceptuando la fracción 62 (carril 4) que muestra una banda de actividad adicional.

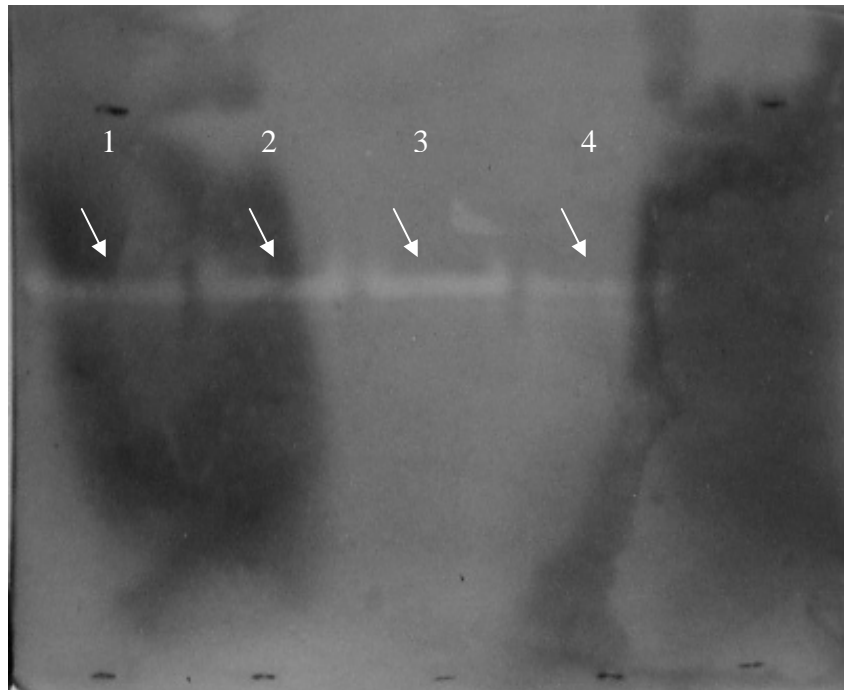


Figura 12. Zimograma de emparedado del Filtrado Enzimático-HZ concentrado (carril 1) y las fracciones 14 (carril 2), 39 (carril 3) y 62 (carril 4), de la cromatografía en DEAE Sephadex A-50.

Para cerciorarse de que la pectina liasa de HZ presente en la fracción 39 se encontraba pura y establecer que es la misma de la fracción 62, se optó por

concentrar las fracciones por medio de la liofilización y así poder observar las bandas de proteína y su actividad. En la Fig. 13 se muestran los resultados y se puede observar que en la fracción 39 concentrada solo se presenta una banda de proteína, lográndose la purificación de la pectina liasa de HZ. La proteína correspondiente presenta un peso molecular aparente de 121 KD, peso similar al encontrado al comparar las pectina liasas de cada cepa (Fig. 6).

La fracción 62 concentrada presenta dos bandas de proteína, una de las cuales corresponde a la pectina liasa de HZ purificada (fracción 39).

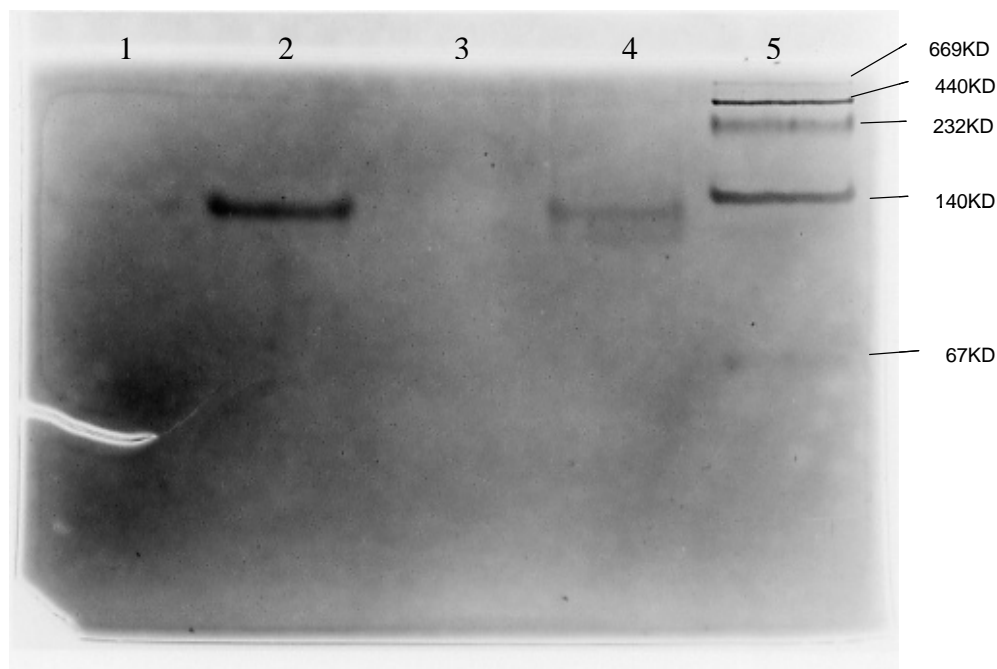


Figura 13. Electroforesis no desnaturalizante de las fracciones 39 (carril 1), fracción 39 concentrada (carril 2), fracción 62 (carril 3) y fracción 62 concentrada (carril 4) de la cromatografía en DEAE Sephadex A-50. Carril 5 marcadores moleculares.

En la Fig. 14 se muestra el zimograma contraparte de la electroforesis de las fracciones 39 y 62 y se observa que en la fracción 62 a parte de estar presente la pectina liasa de HZ de la fracción 39 (flechas blancas), también hay otra banda muy tenue (flecha negra) de pectina liasa del híbrido HZ, una segunda pectina liasa con un menor peso molecular (105 KD) y con menor actividad de pectina liasa, la cual es una pectina liasa diferente o es un producto de degradación de la proteína de 121 KD.

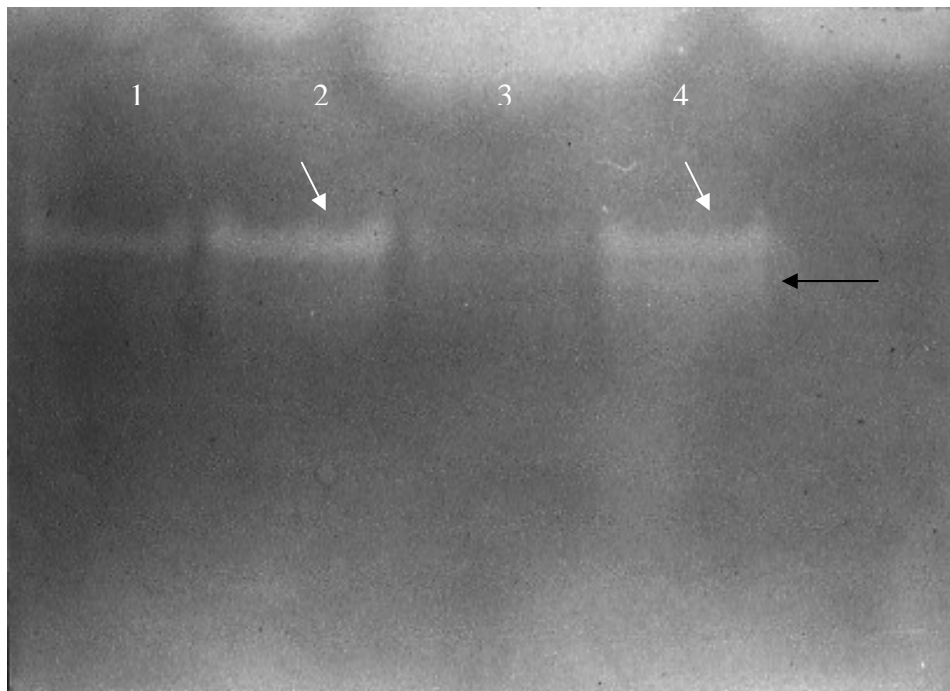


Figura 14. Zimograma de emparedado de las fracciones 39 (carril 1), fracción 39 concentrada (carril 2), fracción 62 (carril 3) y fracción 62 concentrada (carril 4) de la cromatografía en DEAE Sephadex A-50.

Para establecer que la pectina liasa de HZ se encontraba pura, ésta se sometió a una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), ya que el corrimiento de las proteínas en la electroforesis no desnaturizante con la que se observó pura la enzima es influenciado por varios factores (punto isoelectrico, estructura tridimensional, etc.) que afectan la presencia de bandas puras, mientras que la separación en SDS-PAGE se lleva a cabo por la diferencia en peso, mostrando pesos moleculares más cercanos a la realidad, permitiendo cerciorarse de la presencia de proteínas individuales, inseparables en la electroforesis no desnaturizante [Bollag, et al., 1996].

En la Fig. 15 se observa la electroforesis desnaturizante de las fracciones 39 y 62 concentradas y se observó que en la fracción 39 concentrada (carril 2) hubo una serie de bandas de las cuales una proteína con un peso molecular aproximado de 30 KD es la que se encontró en mayor intensidad. La fracción 62 concentrada (carril 4) donde también contiene una gran cantidad de proteínas además de la de 30 KD, que nuevamente es la más intensa y de otra banda de aproximadamente 60 KD.

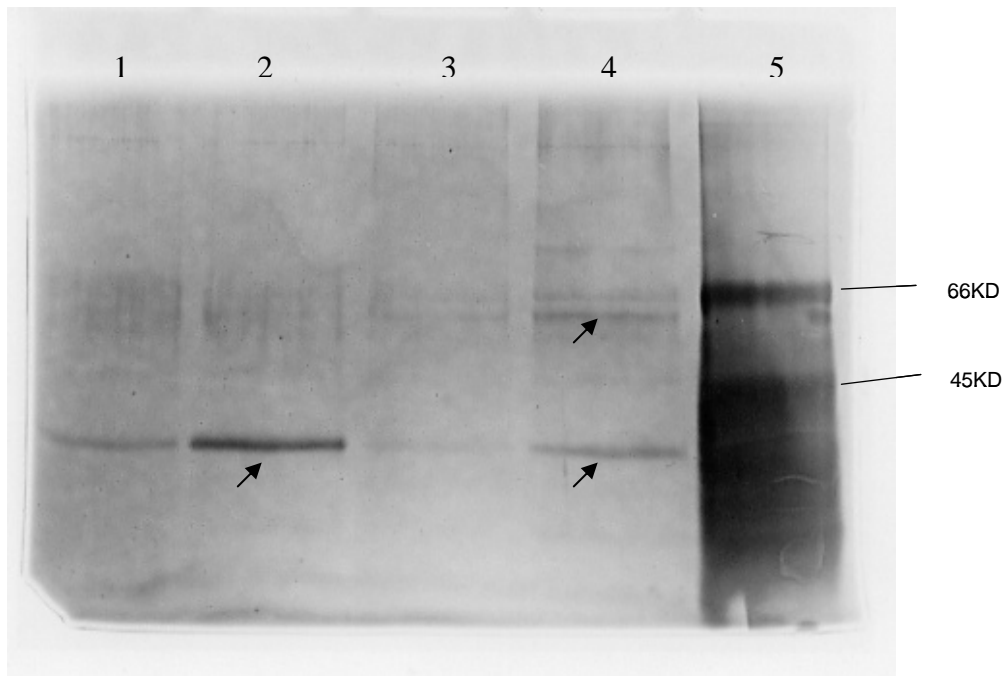


Figura 15. Electroforesis desnaturalizante de las fracciones 39 (carril 1), fracción 39 concentrada (carril 2), fracción 62 (carril 3) y fracción 62 concentrada (carril 4) de la cromatografía en DEAE Sephadex A-50. Carril 5 marcadores de peso molecular.

Habiendo observado que las pectina liasas de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y de HZ no están puras, pero si se encuentran en una gran proporción dentro de las fracciones que las contienen (12 y 39) se decidió por aprovechar esta cualidad para determinar el peso molecular de la pectina liasa de estas cepas.

En la Fig. 16 se presenta la electroforesis desnaturalizante de la fracciones 12 de la cromatografía de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y 39 de la cromatografía de HZ, fracciones concentradas por liofilización, en donde podemos observar que la fracción 12 (carril 1) presenta una serie de bandas de diferente peso, pero sobresaliendo entre estas la banda con un peso molecular de 26 KD, siendo esta

la pectina liasa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. En la fracción 39 (carril 2) se aprecian unas bandas muy tenues de proteína acompañadas de una banda muy marcada con un peso molecular de 30 KD, perteneciente a la pectina liasa de HZ.

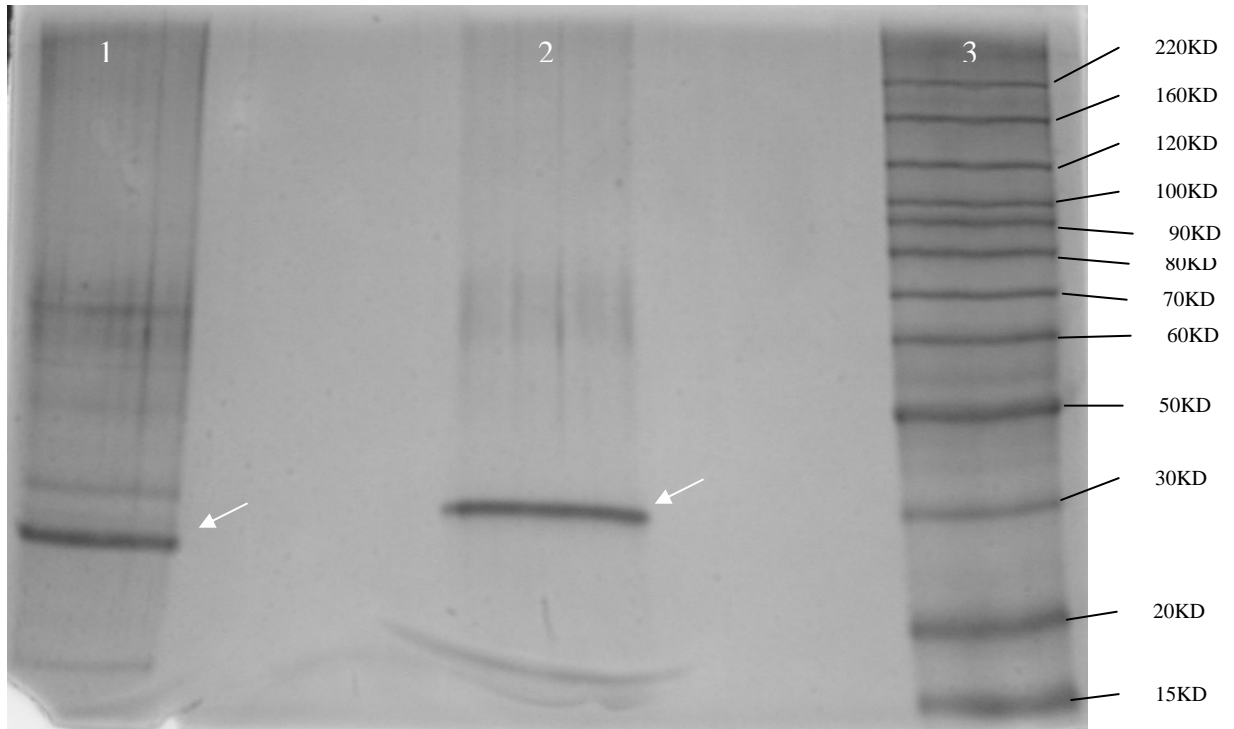


Figura 16. Electroforesis desnaturalizante de las fracciones 12 de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (carril 1), fracción 39 de HZ (carril 2) obtenidas de la cromatografía en DEAE Sephadex A-50. Carril 3 marcadores de peso molecular.

De acuerdo a estos resultados las pectina liasas de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y de HZ no están puras, sin embargo para fines de este trabajo, las preparaciones obtenidas sirvieron para conocer algunas características y poder compararlas.

El peso molecular de la pectina liasa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 es de 26 KD y el de la pectina liasa de HZ es de 30 KD. Pesos moleculares cercanos y dentro del intervalo de los reportados por otras pectina liasas de otros organismos, ya que éstas van de un peso de 28 a 36 KD [Rombouts y Pilnik, 1980].

Por ultimo para observar la especificidad de sustrato de las pectina liasas de las diferentes cepas, se decidió determinar actividad de pectina liasa con los F E-1043, F E-HZ y F E-*A.flavipes* concentrados sobre ácido poligalacturónico, pectina cítrica y pectina de manzana, utilizando un método que solo presenta coloración y absorbancia a 550 nm, al presentarse la formación de ácidos polimetilgalacturónicos insaturados producto de la actividad de pectina liasa, según lo reportado por Nedjma y colaboradores [2001].

En la Tabla 4 podemos observar que ninguna de las pectina liasas de las cepas presentó absorbancia al utilizar ácido poligalacturónico como sustrato para la actividad de pectina liasa, resultado ya esperado pues solo las pectato liasas pueden degradar ácido poligalacturónico [Benen y Visser, 2003] y reafirmando que se trabajó solo con pectina liasas. Las tres pectina liasas de las diferentes cepas mostraron mayor actividad en la pectina cítrica, que en la pectina de manzana. Se observó claramente que la pectina liasa de HZ es la más activa de las tres al presentar mayor absorbancia al degradar la pectina cítrica y la pectina de manzana, resultado que nos permite ver que la pectina liasa del híbrido HZ cuenta con una especificidad diferente de la de las cepas parentales, siendo cada pectina liasa diferente una de la otra.

| Filtrado Enzimático | Absorbancia a 550 nm. | | |
|---------------------|-----------------------|-----------------|--------------------|
| | ac.poligalacturónico | pectina cítrica | pectina de manzana |
| CH-Y-1043 | 0 | 0.076 | 0.033 |
| HZ | 0 | 0.602 | 0.186 |
| <i>A. flavipes</i> | 0 | 0.168 | 0.087 |

Tabla 4. Especificidad por el sustrato de las enzimas pectina liasa de los F E-1043, F E-HZ y F E-*A. flavipes* concentrados. Los resultados son el promedio del triplicado del experimento.

CONCLUSIONES.

La pectina liasa del híbrido HZ es diferente a las de las cepas parentales *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 y *Aspergillus flavipes* ATCC-16795, siendo a la vez distintas entre ellas.

El peso molecular de la pectina liasa de HZ es de 30 KD.

El peso molecular de la pectina liasa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 es de 26 KD.

La pectina liasa del híbrido HZ tiene una actividad específica mayor que las de las cepas parentales.

Gracias a los resultados obtenidos en este estudio y a la suma de resultados obtenidos en otros trabajos se sientan las bases para producir, aislar y purificar en gran escala la enzima pectina liasa y poder comercializarla en la industria alimenticia y evitar la importación de ésta.

BIBLIOGRAFÍA.

Alaña, A., Llama, M.J. y Serra J.L. (1991). "Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*". FEBS Letts. 280, 2: 335-340.

Albersheim, P. y Killias, U. (1962). "Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase". Arch. Biochem. Biophys. 97: 107-115.

Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J. y Serra, J.L. (1998). "Industrial applications of pectic enzymes: a review". Proc. Biochem. 33: 21-28.

Anné, J. (1982). "Comparison of penicillins produced by inter-species hybrids from *Penicillium chrysogenum*". Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 41-46.

Antier, P., Minjares, A., Roussos, S., Raimbault, M. y Viniegra-González, G. (1993). "Pectinase hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp". Enz. Microb. Technol. 15: 254-259.

Benen, J.A.E. y Visser, J. (2003). "Pectate and pectin lyases", en *Handbook of Food Enzymology*. (edis. Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. y Wong, D.W.S.) Marcel Dekker Inc., New York.. pp. 1029-1041.

Benen, J.A.E. y Voragen, A.G.J. (2003). "Pectic enzymes", en *Handbook of Food Enzymology*. (edis. Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. y Wong, D.W.S.) Marcel Dekker Inc., New York. pp. 845-848.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D. y Edelstein, S.J. (1996). "*Protein Methods*". Segunda edición. Wiley-Lis, Inc., U.S.A.

Bos, C.J. (1985). "Protoplast from fungal spores". en *Fungal protoplast. Applications in Biochemistry and Genetics*. (edis. Peberdy J. y Ferenczy, L.) Marcel Dekker, Inc., New York.

Brookes, P. (1990). "The early history of the biological alkylating agents". Mutant. Res. 233: 3-14.

Brown, J., Collins, S. y Wood, T. (1987). "Enhanced enzyme production by cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum* mutant strain NTGIII/6". Enz. Microbiol. Technol. 9: 176-180.

Davis, B. (1985). "Factors influencing protoplast isolation" en *Fungal protoplast. Applications in Biochemistry and Genetics*. (edis. Peberdy J. y Ferenczy, L.) Marcel Dekker, Inc., New York.

Delgado, L., Trejo, B.A., Huitrón, C. y Aguilar, G. (1993). "Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043". *Appl. Microbiol. Biotech.* 39: 515-519.

Eder, E., Favre, A., Deininger, C., Hahn, H. y Kutt, W. (1989). "Induction of SOS repair by monofunctional methanesulfonates in various *Escherichia coli* strains. Structure-activity relationships in comparison with mutagenicity in *Salmonella typhimurium*". *Mutagenesis* 4: 179-186.

Fogarty, W.M. y Kelly, C.T. (1983). "Pectic Enzymes", en *Microbial Enzymes and Biotechnology*. (edit. Fogarty, W.M.) Applied Science Publishers, Belfast. pp. 131-182.

Glazer, A.N. y Nikaido, H. (1995) "*Microbial Biotechnology, Fundamentals of Applied Microbiology*". W.H. Freeman and company, New York. pp. 241-263

Glickman, B., Schaaper, R.M., Haseltine, W.A., Dunn, R.L. y Brash, D.E. (1986). "The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6945-6949.

Grassin, C. y Fauquembergue, P. (1996) "Fruit Juices", en *Industrial Enzymology*. Segunda edición, (edis. Godfrey, T. y West, S.) Macmillan Press LTD, London. pp. 226-260.

Groot, G. S. P., Herweijer, M. A., Simonetti, A. L. M., Selten, G. C. M. y Misset, O. (2000) "Enzymes in food and feed: past, present and future". en *Food Biotechnology*. (edis. Bielecki, S., Tramper, J. y Polak, J.) Elsevier Science B. V. pp. 95-99.

Hoh, Y.K., Tan, T.K. y Yeo, H.H. (1992). "Protoplast fusion of β -glucosidase-producing *Aspergillus niger* strains". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37: 81-88.

Huitrón, C., Saval, S. y Acuña, M.E. (1984). "Production of microbial enzymes from agroindustrial by-products". *Annals of New York Academy of Sciences.* 434: 110-114.

Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. y Tewari, R. (2001). "Applications of pectinases in the commercial sector: a review". *Biores Technol.* 77: 215-227.

Kertesz, Z. I. (1951) "*The Pectic Substances*". Interscience Publishers, New York.

Kester, H. C. M. y Visser, J. (1994). "Purification and characterization of pectin lyase B, a novel pectinolytic enzyme from *Aspergillus niger*". *FEMS Microbiology Letters.* 120:63-68.

Konno, H. y Yamasaki, Y. (1982). "Studies on the pectic substances of plant cell walls". *Plant Physiol.* 69: 864-868.

Larios, G., García, J.M. y Huitrón, C. (1989). "Endopolygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043". *Biotechnol. Letts.* 11: 729-734.

Lowry, O.H., Rosenbrough, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Manchenko, G.P. (2003) "*Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gel*". Segunda Edición. CRC Press, USA. pp. 498-499

Nedjma, M., Hoffman, N. y Belarbi, A. (2001). "Selective and sensitive detection of pectin lyase using a colorimetric test: application to the screening of microorganisms possessing pectin lyase activity". *Anal. Biochem.* 291: 290-296.

Ogawa, K., Ohara, H. y Toyama, M. (1988). "Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *Kawachi* by protoplast fusion". *Agric. Biol. Chem.* 52: 337-342.

Ortiz, G. (1991). "Estudio comparativo sobre el crecimiento y producción de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 y *Aspergillus versicolor* ATCC-16853". Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

Peberdy, J. F. (1979). "Fungal Protoplasts, isolation, reversion and fusion". *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 21-39.

Peberdy, J.F. (1991). "Fungal protoplast". en *More Manipulations in Fungi.* (edit. Benett, J.W.) Academic Press, London. pp. 307-318.

Pe'er, S. y Chet, I. (1990). "*Trichoderma* protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents". *J. Microbiol.* 36: 6-9.

Reymond, P., Veau, P. y Fevre, M. (1988). "Production by protoplast fusion of new strains of *Penicillium caseicolum* for use in the dairy industry". *Enz. Microb. Technol.* 8: 45-47.

Rombouts, F.M. y Pilnik, W. (1980). "Pectic Enzymes", en *Microbial Enzymes and Bioconversions.* (edit. Rose, A.H.) Academic Press, London, 1980. pp. 227-282.

Rowlands, R.T. (1984). "Industrial strain improvement: rational screens and genetic recombination techniques". *Enz. Microbiol. Technol.* 6: 290-300.

Sakiyama, C.C.H., Paula, E.M., Pereira, P.C., Borges, A.C. y Silva, D.O. (2001). "Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries". *Letts. Appl. Microbiol.* 33: 117-121.

Saval, S., Solorzano, R., Alpizar, L., Cea, A. y Huitrón, C. (1982). "Production of pectinases by submerged fermentation of henequen pulp". *Develop. Ind. Microbiol.* (edit. Dupuy, P.). pp. 531-535.

Saval, S. y Huitrón, C. (1983) "Microbial pectinase from henequen pulp". *Develop. Ind. Microbiol.* 24: 547-551.

Schols, H.A. y Voragen, A.G.J. (2003). "Pectic Polysaccharides", en *Handbook of Food Enzymology*. (edit. Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. y Wong, D.W.S.) Marcel Dekker Inc., New York. pp. 829-843.

Schuster, H. (1960). "The reaction of nitrous acid with deoxyribonucleic acid". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2: 320-323.

Smith, J.E. (1996). "Enzyme Technology", en *Biotechnology*. 3ª edición. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 68-91.

Solis, S.E., Flores, M.E. y Huitrón, C. (1990). "Isolation of endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043". *Biotechnol. Letters.* 12: 751-756.

Solis, S.E., Flores, M.E. y Huitrón, C. (1996). "Protoplasts from pectinolytic fungi: isolation, regeneration and pectinolytic enzyme production". *Letts. Appl. Microbiol.* 23: 36-42.

Solis, S.E., Flores, M.E. y Huitrón, C. (1997). "Improvement of pectinase production by interspecific hybrids of *Aspergillus* strains". *Letts. Appl. Microbiol.* 24: 1-6.

Solis, S.E. (1997) "Obtención y caracterización de híbridos por fusión de protoplastos entre cepas de *Aspergillus* productoras de pectinasas". Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México.

Sutherland, I. W. (1995). "Polysaccharide lyases". *FEMS Microbiology Reviews.* 16: 323-347.

Szajer, I. (1974). "Activity of polygalacturonase and pectinesterase of *Penicillium* sp. 7/4B after ethylenimine and UV treatment". *Acta Microbiol. Polon.* 3: 119-123.

Szajer, I. y Szajer, Cz. (1982). "Pectin Lyase of *Penicillium paxilli*". *Biotechnol. Letts.* 4, 9: 549-552.

Takuo, S. (1992). "Degradation of pectins", en *Microbial Degradation of Natural Products*. (edit. Winkelmann, G.) VCH, Weinheim. pp. 57-81.

Uhlig, H. (1998). "Enzymes in juice and winemaking", en *Industrial Enzymes and Their Application*. John Wiley & sons, Inc., New York. pp. 303-323.

Ushijima, S., Nakadai, T. y Uchida, K. (1990). "Further evidence on the interspecific protoplast fusion between *Aspergillus oryzae* and *A. sojae* and subsequent haploidization, with special reference to their production of some hydrolyzing enzymes". *Agric. Biol. Chem.* 54: 2393-2399.

Ushijima, S. (1993). "Improvement of industrial *Aspergillus* fungi", en *Biotechnology Handbooks*. (edit. Smith, J.E.) Plenum Press, New Cork. pp. 41-64.

Van Alebeek, G.-J.W.M., Christensen, T.M.I.E., Schols, H.A., Mikkelsen, J.D. y Voragen, A.G.J. (2002). "Mode of action of Pectin Lyase A of *Aspergillus niger* on differently C₆-substituted oligogalacturonides". *The Journal of Biological Chemistry*. 277, 29: 25929-25936.

Van Someren, K., Plipphi, M., Graff, L., van der Broeck, H., Kester, H., Hinnen, A. y Visser, J. (1992). "Characterization of an *Aspergillus niger* pectin lyase gene family: structure and regulation of expression". *Mol. Gen. Genet*. 244: 113-120.

Walker, J.M. (1988) "Ingeniería enzimática", en *Biología Molecular y Biotecnología*. (edis. Walker, J.M. y Gingold, E.B.), Acribia, Zaragoza. pp. 227-239.

Wangemann-Budde, M. y Schauz, K. (1991). "Intraspecific hybridization of *Ustilago maydis* haploids with compatible and incompatible mating type by electrofusion and generic analysis of the fusion products". *Experim. Mycol*. 15: 159-166.

Ward, O.P. (1989) "Enzimas Industriales", en *Biotecnología de la Fermentación*. Acribia, Zaragoza. pp. 233-248.