



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

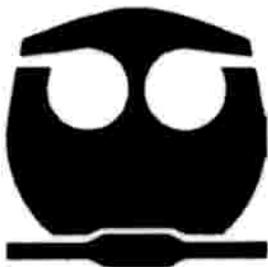
**Producción, purificación y caracterización
de endo-poligalacturonasa de *Aspergillus
flavipes* FP-500**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

GEORGINA VICTORIA ACOSTA



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. RODOLFO PASTELIN PALACIOS
Vocal	Prof. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
Secretario	Prof. JOSE GUILLERMO AGUILAR OSORIO
1er. Suplente	Prof. EDUARDO BONILLA ESPINOSA
2º. Suplente	Prof. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología; Conjunto E laboratorio 312 Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio.

Asesor del tema:

JOSÉ GUILLERMO DE J. AGUILAR OSORIO _____

Sustentante:

GEORGINA VICTORIA ACOSTA _____

El presente trabajo se desarrolló con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Proyectos N° IN207603 y N° IN209007 , y por el Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”, periodo 2006-2007 de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos.

A mis padres; Georgina Acosta Zarate y Juan d Dios R, Victoria Murcio, ustedes que me dieron la vida, que me han dado su cariño y su apoyo, les dedico este trabajo, este es el primer fruto de su esfuerzo por darme una mejor vida y una educación, todo se lo debo a ustedes dos. Gracias por todo. Los amo.

A mis hermanos Omar y Bibi, con quienes comparto peleas y risas, y que me han apoyado gracias por su cariño.

Gustavo Ulises Martínez Ruíz, gracias por amarme tanto.

Marisú Ortega Martínez y G. Carmen Robles Arias,, más que mis amigas mis hermanas, que siempre han estado ahí a pesar de la distancia.

Guillermo Aguilar Osorio, gracias por sus enseñanzas a lo largo de este trabajo.

A Adriana Serrano, Tere Carmona, Adriana Rivas, Claudia Fuentes, Blanca, Paola, Mayahuel, Carlos, Beto y Christian gracias por su amistad.

ÍNDICE

Contenido.

Resumen.....	7
Abreviaturas	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1. Pectinasas	9
1.1. Poligalacturonasas	11
1.1.1. Ocurrencia.....	12
1.1.2. Ensayos.....	13
2. Polisacáridos de la pared celular de la planta	14
2.1. Pectina	17
3. Género <i>Aspergillus</i>	20
3.1. Explotación de <i>Aspergillus</i>	22
3.2. <i>Aspergillus flavipes</i>	23
4. Purificación	24
4.1. Cromatografía	25
4.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	26
II. JUSTIFICACIÓN	29

Páginas

III.	OBJETIVOS.....	29
IV.	MATERIALES Y METODOS.....	30
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
VI.	CONCLUSIONES.....	61
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	62

Páginas

RESUMEN.

Las pectinasas ó enzimas pectinolíticas, son producidas por diferentes microorganismos como los hongos y las bacterias, insectos y plantas, para degradar (obtención de fuente de carbono) y/o modificar (en fruta madura) la compleja estructura de la pectina. La pectina junto con la celulosa y la hemicelulosa son los tres polisacáridos que conforman el 90% de la pared celular de las plantas. Las pectinasas de origen fúngico son ampliamente utilizadas en la industria textil como en la alimenticia, en la maceración de tejidos vegetales, en la clarificación de jugos y de vinos. Debido a la importancia económica que tienen las pectinasas y a la gran capacidad que presentan los hongos del género *Aspergillus* de producir y secretar enzimas pectinolíticas al medio de cultivo, nuestro grupo de trabajo se dio a la tarea de estudiar el sistema pectinolítico de *Aspergillus flavipes* FP-500, en especial la producción de la enzima endo-poligalacturonasa tanto en matraz como en un fermentador Applikon Dependable Instruments, una vez obtenida a dicha enzima se purificó con el uso de la técnica de cromatografía de intercambio iónico y se determinaron las siguientes características bioquímicas: el pH óptimo, el efecto de la temperatura, la estabilidad a pH, el efecto que producen diferentes iones sobre la actividad endo-poligalacturonasa, la afinidad al sustrato utilizando pectinas con diferentes grados de esterificación, así como los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) por medio de la ecuación de Michaelis-Menten y la ecuación de Lineweaver-Burk .

Abreviaturas.

HG = Homogalacturonano.

RG = Ramnogalacturonano.

RGI = Ramnogalacturonano I.

RGII = Ramnogalacturonano II.

PGs = Poligalacturonasas.

PG = Poligalacturonasa.

endo-PGs = endo-poligalacturonasas.

endo-PG = endo-poligalacturonasa.

Exo-PGs = exo-poligalacturonasas.

GH 28 = Familia 28 de las glicosil hidrolasas.

E.C = Comisión de enzimas (Enzyme Comisión).

pH₀ = pH inicial.

MB = Medio basal

vvm = volumen de aire * volumen de medio de cultivo * minuto

DNS = Ácido 3,5-dinitrosalicílico.

FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Pectinasas.

Las pectinasas también llamadas enzimas pécticas, ó enzimas pectinolíticas, son producidas por un gran número de bacterias, levaduras, hongos, protozoarios, insectos y plantas, para degradar (obtención de fuente de carbono) o modificar (en fruta madura) la compleja estructura de la pectina. Las enzimas pectinolíticas producidas por plantas modifican las propiedades de la pared durante el crecimiento y desarrollo del tejido [1, 2, 3]. Las pectinasas son ampliamente utilizadas en la industria textil en la extracción de aceites en la industria textil, en la industria alimenticia, en la maceración de tejidos vegetales, en el tratamiento de aguas residuales y degomización de fibras naturales, para incrementar la producción, en la clarificación de jugos y de vinos, en la fermentación de café y té. La producción de pectinasas por bacterias y hongos filamentosos ha sido ampliamente reportada [1, 2, 4, 5].

Las pectinasas son un grupo de enzimas que degradan sustancias pécticas, y se clasifican de acuerdo a la forma en que actúan sobre el polisacárido [4].

Se dividen en dos grupos:

- I) ESTERASAS. Saponifican el sustrato. Catalizan la des-esterificación de pectina para remover los metoxi ésteres (Figura 1).
- II) DESPOLIMERASAS. Catalizan el rompimiento de los enlaces $\sim 1,4$ glucosídicos del ácido D-Galacturónico de la pectina (Figura 1).

Las despolimerasas se subdividen con base a su mecanismo de acción en hidrolasas y liasas.

Hidrolasas, catalizan la ruptura hidrolítica con la introducción de una molécula de agua a través de un puente de oxígeno por trans-eliminación, la cual rompe el enlace glucosídico sin la participación de una molécula de agua [4, 6, 7].

Las pectinasas también pueden clasificarse con base en el dominio sobre el cual actúan; las que despolimerizan el homogalacturonano (HG), las que despolimerizan el ramnogalacturonano (RG) y las enzimas que actúan sobre las cadenas laterales de las cadenas principales del HG y del RG (enzimas accesorias) [6,7].

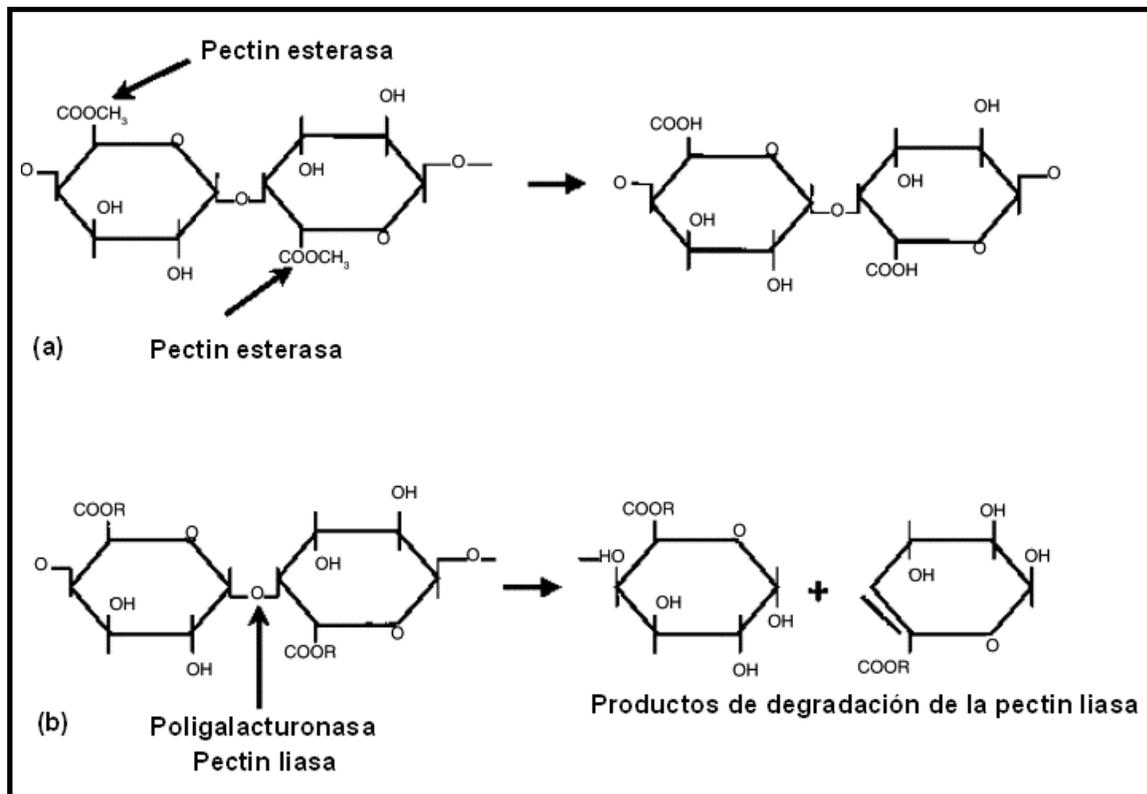


Figura 1. Mecanismo de catálisis de las pectinasas sobre la pectina.

De las enzimas que utilizan al HG como sustrato se han reportado las pectin liasas, las pectato liasas y las poligalacturonasas (Figura 1). Las cuales pueden dividirse dentro de 4 diferentes categorías dependiendo de la preferencia que tenga la enzima por el sustrato, el mecanismo de acción y la descomposición del enlace glucosídico. Las poligalacturonasas y las polimetilgalacturonasas descomponen a pectato y a pectina respectivamente por el mecanismo de hidrólisis. Por otra parte, la poligalacturonato liasa y la polimetilgalacturonato liasa descomponen a pectato y a la pectina por β -eliminación. Dependiendo del patrón de acción sobre el sustrato ya sea al azar o en un extremo terminal, estas enzimas son denominadas endo ó exo-enzimas, respectivamente. Las pectin esterasas, las poligalacturonasas y las pectato liasas se han utilizado en la extracción de jugo de fruta, en despectinación y clarificación; así mismo se ha utilizado a las pectinasas, en combinación con las celulasas y hemicelulasas, para la destrucción de la pared celular y extracción de jugo de fruta [2, 4, 5].

1.1. Poligalacturonasas.

Las poligalacturonasas (PGs) (E.C:3.2.1.15); exo-poligalacturonasas (E.C:3.2.1.67); junto con las ramnogalacturonasas (EC: no definido) pertenecen a la familia 28 de las glicosil hidrolasas (GH 28). Son enzimas pectinolíticas que catalizan la ruptura hidrolítica de la cadena del ácido poligalacturónico con la introducción de una molécula de agua a través de un puente de oxígeno. Las PGs son las enzimas que han sido más estudiadas [7,8, 9, 10].

1.1.1. Ocurrencia.

Las endo-poligalacturonasas (endo-PGs) se encuentran ampliamente distribuidas en hongos, bacterias y muchas levaduras, se han encontrado en algunas plantas. También se encuentran en plantas y en algunos nematodos parásitos de plantas. Se han reportado en muchos microorganismos, incluyendo *Aureobasidium pullulans*, *Rhizictonia solani Kuhn*, *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus sp.*, *Thermomyces lanuginosus*, *Peacilomyces clavisporus*. En contraste las exo-poligalacturonasas (exo-PGs) son menos frecuentes. Se han reportado en *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *E. chrysanthemi*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus sp* [4]. Las poligalacturonasas (PGs) están involucradas en la hidrólisis de sustancias pécticas, aplicaciones técnicas en el procesamiento de alimentos y participan en la interacción planta-hongo. Las PGs tienen propiedades fisicoquímicas interesantes, como valores de pH óptimos ácidos (Tabla 1) y un intervalo de temperatura óptimo de 30-50°C [3, 4].

Tabla 1. pH óptimo de algunas poligalacturonasas obtenidas de diferentes orígenes microbianos

GÉNERO	POLIGALACTURONASAS	PH ÓPTIMO
<i>Aspergillus niger</i> [4]	Endo-PG I	3.8-4.3
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . [4]	PG	4.2-5.0

Se clasifican en tres grupos [3]:

Endo-poligalacturonasas (endo-PGs). Actúan sobre el homogalacturonano. Atacan al azar los enlaces α -1,4 glucosídicos de la cadena del polisacárido produciendo oligómeros de ácido galacturónico.

Exo-poligalacturonasas (exo-PGs) tipo I (galacturonano 1,4- α -galacturonosidasa) hidrolizan al ácido D-galacturónico del extremo no reductor del HG.

Exo-poligalacturonasas tipo II (exo-poli α -galacturonosidasas), liberan digalacturonato del extremo terminal no reductor del ácido poligalacturónico.

Las exo-PGs fúngicas producen ácido monogalacturónico como principal producto final, mientras que las exo-PGs bacterianas, producen ácido digalacturónico como principal producto final.

1.1.2. Ensayos.

La actividad poligacturonasa se puede determinar por [4]:

- a) El incremento de azúcares reductores.
- b) La pérdida de la viscosidad de la solución de sustrato.

La cantidad de azúcares reductores puede ser medida con facilidad por medio de métodos colorimétricos, como el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y el método del arsenomolibdato-cobre.

Una unidad de actividad enzimática es definida como la capacidad de la enzima de producir $1 \text{ } \mu\text{mol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ de ácido galacturónico bajo condiciones estándar en el ensayo. También se ha encontrado un amplio uso de la medición de la

reducción de viscosidad en la determinación de la actividad poligalacturonasa, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{reducción de viscosidad} = \frac{T_0 - T_t}{T_0 - T_w}$$

Donde T_0 , T_t y T_w representan el tiempo de flujo (en el capilar del viscosímetro) en segundos de la mezcla de reacción sin enzima, la mezcla problema y agua respectivamente. En la determinación de la actividad PG es más común expresar la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima requerida para lograr cierta disminución de la viscosidad por unidad tiempo [4].

2. Polisacáridos de la pared celular de la planta

La pared celular de las plantas es una estructura compleja compuesta por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina), proteínas, lignina y algunas sustancias de incrustación como cutina, suberina y compuestos inorgánicos. Se divide en pared celular primaria y secundaria (Figura 2). En la pared celular primaria se encuentran las células jóvenes e indiferenciadas y éstas, a su vez, se convierten en pared celular secundaria una vez que la pared celular primaria ha dejado de crecer [5, 11].

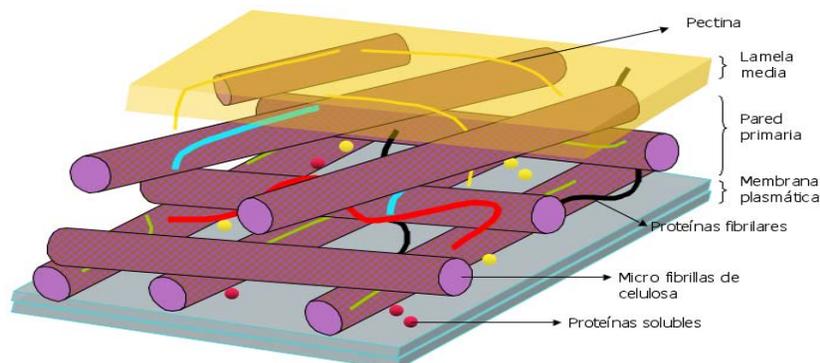


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular vegetal.

En general, la pared celular primaria de las plantas está compuesta por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina), proteínas y dos estructuras denominadas monocotiledonias y dicotiledonias; la pared celular primaria contiene microfibrillas de celulosa dentro de una matriz amorfa de diferentes polisacáridos. Las monocotiledonias, de la pared celular primaria contienen arabinoxilano como su componente principal, en las dicotiledonias el componente principal es el xiloglucano. Tanto en monocotiledonias y dicotiledonias, la pectina es parte integral de la matriz de la pared celular primaria debido a que mantiene unidos a la celulosa y a la hemicelulosa (arabinoxilano y xiloglucano) [12].

La pared celular secundaria contiene un polímero complejo llamado lignina. La lignina es un polímero tridimensional constituido por diferentes monómeros llamados monolignoles. Estos monómeros son alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Figura 3) los cuales al ser polimerizados forman a la lignina [13].

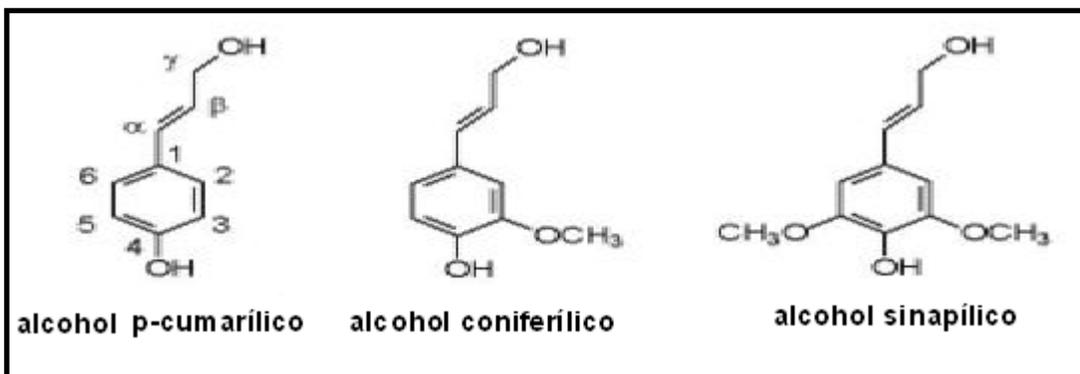


Figura 3. Monómeros que conforman a la lignina.

Los polisacáridos de la pared celular de las plantas son los compuestos orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza. Estos conforman el 90% de la pared celular de la planta y se pueden dividir en tres grupos: celulosas, hemicelulosa, y pectina [12, 13].

La celulosa es el mayor constituyente de los polisacáridos de la pared celular. Es un polímero lineal formado por residuos de D-glucosa unidos por enlaces β -1,4 y se encuentran arreglados en estructuras ordenadas llamadas fibras y su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular de la planta.

Hemicelulosa es el polisacárido más heterogéneo y es la segunda estructura orgánica más abundante de la pared celular de la planta. El polímero de hemicelulosa que se ha encontrado en cereales y madera dura, es el xilano. El xilano es un polisacárido lineal formado por residuos de D-xilosa unidos por enlaces β -1,4 y el cual puede estar sustituido por cadenas laterales de residuos de diferentes grupos como L-arabinosa, D-galactosa, acetilo, feruloilo, p-cumarílico, y residuos de ácido glucorónico. La segunda estructura más común de la hemicelulosa en maderas suaves y duras es el glucomanano, en él cual la cadena principal está compuesta por residuos de D-glucosa y D-manosa unidos por enlaces β -1,4 y puede estar sustituido por cadenas laterales de D-galactosa. La función estructural de los polisacáridos de la hemicelulosa es interconectar las fibrillas de celulosa con los polisacáridos de la pectina [6, 13].

La pectina es la tercera estructura orgánica que conforma a la pared celular de la planta. Es un heteropolisacárido lineal formado por residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -1,4 [13]

Los polisacáridos hemicelulosa y pectina, así como también los polímeros aromáticos de la lignina, interactúan con las fibrillas de celulosa confiriendo rigidez a la estructura de la pared celular de la planta; también forman enlaces covalentes. Se cree que también están involucrados con la limitación del crecimiento de la célula vegetal y la reducción de la biodegradabilidad de la pared celular [11, 13].

Se han identificado dos tipos de enlaces covalentes entre los polisacáridos de la pared celular y la lignina. El primer enlace es formado por puentes de ácido diferúlico, como ocurre entre la lignina y xilano del trigo, entre los polímeros de la pectina y el azúcar de la remolacha. El segundo tipo, es formado por un enlace tipo éster entre la lignina y el ácido glucorónico unido a xilano, el cual ha sido identificado en la madera de haya. Recientemente se ha reportado un tercer enlace el cual involucra la unión de una proteína a pectina, la formación de este enlace depende del pH [13].

2.1. PECTINA.

La pectina es un heteropolisacárido que se encuentra en la lámina media de la pared celular primaria de las plantas superiores. La función de la pectina es mantener unidos a los polisacáridos de la pared celular (celulosa y hemicelulosa) y a las proteínas como la hidroxiprolina [3].

La pectina esta formada por dos regiones diferentes, una lisa y una ramificada (peluda) (Figura 4). En la región lisa se ha identificado un dominio denominado homogalacturonano (HG), el cual esta formado por una cadena lineal de residuos

de ácido D-galacturónico, unidos por enlaces α -1,4, los cuales pueden estar esterificados en los grupos carboxilo por grupos acetilo en orto-2 o orto-3 o grupos metoxilo en orto-6. La remoción de los grupos metil éster de la pectina dentro de la matriz de la pared celular de las plantas resulta en un HG capaz de formar entrecruzamientos mediante calcio y formar arreglos supramoleculares y geles [13, 14].

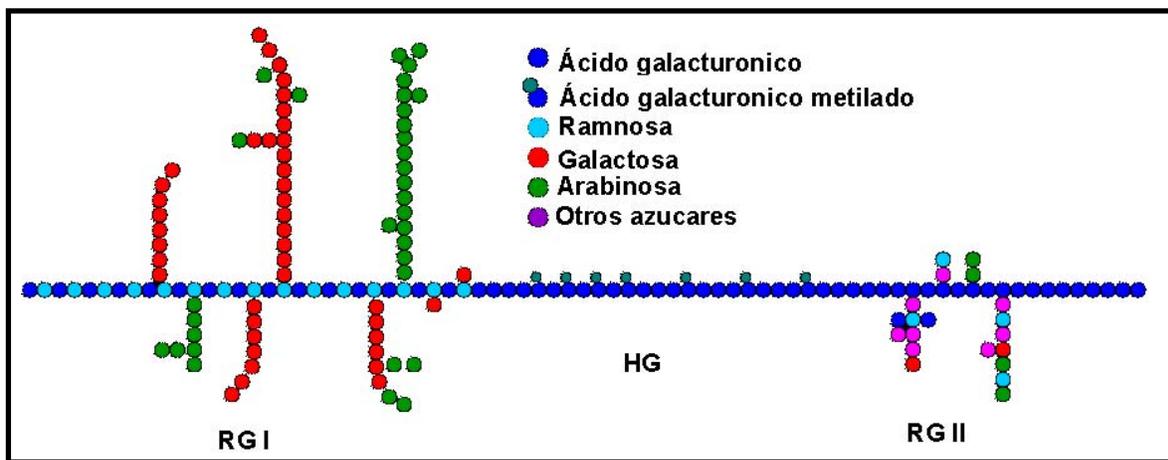


Figura 4. Representación esquemática de la molécula de pectina.

La segunda, denominada región peluda, en la cual se han identificado dos dominios diferentes; el ramnogalacturonano I (RGI) y el ramnogalacturonano II (RGII). El RGI, su cadena principal está formada por residuos de ácido D-galacturónico y está interrumpida por residuos de L-ramnosa unida en α -1,2, la cual esta ramificada con cadenas de arabinanos y galactanos que pueden estar unidos en orto-4. La cadena principal de arabinanos consiste en residuos de L-arabinosa unidos en α -1,5 y pueden estar sustituidos por residuos de L-arabinosa unidos en α -1,3 y por residuos de ácido ferúlico unido en el extremo terminal orto-

2 de los residuos de arabinosa. La cadena principal de galactano esta formada por residuos de D-galactosa unidos en -1,4, que pueden estar sustituidos por residuos de ácido ferúlico en orto-6. El RGI también contiene grupos acetilos unidos a la cadena principal de ácido galacturónico por enlace tipo éster en orto-2 ó orto-3. El RGII es un polisacárido formado por una cadena lineal de aproximadamente 30 unidades de ácido galacturónico la cual está substituida por cuatro cadenas laterales. Dichas cadenas están compuestas por; 2-orto-metil-L-fucosa y ácido 3-deoxi-D-manno-2-octulosónico. No se sabe si el RGII está unido covalentemente a la cadena principal de pectina [14].

Se ha logrado conocer la estructura primaria de los polisacáridos que conforman a la pectina al determinar las siguientes características [11]:

1. La composición de los residuos glucosídicos.
2. El enlace glucosídico.
3. La configuración (D ó L), la formación de anillos (piranosa o furanosa), y las configuraciones anoméricas (α ó β).
4. La secuencia de los residuos glucosídicos.
5. La localización de los sustituyentes, (grupos orto-metil y orto- acetil).

Hasta la fecha solo se conocen tres polisacáridos pecticos (homogalacturonano, ramnogalacturonano y galacturonano substituido), los cuales se han aislado de la pared celular primaria [11].

En la literatura se puede encontrar otra clasificación para los polisacáridos de la pared celular de las plantas también son llamados sustancias pécticas, el cual es el nombre genérico usado para los compuestos sobre los cuales actúan las enzimas pectinolíticas. Son de alto peso molecular, cargadas negativamente y

forman complejos glucosídicos macromoleculares (polisacáridos), presentes en el reino vegetal [4]. Las sustancias pécticas son abundantes en la biomasa de la planta, constituyen del 4-30% en la pulpa de remolacha y en la piel de los cítricos [1]. De forma contraria a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos la existencia de las sustancias pécticas no se define por su peso molecular. El peso molecular de las sustancias pécticas se encuentra dentro de un rango de 25 a 360 KDa (Tabla 2) [4].

Tabla 2. Peso molecular de algunas sustancias pécticas

FUENTE	PESO MOLECULAR (KDA)
Manzana y limón	200-360
Pera y ciruela pasa	25-35
Naranja	40-50
Pulpa de azúcar de remolacha	40-50

3. Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* constituye un grupo de hongos filamentosos que involucran un gran número de especies. Las cuales pertenecen a los primeros organismos fúngicos en ser sembrados en medios artificiales y en ser estudiadas sus propiedades bioquímicas, ya que son unos de los hongos más comunes en el medio ambiente [15].

Desde hace mucho tiempo, las especies de *Aspergillus* se han utilizado en Japón y otros países Asiáticos en la fermentación de alimentos. El género *Aspergillus* ha sido ampliamente estudiado debido a que es un productor de enzimas industriales, participa en el reciclaje de la materia orgánica y tiene amplias capacidades metabólicas para la utilización de un gran número de sustratos. Por lo que no es sorpresa que *Aspergillus* juegue un papel significativo en la actualidad en el campo de la biotecnología [15].

El origen del nombre *Aspergillus* (cabeza áspera) data desde el siglo XVIII, cuando Micheli (1729) describe a mohos con conidióforos y cabezas que portan cadenas de esporas. De cualquier modo, tomo casi 200 años, tener la primera clave taxonómica para la clasificación de *Aspergilli* [3, 15].

Los principales criterios para la clasificación de *Aspergillus* aislados eran [3]:

1. El color de las cabezas conidiales.
2. Superficie y color del pedúnculo.
3. Forma de las vesículas.
4. Ausencia o presencia de métulas.

Aspergillus se ha caracterizado por su estructura morfológica (Figura 5). El conidióforo que incluye “el tallo” y la cabeza conidial, y estructuras especializadas que surgen de la pared micelial esta estructura es llamada “célula pie”. Los conidioforos no septados, se prolongan al ápice y terminan en una vesícula globosa y de color amarillenta. Sobre la superficie de la vesícula, se encuentra la métula la cual tiene una superficie de 10-15 μm de largo, generalmente de color marrón oscuro, y sobre estas se encuentra la fiálide. Los conidios se producen sucesivamente de las extremidades de las fiálides, de esta manera se forman

cadenas secas no ramificadas. La conidia es ornamentada o lisa, de forma más o menos globosa y tiene un diámetro de 4-5 μ m de diámetro pero ocasionalmente es más pequeña [3].

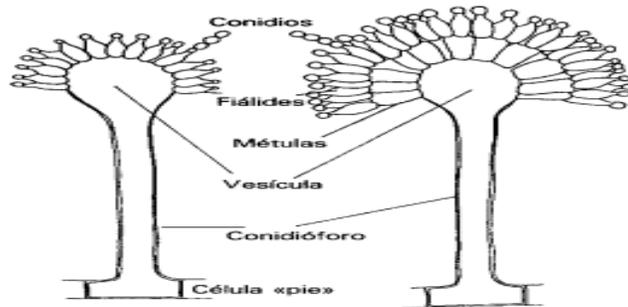


Figura 5. Morfología del género *Aspergillus*

Además de las técnicas morfológicas tradicionales, también se han utilizado nuevas técnicas moleculares y bioquímicas en la reclasificación del grupo *Aspergilli*. Estos análisis dieron lugar a una clara distinción de ocho grupos de *Aspergilli* negro (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. heteromorphus*, y *A. ellipticus*). Varios de los productos obtenidos de estas especies son considerados GRAS (Generally Regarded As Safe), lo cuál permite que sean utilizados en alimentos. El grupo de *Aspergilli* negros tiene varias características que lo hacen un organismo ideal para aplicaciones industriales, como lo son su capacidad de fermentación y los altos niveles de secreción de proteína, su amplia capacidad de producir enzimas por lo que es de gran importancia en la industria alimentaria [15].

3.1 Explotación de *Aspergillus*

Aspergillus a sido ampliamente utilizado en la industria, como es el caso de producción de metabolitos primarios (ácidos orgánicos, vitaminas, ácidos grasos y aminoácidos) y enzimas como fuente para la bioconversión de procesos. Un ejemplo de esto es *Aspergillus niger* desde 1917 se ha utilizado para la producción de ácido cítrico, el cual es aceptado universalmente como aditivo en alimentos, bebidas, en la industria cosmética y farmacéutica en los procesos industriales [15]. Para la elaboración del sake, bebida alcohólica japonesa, se utiliza un cultivo puro de *Aspergillus oryzae* para realizar una fermentación, en la cual se producen varias enzimas, entre las que destacan las amilasas que desdoblan e hidrolizan el almidón [16].

3.2 *Aspergillus flavipes* FP-500

Debido a la importancia económica que tienen las pectinasas y a la gran capacidad que presentan los hongos del género *Aspergillus* de producir y secretar enzimas al medio de cultivo [13], nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de estudiar cuales son los factores que afectan la producción de este tipo de enzimas por cepas del género *Aspergillus*, aisladas en nuestro laboratorio de fuentes naturales. A lo largo de este trabajo, se ha observado que en el laboratorio existen cepas capaces de producir altos niveles de actividades pectinolíticas, comparadas con cepas denominadas como buenas productoras.

A. flavipes FP-500 fue aislada en la ciudad de México de una fruta en descomposición y a diferencia de otras cepas como las de *A. niger*, esta crece mejor a 37°C que a 30°C. Presenta un gran potencial en su capacidad de producir enzimas pectinolíticas. Presenta diferencias en los niveles de producción de enzimas pectinolíticas y en los perfiles enzimáticos a diferentes valores de pH inicial (pH₀), comparada con cepas denominadas como buenas productoras de pectinasas. Esta cepa produce 12.6 veces más actividad endo-PG específica que la cepa *A. niger* N-402 cuando se utiliza pectina como fuente de carbono a 37°C y pH₀ de 5.0-5.5 [17]. En el laboratorio se ha observado que los niveles de producción de actividad endo-PG aumentan cuando *A. flavipes* FP-500 es cultivada a bajos valores de pH₀ (1.8 y 2.5) cuando se utiliza pectina como fuente de carbono [18]. Se ha observado que cuando se utilizan desechos agroindustriales como la cáscara de limón, el desecho de uva y el desecho de la manzana como fuente de carbono, los niveles de producción de actividad endo-PG aumentan hasta 5 veces más comparado con lo obtenido en pectina, esto a pH₀ de 5.0-5.5 mejoran la producción de la enzima endo-PG cuando se utilizan sustratos complejos como los desechos de manzana. En este último, la producción de la actividad endo-PG por *A. flavipes* FP-500 se ve reprimida por altas concentraciones de azúcares reductores, los cuales son producto de la degradación que sufre el desecho de manzana, la cual sugiere que esta enzima está sujeta a represión catabólica por la fuente de carbono. La enzima endo-PG producida por esta cepa presenta un pH óptimo de 3.0; tiene la capacidad de reducir la viscosidad de una solución de pectina al 1%(p/v) de una forma rápida,

comparada con enzimas endo-PG de *A. niger* N-402, la cual es considerada como una cepa productora de pectinasas [19, 20].

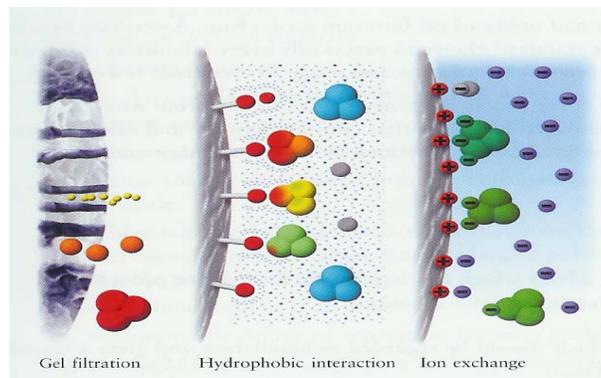
4. Purificación.

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento. En una serie de etapas independientes, se emplean las diversas propiedades fisicoquímicas de las proteínas que interesan para separarlas progresivamente de las demás sustancias. Se busca eliminar selectivamente a los demás componentes de la mezcla de la sustancia que se busca que permanezca. Las características de las proteínas y otras biomoléculas que se emplean en los diversos procedimientos de separación son solubilidad, carga iónica, tamaño molecular, propiedades de absorción y capacidad de unión a otras moléculas biológicas [21, 22].

4.1 Cromatografía

Uno de los métodos de utilidad más general para el fraccionamiento de las proteínas es el de cromatografía, técnica desarrollada para separar pequeñas moléculas como azúcares y aminoácidos. Un tipo muy común de cromatografía, todavía utilizado actualmente para separar pequeñas moléculas, es la cromatografía de partición. Las proteínas se suelen fraccionar mediante la cromatografía en columna, en la que la mezcla de proteínas en solución se hace pasar a través de una columna que tiene una matriz sólida porosa. Las diferentes proteínas de la mezcla se van retrasando más o menos a causa de su interacción con la matriz de la columna y pueden recogerse por separado en su estado

funcional nativo a medida que fluyen por el extremo inferior de la columna. Separación diferencial de los componentes de la muestra entre una fase móvil y una fase estacionaria. Mayoritariamente la fase estacionaria consiste en partículas esféricas que se encuentran empacadas dentro de una columna. En función del tipo de matriz que se utilice, las proteínas se pueden separar según su carga (cromatografía de intercambio iónico), su hidrofobicidad (cromatografía hidrofóbica), su tamaño (cromatografía de filtración), o su capacidad para unirse a determinados grupos químicos (cromatografía de afinidad) (Figura 6). Refinamientos más modernos de los métodos cromatográficos son la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), y la cromatografía líquida de media presión (FPLC). La cromatografía en columna no produce fracciones altamente purificadas si se parte de una mezcla compleja de proteínas, para conseguir purificarlas suele ser necesario utilizar sucesivamente varios tipos diferentes de columnas para conseguir la pureza suficiente. [21, 22].



Filtración en gel Interacción hidrofóbica Intercambio iónico
Figura 6. Representación esquemática de las interacciones entre la matriz y las proteínas en los diferentes tipos de cromatografía.

4.2 Cromatografía de intercambio iónico (IEX).

Las columnas de intercambio iónico están llenas de pequeñas bolitas que contienen cargas positivas o negativas, de modo que las proteínas se separan en función de la disposición de cargas de su superficie. La separación de proteínas por intercambio iónico se basa en su carga, esto puede ser utilizado para la resolución de una mezcla de proteínas que sólo se diferencian marginalmente entre sí en sus grupos cargados. Para que la matriz pueda unir a las proteínas está debe contar con grupos cargados positivamente (intercambiador aniónico) o negativamente (intercambiadores catiónicos). Los intercambiadores iónicos se hallan constituidos por grupos unidos covalentemente a la matriz. En el caso de los intercambiadores catiónicos, la matriz contiene unidos grupos aniónicos, con carga negativa. En los intercambiadores aniónicos, la matriz contiene unidos grupos catiónicos, con carga positiva. Las matrices utilizadas habitualmente para separar proteínas son la dietilaminoetilcelulosa (DEAE-celulosa) de carga positiva, la carboximetilcelulosa (CM-celulosa) y la fosfocelulosa, de carga negativa.

En el intercambio iónico, las proteínas se unen a la matriz mientras son cargadas a la columna. La fuerza de unión entre moléculas disueltas y la matriz de intercambio iónico depende de la fuerza iónica y del pH de la solución eluyente que atraviesa la columna. La separación entre las proteínas y la matriz, está basada en la interacción reversible entre la carga neta de la proteína y la carga de la matriz (Figura 7).

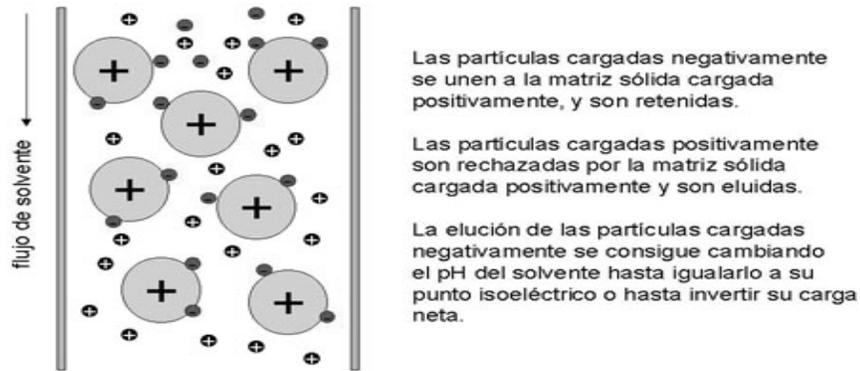


Figura 7. Principio de la cromatografía de intercambio iónico

Las condiciones para alterar esa unión son haciendo uso de sustancias eluyentes. La elución se ejecuta usualmente, con un incremento de la concentración de sal (NaCl) ó cambio en el pH. Los cambios se realizan por etapas o con un gradiente continuo. Comúnmente las muestras son eluidas con sal (NaCl) usando un gradiente de elución. Las proteínas de interés se concentran durante la unión y se recogen en una forma purificada y concentrada. La carga neta de la superficie de las proteínas varía de acuerdo al pH en que se encuentran. La cromatografía de intercambio iónico se utiliza típicamente para unir la molécula de interés, pero puede también ser utilizada para unir y así eliminar impurezas si es requerido. Se puede repetir en diversos valores de pH para separar varias proteínas que tengan distintas cargas y diversas características. Siendo esto una ventaja ya que se puede usar durante diversos pasos de la purificación. [21, 22.]

II. JUSTIFICACIÓN.

Las enzimas pectinolíticas son muy usadas hoy en día en la industria alimentaria, en la clarificación de vinos, reducción de viscosidad en jugos, para incrementar los rendimientos de extracción en jugos. Las enzimas más utilizadas para estos fines son producidas por *A. niger*, que es considerado GRAS. Continuamente hay una búsqueda de microorganismos productores de enzimas pectinolíticas, los cuales superen los niveles de producción de *A. niger*, o encontrar enzimas con mejores características. No basta con solo identificarlos, sino también estudiar las características de dichas enzimas, y para poder realizarlo es necesario tener a la enzima en un estado puro.

III. OBJETIVO

Producir, purificar y caracterizar a la endo-poligalacturonasa producida por *Aspergillus flavipes* FP-500.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

Desarrollar un protocolo de purificación utilizando las técnicas de cromatografía de intercambio iónico e interacción hidrofóbica, en la purificación de la endo-poligalacturonasa.

Determinar las características bioquímicas y cinéticas de la endo-poligalacturonasa de *A. flavipes* FP-500.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismo.

Se utilizó la cepa *A. flavipes* FP 500, proveniente del cepario del laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos (aislada de frutas en estado de descomposición). La cepa fue sembrada en placa con medio agar papa dextrosa (PDA) e incubada a 37°C por 72 horas. Al término de este tiempo se almacenó a 4°C, con resiembras mensuales para mantener a la cepa viable.

4.2 Propagación del inóculo

El microorganismo se sembró en placas de agar papa dextrosa (PDA) bajo condiciones estériles y se incubó a 37°C durante 72 horas. Al término de este periodo de crecimiento y esporulación de la cepa, se procedió a la cosecha de esporas. Las esporas se suspendieron en 10 mL de solución salina (0.9% P/V) Tween 80 al 0.005V/V estéril y se contaron en una cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas.

4.2.1. Inoculo para matraz.

Se inocularon matraces de 500 mL con 100 mL de medio basal, con una concentración final en el medio de cultivo de 1×10^6 esporas/mL.

4.2.2. Inoculo para fermentador

Se concentró la suspensión de esporas por centrifugación a 4500 rpm por 5 minutos, se resuspendió en 5 mL de solución salina (0.9% P/V) Tween 80 al 0.005V/V y se contaron en la cámara Neubauer, con esto se inoculó el fermentador Applikon Dependable Instruments con capacidad de 3 L, y capacidad

operacional de 2.1 L, con una concentración final en el medio de cultivo de 1×10^6 esporas/mL.

4.3 Medios y condiciones de cultivo.

4.3.1. Medio sólido.

El medio de cultivo utilizado para la selección, cultivo y mantenimiento de la cepa *A. flavipes FP-500* fue en agar papa dextrosa (PDA). El cultivo en medio sólido se incubó en estufa a 37°C por 72 horas.

4.3.2. Medio sumergido.

Para cultivar el microorganismo en medio sumergido y llevar a cabo la producción de enzimas pectinolíticas se utilizó medio basal, el cual tiene la siguiente composición: KH_2PO_4 al 0.2%, K_2HPO_4 al 0.2% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0.5%, y se utilizó cáscara de limón al 1% como fuente de carbono. Se ajustó el pH a 4.2.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizó agua destilada para la preparación de los medios. La esterilización de los medios se realizó a 121°C y 1 atmósfera durante 15 minutos.

4.3.3. Cultivos sumergidos

Los matraces de 500 mL, se incubaron a 37°C por 72 horas, con agitación reciproca a 200 rpm. Se tomaron muestras de 5 mL a las 0, 24, 48 y 72 horas para determinar la actividad enzimática.

El fermentador Applikon Dependable Instruments con capacidad de 3 litros, y capacidad operacional de 2.1 L. Con las siguientes relaciones geométricas estándar: Diámetro impulsor (Di) = 4.6 cm. Diámetro tanque (DT)= 12.9 cm. Altura de tanque (HT)= 25 cm. Número de impulsores (n)= 2. Número de baffles (b)= 3.

Ancho de baffles (j)= 1.39 cm. Distancia del fondo del primer impulsor (E)= Di. Con un flujo de aire de 0.5 vvm. Temperatura de 37°C y un valor de pH de 5 + 0.025

Se tomaron 12 muestras a lo largo de 72 horas, para determinar la actividad enzimática.

4.4 Determinación de grupos reductores para determinar consumo de sustrato.*

Se determinó con filtrados libres de células, usando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [23]. La valoración se hizo respecto a una curva patrón hecha con ácido D-galacturónico en un intervalo de concentración entre 0 a 1 mg/mL. Los productos de degradación de la pectina se expresaron como mg/mL de ácido D-galacturónico.

4.5 Actividad exo-pectinolítica medida por grupos reductores.*

La mezcla de reacción estuvo constituida por 0.5 mL de una solución de pectina 1% (p/v) en agua destilada, 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM pH 5 y la reacción se inició con la adición de 0.1 mL de filtrado libre de células, se incubó durante 20 min a 45°C. Al término de este tiempo de incubación se agregó 2 mL de reactivo DNS, se calentó a ebullición, se agregaron 5 mL de agua destilada y se leyó a 575 nm para medir los azúcares reductores producidos por la degradación del sustrato. Como blanco se utilizó un filtrado libre de células inactivado. La actividad se expresó en unidades (U), definidas como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 mol de producto (ácido D-galacturónico) en las condiciones de ensayo.

4.6 Actividad endo-pectinolítica.*

Se evaluó por el cambio de viscosidad de una solución de pectina al 1% p/v disuelta en una solución amortiguadora de acetatos 100 mM, pH 4.2 con NaCl (0.03% p/v) y a una temperatura de 30°C, en un viscosímetro Oswald (Kimax®). Se utilizaron 0.5 mL de filtrado libre de células en 10 mL de la solución de pectina durante diferentes tiempos de reacción. Se mide el tiempo de reacción y el tiempo que tarda en fluir la solución de pectina una distancia fija del viscosímetro. Una unidad de actividad endo-pectinolítica se define como la cantidad de enzima que redujo en un 50% la viscosidad de la solución de pectina, en un tiempo de 10 minutos [24].

4.7 Purificación.*

El filtrado enzimático se diluyó 1:1 con agua destilada, se ajustó el pH a 6, se agregó 1% (V/V) de resina Streamline™ QXL de Amersham Biosciences de rápida sedimentación, se incubó a 8°C durante 18 horas a 150 rpm.

Se utilizó una columna de intercambio iónico: High Q Cartridge (BIO RAD), y el equipo Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), Pharmacia Biotech.

Columna de intercambio iónico Econo-Pac High Q cartridge. BIORAD

Tipo: fuerte intercambio iónico.

Grupo funcional: $-N^+(CH_3)_3$

Volumen 5 mL

Capacidad de unión de proteína: > 75 mg ferritina

Capacidad iónica de la matriz: 190 + 40 eq

Diámetro de partícula 50 μ m

Tamaño de poro 1000 Å

Intervalo de pH 2-12

Para la elución de proteína de la resina Streamline™ QXL de Amersham Biosciences y de la columna de intercambio iónico Econo-Pac High Q cartridge. BIORAD, se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 6, 1 M de cloruro de sodio. Todas las soluciones empleadas para la cromatografía fueron filtradas con membrana de 0.45 μ m, y desaeradas por sonicación por 30 minutos.

4.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS PolyAcrylamide-Gel Electrophoresis [SDS PAGE]).*

Se realizó en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles con 10 y 12% de acrilamida. La electroforesis se corrió con 500 μ g de proteína en cada muestra, a corriente constante (20 mA) por espacio de 1 hora a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm Mighty Small SE-245 (Hoefer Sci Ins USA). Después de ese tiempo los geles se sumergieron en una disolución de azul de coomassie R-250 (Bio-Rad Laboratorios) al 0.125%, metanol al 50% v/v y ácido acético al 10% v/v, durante una hora, para teñir proteína y se destiñeron con una solución de ácido acético al 10% v/v.

4.9 Determinación de actividad enzimática sobre el gel de SDS-PAGE (zimograma).*

Para esta determinación se corrió un gel SDS-PAGE en las condiciones antes descritas, sin someterlo al proceso de tinción. Se sumergió en una solución amortiguadora renaturalizante (Tris 100 mM pH 6.8) y se mantuvo en agitación a 20 rpm a 37°C durante 1.5 horas (se realizó cambio de amortiguador cada 30 minutos). Posteriormente, se sumergió en una disolución de sustrato (pectina 1% p/v, a pH 5) durante una hora a 37°C. Finalmente, el gel fue revelado con una solución de rojo de rutenio al 0.05%(p/V). Esto permitió observar bandas de degradación que indican la presencia de proteínas con actividad sobre el sustrato utilizado.

*Se realizaron por duplicado.

4.10 Secuenciación.

4.10.1 Degradación de Edman

Una propiedad muy importante de los enlaces peptídicos es que el nitrógeno amídico puede ser desplazado del enlace peptídico por su reacción con el grupo tiocarbamida en medio ácido. Como una tiocarbamida-N substituida se puede generar a partir de la reacción entre una amina y un isotiocianato (reacción que ocurre en medio básico), es posible hacer reaccionar el extremo amino de un péptido con fenilisotiocianato en medio básico, para formar el péptido feniltiocarbamilado correspondiente. Luego de lavar el exceso de fenilisotiocianato, se aplica un medio ácido y el tiocarbamoilo correspondiente formará un ciclo de 5 miembros llamado feniltiohidantoina con el carbonilo del enlace peptídico adyacente. El resultado es un péptido más corto, con un nuevo extremo amino y la feniltiohidantoina del primer aminoácido [25].

4.10.2. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas nano ESI LC-MS/MS

La espectrometría de masas ESI-MS permite la identificación de proteínas a través de la interpretación de los espectros de fragmentación de péptidos generados a partir de la proteólisis (habitualmente con tripsina) de proteínas. La muestra es introducida, aunque no necesariamente, en el espectrómetro de masas previo fraccionamiento mediante una nano columna (100 M de diámetro interno) de fase reversa (C18). Esto permite la entrada secuencial de los péptidos generados en la proteólisis y su aislamiento y fragmentación por el espectrómetro de masas. Este tipo de espectrometría de masas se conoce habitualmente por el nombre de espectrometría de masas de trampa iónica o "ion-trap MS". La principal ventaja respecto a la identificación de proteínas por huella peptídica o "fingerprint" es su menor dependencia de las bases de datos, ya que requiere menor homología con las proteínas presentes en dichas bases. Otra ventaja importante es que puede analizar mezclas complejas de proteínas sin necesidad de fraccionarlas previamente, por ejemplo, mediante SDS-PAGE mono o bidimensional. Sin embargo, los niveles de sensibilidad son menores. [26].

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Producción de endo-PG en matraz.

Se inocularon 5 matraces con *A. flavipes* FP-500 conteniendo medio basal (MB) con cáscara de limón al 1% como única fuente de carbono a pH 4.2. Se incubaron

a 37°C, 200 rpm por 72 horas. Al cabo de ese tiempo se cosechó y se obtuvo el filtrado enzimático, al cual se le determinó la actividad endo-PG producida (Tabla 3).

Tabla 3 Actividad endo-PG del filtrado enzimático

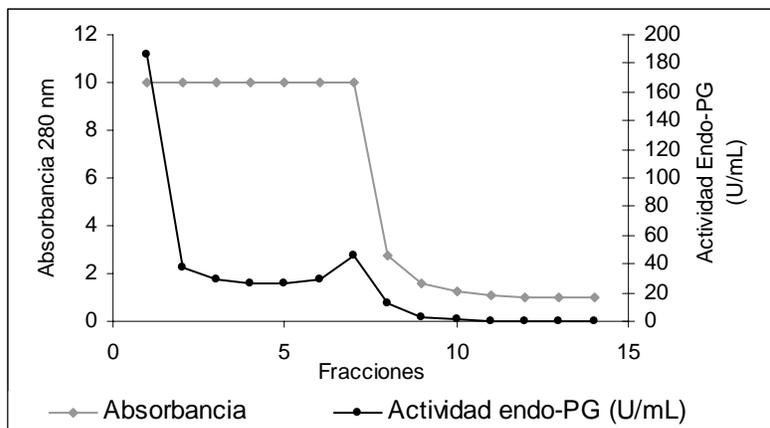
MUESTRA	ACTIVIDAD ENDO-PG (U/ML)
Filtrado enzimático (mezcla de matraces)	8.67
Filtrado enzimático diluido a pH 6	6.52

5.2. Purificación.

5.2.1 Primer paso. Captura con resina Streamline QXL

Se mezcló el volumen de los 5 matraces y se diluyó 1:1 con agua destilada se ajustó a pH 6 y se determinó la actividad enzimática de este filtrado (Tabla 3) Posteriormente, se le agregó la resina Streamline™ QXL se incubó a 8°C, 110 rpm por 24 h, pasado este tiempo se decantó el sobrenadante y se separó la resina Streamline™ QXL. La resina recuperada fue empacada en una columna y la proteína unida se eluyó de forma manual de la resina con 50 mL de una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 6, 1M NaCl, y se colectaron 14 fracciones de 3 mL cada una, a las cuales se les determinó proteína por lectura espectrofotométrica a 280 nm y la actividad endo-PG por el método de reducción de la viscosidad, para saber dónde se encontraba la enzima (Gráfica 1). De estas 14 fracciones la mayor actividad endo-PG se encontró dentro de las 10 primeras, con las cuales se realizó un SDS-PAGE para observar el perfil de proteínas y un

zimograma para observar la actividad pectinolítica. (Figura 8). En el gel SDS-PAGE se observan dos bandas una superior (flecha azul) y una inferior (flecha inferior), en las 10 fracciones. De acuerdo con el zimograma la banda inferior presenta actividad pectinolítica. En la fracción 1 se observa de mayor tamaño la zona de degradación, lo cual corresponde a lo encontrado en actividad endopectinolítica, donde la misma presentó la mayor actividad endo-PG (185.47 U/mL), por lo que fue seleccionada para continuar con el proceso de purificación.



Gáfica 1. Cromatograma de la elución de proteína de la resina Streamline™ QXL de Amersham Biosciences. Determinación de proteína a 280 nm y actividad endo-PG.

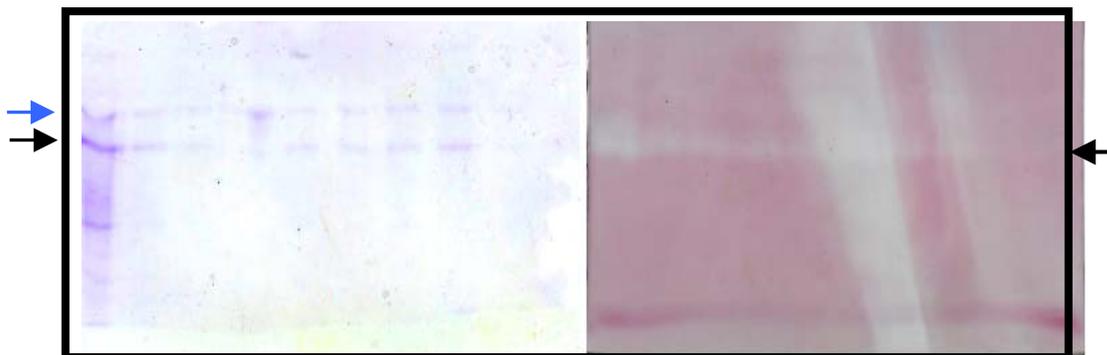
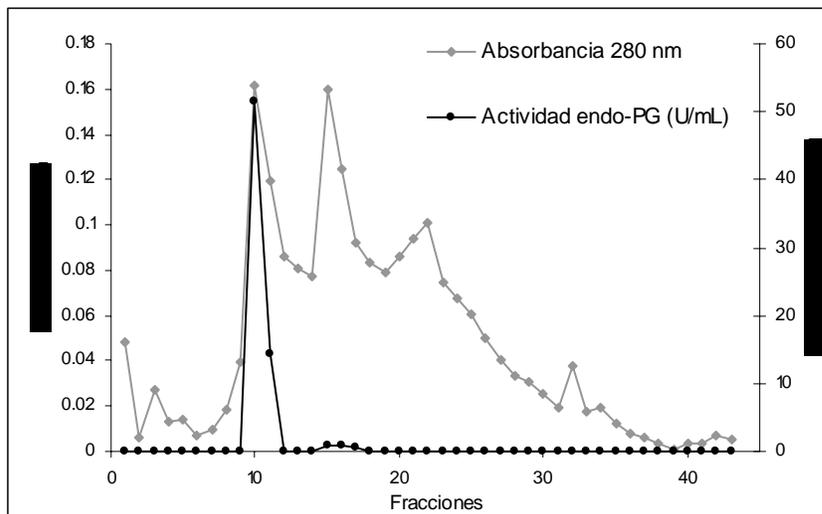


Figura 8. Izquierda SDS-PAGE. Derecha zimograma.

5.1.2 Segundo paso. Columna Econo-Pac High Q cartridge BIORAD

La fracción 1 fue dializada antes de realizar la cromatografía en FPLC de intercambio iónico con la columna Econo-Pac Q cartridge BIORAD, se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 6, 1 M NaCl, se realizó un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl, colectándose 43 fracciones de 2 mL cada una. Se determinó proteína por lectura espectrofotométrica a 280 nm y la actividad endo-PG para saber dónde se encontraba la enzima (Gráfica 2).



Gráfica 2. Cromatograma obtenido de la cromatografía en FPLC de la columna Econo-Pac Q cartridge BIORAD. Determinación de proteína a 280 nm y actividad endo-PG (U/mL)

Las fracciones 10 y 11 presentaron mayor actividad y corresponden al primer pico de proteína y las fracciones 15, 16 y 17 aunque no presentan actividad endo-PG corresponden al segundo pico de proteína. Con estas 5 fracciones se realizó un

SDS-PAGE para observar el perfil de proteínas y un zimograma para observar la actividad pectinolítica (Figura 9). Se observa en las fracciones 10 y 11 una sola banda de proteína (flecha negra), la cual corresponde con la zona de degradación del zimograma indicando actividad pectinolítica. En las fracciones 15, 16 y 17 se observa una sola banda, la cual es superior (flecha azul) a la que se encuentra en las fracciones 10 y 11. Esta proteína no presenta actividad pectinolítica, de acuerdo con el zimograma y con la actividad endo-PG antes medida.

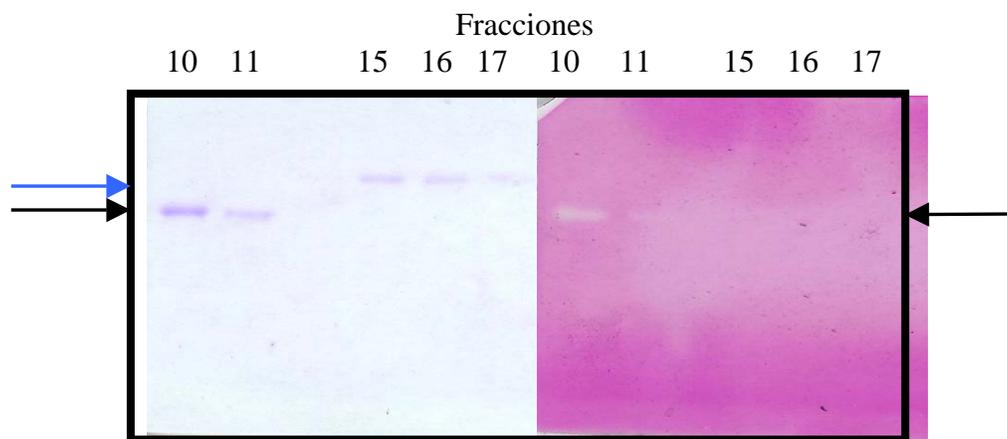


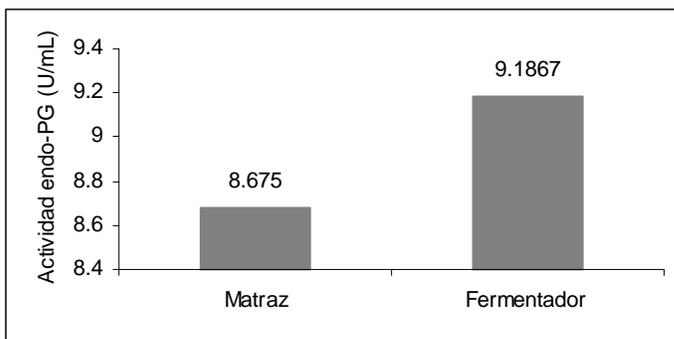
Figura 9. Izquierda SDS-PAGE. Derecha zimograma

De acuerdo con los resultados del zimograma y lo encontrado en el cromatograma, así como la presencia de una sola banda de proteína en el gel se confirma que la enzima endo-PG de *Aspergillus flavipes* FP-500 se encuentra pura.

5.2. Producción de endo-PG en fermentador.

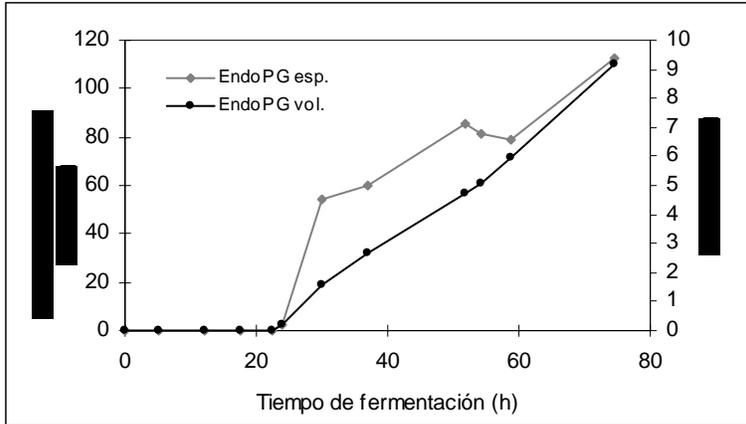
Con el objetivo de tener un mayor volumen de caldo de cultivo y a su vez obtener mayor cantidad de enzima, se realizó la producción en fermentador. Se comparó

la actividad endo-PG del caldo de cultivo obtenido del fermentador y del producido en matraz. Se obtiene 0.51 U/mL más de actividad endo-PG con el caldo de cultivo obtenido del fermentador, en comparación con el filtrado enzimático obtenido de la producción con matraz, lo que es un resultado muy favorable ya que en muchas ocasiones al llevar a cabo la fermentación en un biorreactor con un sistema de agitación y aireación totalmente distinto a lo que ocurre en matraces se obtienen resultados muy pobres con bajos rendimientos. Esta comparación se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 3. Comparación de la actividad endo-PG producida en matraz y en fermentador.

La fermentación se realizó en un biorreactor, se utilizó 2.1 L de MB con cáscara de limón al 1% como única fuente de carbono a pH 5. Este medio fue inoculado con 1×10^6 esporas/mL. La fermentación duró 72 horas. Se monitoreó la producción endo-PG a lo largo de la fermentación, por medio de la actividad endo-PG, como se muestra en la gráfica 4.

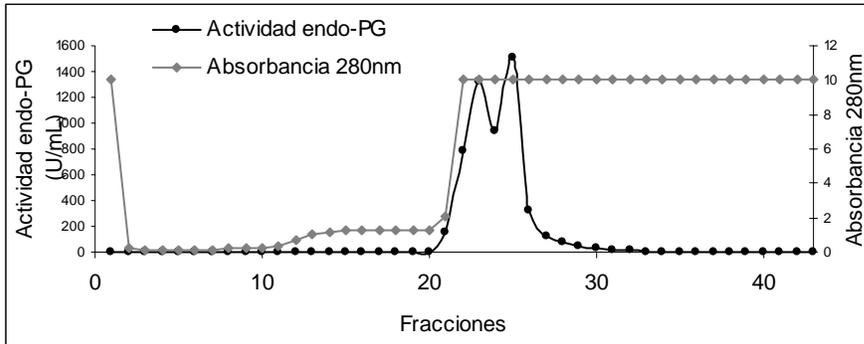


Gráfica 4. Monitoreo de la fermentación realizada en biorreactor.

5.2.1 Primer paso. Captura en resina Streamline QXL

Se obtuvieron 1340 mL de filtrado enzimático el cual se diluyó 1:1 con agua destilada, y se ajustó el pH a 6, se repartió en 7 matraces de 500 mL y a cada uno se le agregaron 3.8 mL de resina Streamline QXL, se colocaron en agitación a 150 rpm para asegurar el contacto de la resina con el filtrado, a 8°C durante 18 horas. Pasado ese tiempo se separó la resina del sobrenadante y se empacó en una columna de vidrio para realizar una corrida en el equipo de Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), Pharmacia Biotech. Para la corrida se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 6 con cloruro de sodio 1M, se realizó un gradiente de 0% de NaCl a 100% de NaCl, el cual comenzó en la fracción 3 y terminó en la fracción 33. Se colectaron en total 43 fracciones. Se determinó proteína por lectura espectrofotométrica a 280 nm y la actividad enzimática por el método de reducción de viscosidad. Se observa que en la fracción 21 empieza el incremento de proteína el cual continúa hasta la última fracción colectada, por este lado no se observa definido un pico de proteína, en

cambio con la actividad endo-PG se observa un pico que comienza en la fracción 21 y termina en la fracción 30 (Gráfica 5).



Gráfica 5. Cromatograma obtenido de la captura con resina Streamline QXL.

Determinación de

proteína a 280 nm y actividad endo-PG por el método de viscosidad.

Con las 10 fracciones que presentaron mayor actividad endo-PG se realizó un SDS-PAGE para observar el perfil de proteínas y un zimograma para observar la actividad pectinolítica (Figura 10). Se observa un perfil de proteína similar, en las fracciones 22, 23, 24, 25 y 26 se observa una banda más intensa (flecha negra) la misma que corresponde a la mayor zona de degradación en el zimograma, lo que indica actividad pectinolítica. De acuerdo con el zimograma, el cromatograma (Gráfica 5) y la banda ancha de proteína (flecha negra) en el gel se confirma que se trata de la enzima endo-PG. Con estos resultados se decidió mezclar de la fracción 21 a la 28, para continuar con el proceso de purificación.

FRACCIONES

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

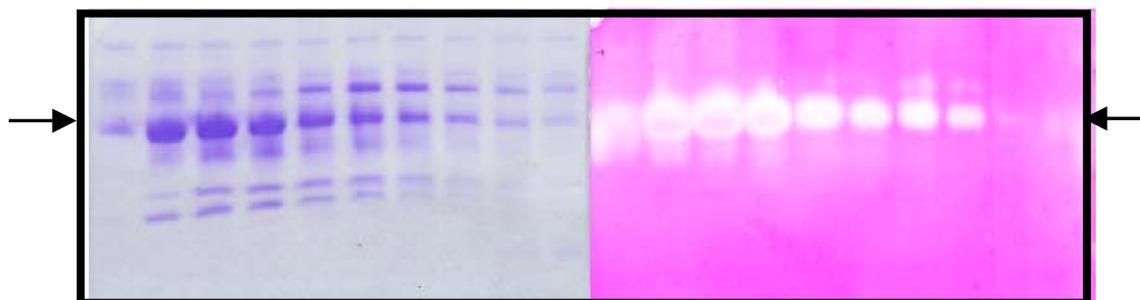
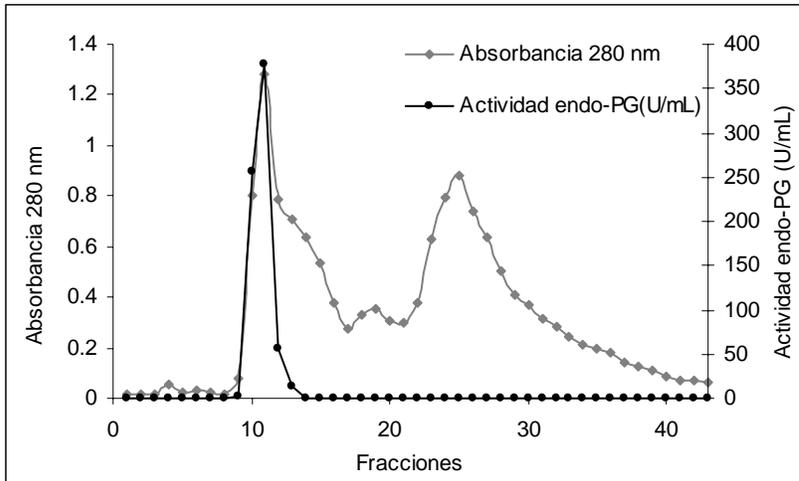


Figura 10. Izquierda SDS-PAGE. Derecha zimograma.

5.2.2. Segundo paso. Con los resultados anteriores se procedió al uso de la columna de intercambio iónico Econo-Pac High Q cartridge. BIORAD

Con la mezcla de fracciones (21-28) se obtuvo un volumen de 13.5 mL, de los cuales 4.5 mL se colocaron en una columna de intercambio iónico Econo-Pac High Q cartridge. BIORAD. Se realizó una corrida en el FPLC (primer FPLC) se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 6 con cloruro de sodio 1M, se realizó un gradiente de 0% de NaCl a 100% de NaCl, el cual comenzó en la fracción 3 y terminó en la fracción 33. Se determinó proteína por lectura espectrofotométrica a 280 nm y la actividad enzimática por el método de reducción de viscosidad a las fracciones obtenidas, los resultados muestran que en las fracciones 10-13 se obtiene la mayor actividad endo-PG y también corresponden al primer pico de absorbancia a 280nm (proteína) y , sin embargo se observa un segundo pico de proteína en las fracciones 23-27 las cuales no presentan actividad endo-PG (Gráfica 6), por lo que se trabajó con las fracciones 10-13 para realizar el SDS-PAGE y el zimograma.



Gráfica 6. Cromatograma. Determinación de proteína a 280 nm. Actividad endo-PG por el método de viscosidad.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos en el zimograma y el SDS-PAGE, donde se observa una banda intensa de proteína en las fracciones 10 y 11 (Flecha roja) la cual corresponde a la zona de degradación presente en el zimograma, y con las fracciones de mayor actividad endo-PG (Gráfica 6), con estos resultados se decide realizar una segunda corrida bajo las mismas condiciones que la primera con el objetivo de realizar un duplicado. Los resultados de la segunda corrida son similares como se observa en la figura 11. Se observa un patrón similar de proteína en las fracciones 10 -11 y en 9-10 de la primera y segunda corrida respectivamente.

Con este paso no se obtiene a la enzima pura, como se esperaba de acuerdo a lo observado en el filtrado enzimático producido en matraz, esto se debe por que se obtiene una mezcla más compleja de proteínas del filtrado enzimático producido

en fermentador, los resultados muestran 3 bandas de proteína, en las fracciones 10-11 y 9- 10 de la primera y segunda corrida FPLC respectivamente, las cuales que no están presentes en el caldo obtenido de matraz. Se decide mezclar estas fracciones para inyectar en la misma columna para completar el proceso de purificación.

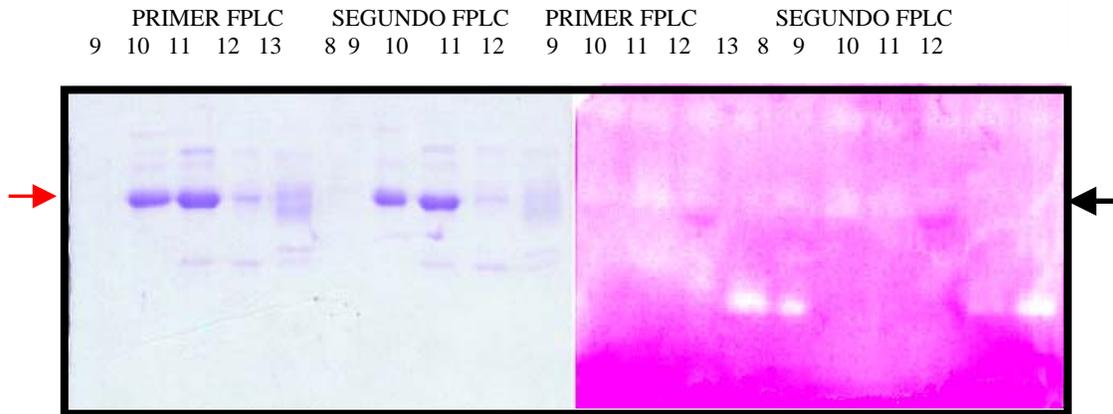


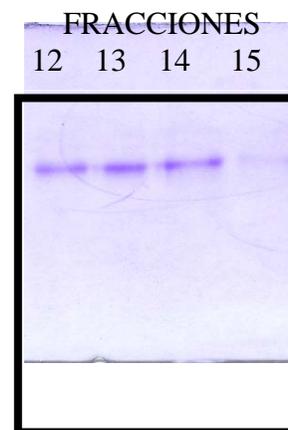
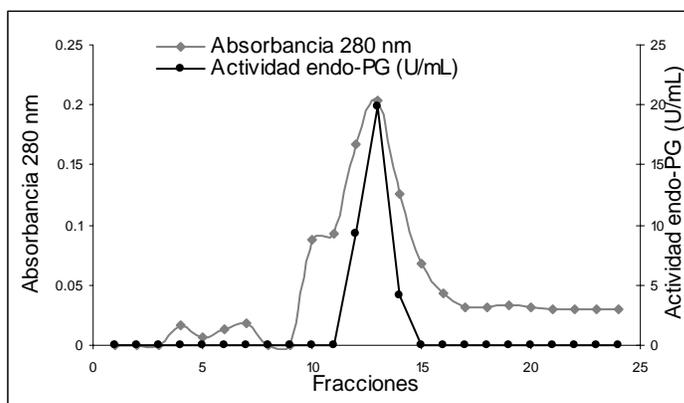
Figura 11. Izquierda SDS-PAGE. Derecha zimograma. Del primer y segundo FPLC

5.2.3 Tercer paso. Uso de la columna de intercambio iónico Econo-Pac High Q cartridge. BIORAD, después del uso de la resina Streamline QXL y un paso de purificación con Econo-Pac High Q.

Se mezclaron las fracciones 10-11 y 9-10 del primera y segunda corrida respectivamente (~3.5 mL), se inyectó en la columna Q, la mezcla previamente dializada en agua destilada, se eluyó con una solución amortiguadora de fosfatos pH 6/ 1M NaCl. A las fracciones obtenidas se les determinó proteína por lectura espectrofotométrica a 280 nm y la actividad enzimática por el método de reducción de viscosidad. Se realizó un SDS-PAGE con las fracciones 12, 13 y 14, las cuales forman el pico de proteína mismo que corresponde a la actividad endo-PG

(Gráfica 7). En el gel se observa una simple banda de aproximadamente 47.5 KDa presente en las fracciones 12, 13 y 14 (Figura 12). De acuerdo con los resultados encontrados en el cromatograma, así como la presencia de una sola banda de proteína en el gel, se confirma que la enzima endo-PG de *A. flavipes* FP-500 se encuentra pura.

Se decidió mezclar estas 3 fracciones, obteniéndose un volumen de 4.5 mL estos fueron utilizados para realizar la caracterización de la enzima endo-PG.



Gráfica 7. Cromatograma obtenido de la columna Q.

Figura 12. SDS-

PAGE

Determinación de proteína a 280 nm. Actividad endo-PG, por el método de viscosidad. proteína endo-PG pura.

método de viscosidad.

5.3. Resumen del proceso de purificación.

Con el filtrado libre de células procedente del fermentador Applikon Dependable Instrument, se realizó la purificación de la enzima endo-PG, en la figura 13 se muestra el filtrado original con aproximadamente 7 bandas visibles de proteína, en

la parte correspondiente al zimograma no se observa bien definida una zona de degradación.

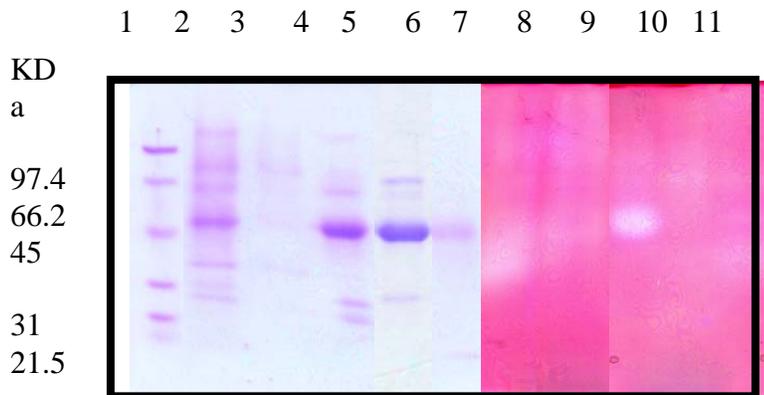


Figura 13. A Proteína1. Marcadores de peso molecular 2.Filtrado enzimático original 3.Sobrenadante de resina Q Captura resina Q Streamline QXL 4. Segundo paso columna Q 6.Tercer paso columna Q (enzima pura). B Zimograma. 7 Filtrado enzimático original 8. Sobrenadante 9.Primer paso captura resina Q 10. Segundo paso columna Q 11. Tercer paso columna Q

Esté filtrado se concentró y se capturó la proteína presente por medio de una resina Streamline QXL en dónde se obtuvieron 10 fracciones, cada una con 7 bandas visibles de proteínas de éstas, una banda es muy intensa, la cual presentó actividad pectinolítica (zimograma) y un elevada actividad endo-PG. De éstas 10 fracciones se mezclaron 8 (13.5 mL), se inyectaron 4.5 mL de dicha mezcla a una columna Econo-Pac High Q cartridge. BIORAD, dónde se obtuvieron 2 fracciones con 3 bandas de proteína, una de estas bandas presentó actividad pectinolítica. En este paso se realizó una segunda corrida para observar la reproducibilidad del método. Se obtuvieron 2 fracciones con un patrón de bandas de proteína similares a los obtenidos en la primera corrida. Estas 4 fracciones (~3.5 mL) se mezclaron y

se inyectaron nuevamente a la columna Econo-Pac High Q cartridge. BIORAD. Se obtuvieron 3 fracciones las cuales presentaron una sola banda de proteína de aproximadamente 47.5 KDa. Esa banda de proteína corresponde a la enzima endo-PG de *A. flavipes* FP-500. La cuantificación de proteína y de actividad enzimática en cada paso de purificación es presentado en la tabla 4; la actividad específica de la enzima endo-PG es 25 veces más alta en comparación con el filtrado enzimático.

Tabla4. Resumen de los pasos de purificación de endo-PG de *Aspergillus flavipes* FP-500

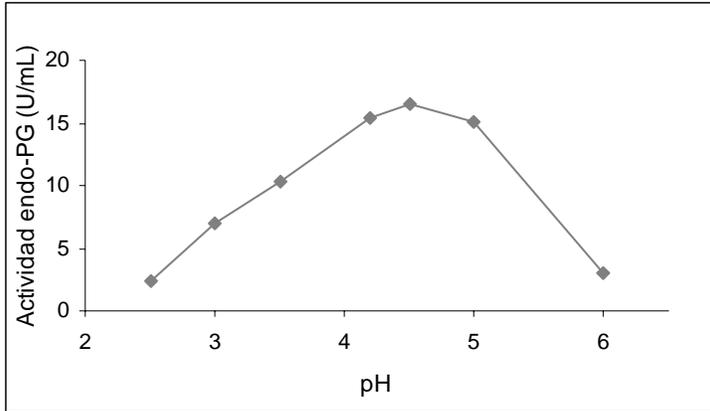
	Proteína (g/mL)	Volume n (mL)	Activi- dad (U/mL)	Proteín a total(g)	Activida d total (U)	Actividad especific a (U/ g prot)	Factor de purificaci ón
Filtrado enzimático original	81.8 +3.37	1340	9.18	109,61 2	12,301. 2	0.112	1.0
Primer paso. Captura con resina Q	241.35 +7.19	13.5	529.9 3	3,258.2 2	7,154.0 5	2.19	19.6
Segundo paso	51.87 +1.74	3.5	200.1 5	181.54	876.75	3.85	34.4

Columna Q							
Tercer paso. Columna Q	5.82 +0.22	4.5	15.45 2	26.19	69.53	2.65	23.7

5.4. Caracterización.

5.4.1. pH óptimo

Como parte de la caracterización, se determinó el pH óptimo de actividad para la enzima pura como se puede ver en la gráfica 8. Se evaluaron los siguientes valores de pH 2.5, 3.0, 3.5, 4.2, 4.5, 5.0 y 6.0. Se realizó por el método de reducción de la viscosidad a 30°C. Se obtuvo un máximo de actividad a pH 4.5, siendo este el pH óptimo el cual es muy parecido al reportado para endo-PG I, II y C de *A. niger* N 400 para las tres es de pH 4.2 y en las PGs de *S. sclerotiorum* y *C. lindemuthianum* es el mismo valor de pH (Tabla 5). Se observa una máxima actividad en el intervalo de pH 4.2- 5.0, algo similar ocurre con las PGs de *S. sclerotiorum* y *C. lindemuthianum* muestran un intervalo máximo de actividad a pH 4.2 - 5.4. La actividad de endo-PG De *A. flavipes* FP-500 se ve afectada a valores menores a 4.2, se observa que a pH 2.5 se perdió el 85.7% de actividad, y a pH 6.0 pasa algo muy parecido, se perdió el 82% de actividad. [27, 28]



Gráfica 8. Determinación de pH óptimo. Se evaluó la actividad endo-PG en el intervalo de pH de 2.5 a 6

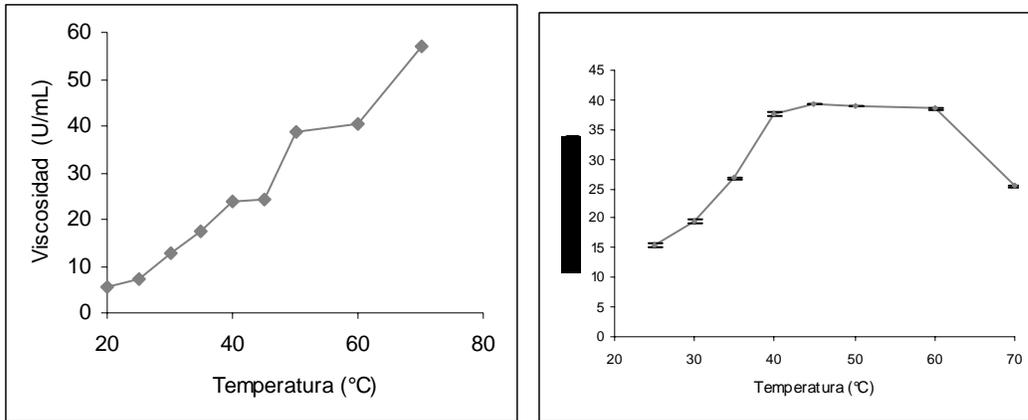
Tabla 5. Comparación de pH óptimo de endo-PG de otras especies de hongos.

ENDO-PG	pH ÓPTIMO
<i>Aspergillus flavipes</i> FP-500	4.5
<i>Aspergillus niger</i> N 400 Endo-PG I, II y C [27]	4.2
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> [28]	4.2
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> [28]	4.2

5.4.2 Efecto de la temperatura.

El incremento de la temperatura ejerce un efecto de reducción de viscosidad de cualquier sustancia, como lo es el agua, el aceite y en este caso una solución de pectina al 1%(p/v). Es por esto que el efecto de la temperatura sobre la actividad

enzimática endo-PG se evaluó por reducción de la viscosidad y por azúcares reductores (Gráfica 9 a y b). Se realizó a pH 4.2, aunque la máxima actividad se obtiene en un valor de pH 4.6; dentro del intervalo de pH de 4.2 – 5.0 la enzima muestra la máxima actividad. El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática no es muy claro cuando se realiza por reducción de la viscosidad, ya que aparentemente la actividad se incrementa a partir de los 50°C, esto se debe a que participan dos elementos, por un lado la viscosidad de la solución de pectina disminuye con el aumento de temperatura, y por el otro lado el aumento de la temperatura incrementa la velocidad catalítica de la enzima, por lo que no se sabe si el aumento de la actividad sea por efecto directo de la temperatura sobre la enzima o por la disminución de viscosidad de la solución de pectina debido a la temperatura, por ello también se evaluó el efecto de la temperatura por azúcares reductores, a partir de los 45°C y hasta los 60°C se observa la máxima actividad. A los 70°C se observa un decremento de la actividad endo-PG. La actividad endo-PG no se incrementa a partir de los 50°C como se observa con el ensayo de viscosidad (Gráfica 9a), este incremento es debido por la pérdida de viscosidad de la solución de pectina por efecto del incremento de temperatura. La temperatura a la cual se ve estimulada la actividad endo-PG es el intervalo de temperatura de 40° a 60°C.



Gráfica 9. Efecto de la temperatura. (a) Izquierda se realizó por el método de reducción de la viscosidad. (b) Derecha se realizó por el método de azúcares reductores.

5.4.3. Estabilidad a diferentes temperaturas.

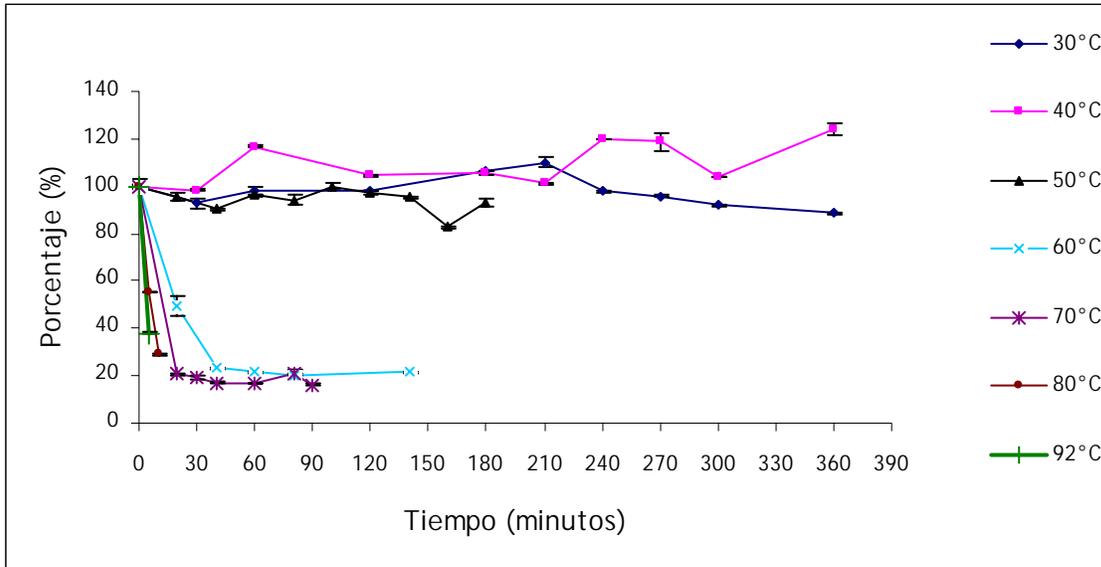
La estabilidad a diferentes temperaturas se evaluó a 7 valores distintos, dentro del rango de 30°C a 92°C (temperatura de ebullición del agua en el D.F.) (Gráfica 10).

A 30° 40° y 50°C, la actividad se mantiene por arriba del 80% llegando al 100%, lo que indica que la enzima es muy estable en este intervalo.

Mientras que a 60°C en 20 minutos hay una actividad residual de 49.5% llegando hasta 21.6% en 140 minutos, esto es muy similar a lo que ocurre a 70°C en 20 minutos hay una actividad residual de 20.6%, llegando a 16.2% en 90 minutos.

A 80°C en 5 minutos la actividad residual es de 55.3%, en comparación con 60°C que en 20 minutos la actividad residual es de 49.5%, en 92°C en 5 minutos la actividad residual es de 38.1%. Con los resultados obtenidos se puede decir que la enzima endo-PG es termoestable, en comparación con las endo-PGs de A.

niger, *S. sclerotiorum* y *C. lindemuthianum*, las cuales se inactivan completamente después de 20 min de incubación a 60°C [28].

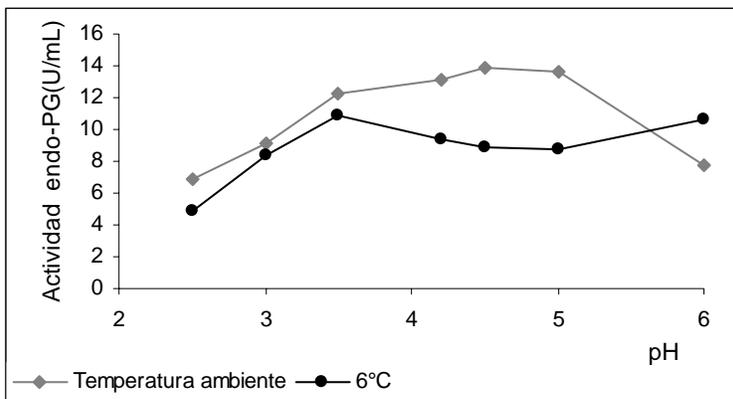


Gráfica 10. Estabilidad de la actividad endo-PG a diferentes valores de temperatura.

5.4.4. Estabilidad a pH

Se evaluó el efecto que ejerce el pH después de 24 horas sobre la actividad endo-PG; a temperatura ambiente (22°C) y a temperatura de refrigeración (6°C) (Gráfica 11). Los resultados muestran que la enzima endo-PG presenta mayor actividad después de 24 horas a temperatura ambiente con respecto a los resultados de temperatura de refrigeración. A temperatura ambiente presenta mayor actividad a pH 4.2, 4.5 y 5. Por debajo de pH 4.2 la actividad disminuye, pero esta es mayor

con respecto a la obtenida a temperatura de refrigeración. La enzima endo-PG muestra mayor estabilidad a valores de pH 4.2, 4.5 y 5 a temperatura ambiente.



Gráfica 11. Estabilidad de la actividad endo-PG a distintos valores de pH, a temperatura ambiente y a 6°C, después de 24 horas.

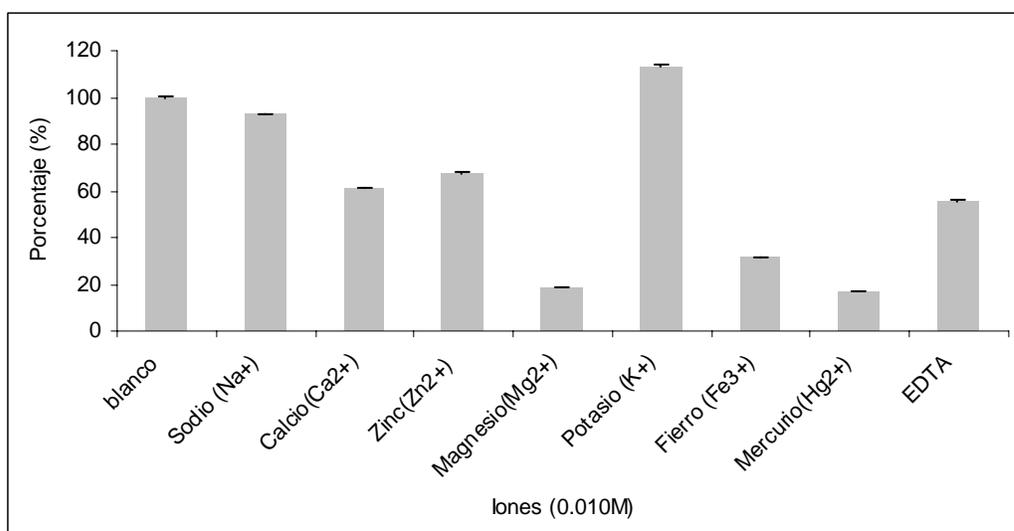
5.4.5. Efecto de distintos iones sobre la actividad endo-poligalacturonasa

Se evaluó el efecto que ejercen 7 iones diferentes; cloruro de sodio (Na^+), cloruro de potasio (K^+), cloruro de calcio (Ca^{2+}), sulfato de zinc (Zn^{2+}), sulfato de magnesio (Mg^{2+}), cloruro mercúrico (Hg^{2+}), y cloruro férrico (Fe^{3+}) y EDTA, sobre la actividad endo-PG; todos los iones se utilizaron en una concentración 10mM y se realizó por el método de azúcares reductores. (Gráfica 12). La actividad endo-PG fue estimulada por ión potasio (K^+) dando una actividad de 113.4%, con el ión sodio (Na^+) es de 92.6%, el cual no afecta ni favorece de modo severo a la actividad.

Mientras que los iones hierro (Fe^{3+}), magnesio (Mg^{2+}) y mercurio (Hg^{2+}), ejercen un fuerte efecto inhibitorio de la actividad, dando una actividad de 31.5%, 18.9% y 16.6% respectivamente. Algo similar se ha reportado para la endo-PG purificada

de *T. aurantiacus* CBMAI-756, el ión Mg^{2+} inhibe la actividad [2] (Tabla 6). Los iones calcio (Ca^{2+}) y zinc (Zn^{2+}), ejercen un efecto desfavorable sobre la actividad endo-PG dan una actividad de 60.9% y 67.6% respectivamente.

Los iones con número de oxidación +1, pueden ejercer un efecto favorable como el ión potasio (K^+), o no afectar de un modo severo a la actividad como el ión sodio (Na^+), mientras que los iones con número de oxidación +2 y +3 ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad endo-PG.

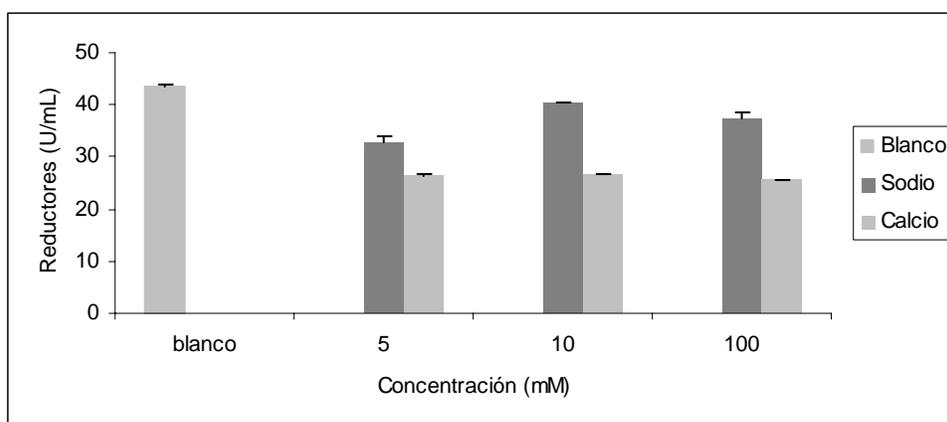


Gráfica 12. Efecto de distintos iones sobre la actividad endo-PG

Tabla 6. Comparación del efecto de iones sobre la actividad endo-PG, con endo-poligalacturonasas de otras especies de hongos.

ENDO-PG	CONCENTRACIÓN (mM)	IÓN	ACTIVIDAD (%)
<i>Aspergillus flavipes</i> FP-500	10	K^+	113.4
		Hg^{2+}	16.6

<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI-756 [2]	2	Ag ⁺	110
		Hg ²⁺	0
<i>Sporotrichum thermophile</i> [1]	1	Fe ³⁺	142.5
		Mg ²⁺	22.7
<i>Trichoderma harzianum</i> [29]	1	Ba ²⁺	96.3
		Co ²⁺	0



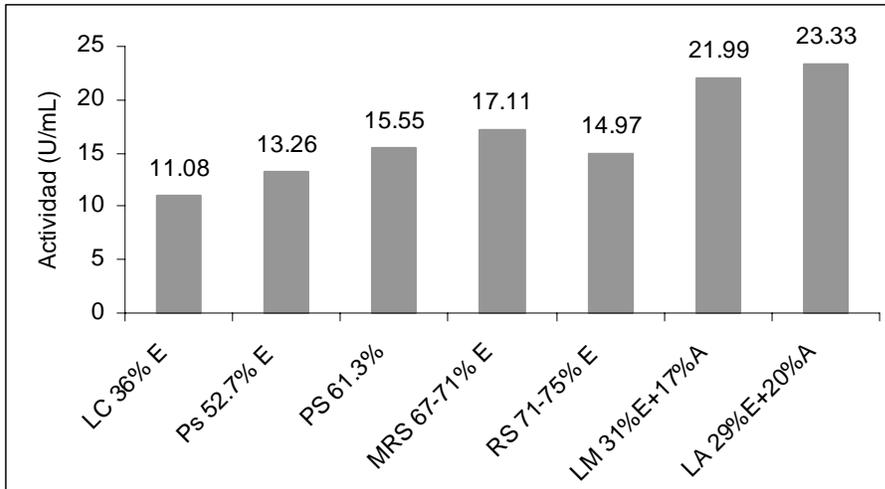
Gráfica 13. Efecto de NaCl y CaCl₂ a diferentes concentraciones sobre la actividad endo-PG

Se evaluó el efecto del ión calcio y el ión sodio a tres concentraciones distintas, 5, 10 y 100 mM, por ser los iones que comúnmente favorecen la actividad enzimática. (Gráfica 13). A 5, 10 y 100 mM, la actividad es de 60.2%, 60.9% y 58.3% respectivamente para el ión calcio, el cual ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad y este efecto no aumenta conforme se incrementa la concentración del

mismo, mientras que el ión sodio el efecto que ejerce sobre la actividad si cambia con la concentración a 5, 10 y 100 mM es de 75.6%, 92.6% y 85.6% respectivamente.

5.4.6 Afinidad a distintas pectinas.

Se evaluaron 7 pectinas con distinto grado de metilación, se realizó por el método de reducción de viscosidad. Como se puede observar en la gráfica 14, se obtiene una actividad de 11.08 U/mL con una pectina con 36% de esterificación y 14.97 U/mL con una pectina con un intervalo de 67-71% de esterificación. La enzima es más afín a pectinas de mayor grado de metilación, presentando la mayor actividad con la pectina de 67-71% de esterificación. La actividad disminuye ligeramente con una pectina de 71-75% de esterificación. Si la pectina se encuentra esterificada y además amidada, la actividad se incrementa, como es el caso de la pectina LA con 29% esterificación más 20% de amidación, la actividad obtenida es de 23.33 U/mL. La enzima endo-PG presenta mayor afinidad por el grupo amida.



Gráfica 14. Evaluación de la afinidad a pectinas de distinto grado de esterificación

5.3.7. Determinación de parámetros cinéticos.

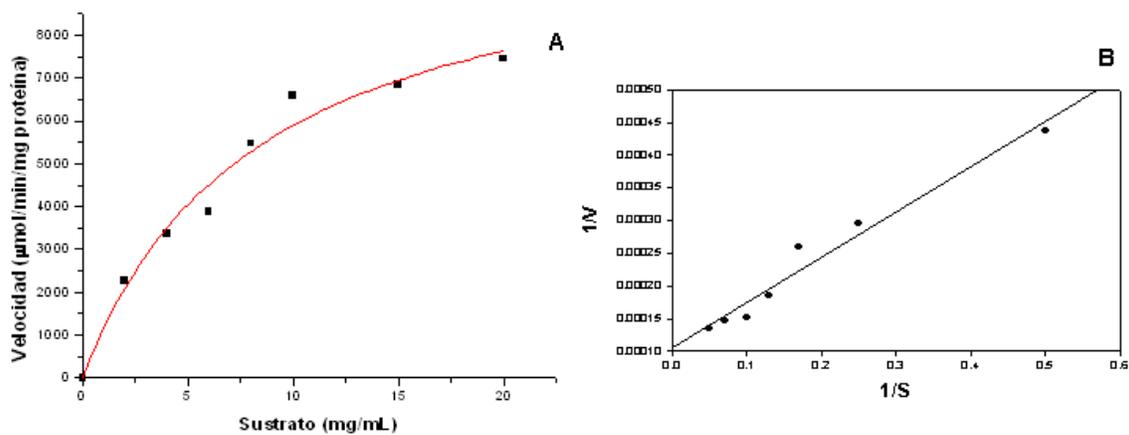
La determinación de los parámetros cinéticos, V_{max} y K_m , se realizó por actividad exo-pectinolítica medida por azúcares reductores, se utilizó una pectina con 61.2% de esterificación (SIGMA), en un rango de concentración de 2 mg/mL a 20 mg/mL. Se evaluó por la ecuación Michaelis-Menten (v_0 frente a $[S]_0$) la cual es una hipérbola (Gráfica 15A). En donde la V_{max} corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental, y K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} .

También se determinaron gráficamente los valores de K_m y V_{max} con la representación de doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), la cual es una línea recta. Esta representación doble recíproca recibe el nombre de representación de Lineweaver-Burk (Gráfica 15B). En la cual; la pendiente es K_m/V_{max} , la abscisa en el origen ($1/v_0 = 0$) es $-1/K_m$ y la ordenada en el origen ($1/[S]_0 = 0$) es $1/V_{max}$.

El valor obtenido para V_{max} por el método de Michaelis Menten es mayor en comparación con el obtenido por el método de Lineweaver-Burck, lo mismo sucede con el valor de K_m (Tabla 7), para fines comparativos con otras endo-PG, se emplearan las constantes cinéticas obtenidas por el método de Lineweaver-Burck.

Tabla 6. Comparación de valores obtenidos por el método de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burck

CONSTANTE CINÉTICA	LINEWEAVER-BURCK	MICHAELIS-MENTEN
V_{max} ($mgml^{-1}$)	9,560.22	10,605.26
K_m ($mol/min/mg$ prot)	6.63	8.26



Gráfica 15. Determinación de parámetros cinéticos. A hipérbola método de Michaelis-Menten. B método Lineweaver-Burk

La endo-PG purificada de *A. flavipes* FP-500 tiene un valor alto de V_{max} y K_m muy elevados en comparación con los valores reportados para las endo-PGs de *A. niger*, *T. aurantiacus* y *C. lindemuthianum* (Tabla 7). Así como también una alta masa molecular.

Tabla 7. Valores cinéticos de otras Endo-PG.

Características	<i>Aspergillus flavipes</i> FP-500	<i>Aspergillus niger</i> [25]	<i>Thermoascus aurantiacus</i> [2]	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> [24]
Masa molecular (kDa SDS-PAGE)	47.7	36	30	42
K_m (mgml ⁻¹)	6.63	1.35	0.62	0.19
V_{max} (mol/min/mg prot)	9,560.22	5,940	2,433.3	1,060
pI	----	3.6	7.8	9.4

5.3.8. Secuenciación de la enzima endo-PG de *Aspergillus flavipes* FP-500

La secuenciación se realizó primero por el método de degradación de Edman, por este método solo se logró obtener los primeros 5 aminoácidos. Los cuales son; alanina, treonina, serina, serina, treonina, de estos; al ser compararlos con los primeros 5 aminoácidos de la endo-PG E de *A. niger*, los cuales son alanina, treonina, glicina, glicina, treonina [3], se encontró que el primero, el segundo y el quinto aminoácido son iguales en ambas enzimas. Sin embargo, no se pudo obtener un mayor número de aminoácidos ya que aparentemente están bloqueados por lo que se optó por el uso de la espectrometría de masas.

Se realizó la identificación de la proteína mediante espectrometría de masas nano ESI LC-MS/MS. Se obtuvieron varios fragmentos que fueron comparados en bases de datos con otras poligalacturonasas. Se encontró que esta enzima tiene similitud con 3 poligalacturonasas. Estas son la poligalacturonasa de *Aspergillus fumigatus* Af293, la cual tiene un peso de 38.914 kDa, un precursor de poligalacturonasa de *Aspergillus terreus* NIH2624 y la endo-PG E de *A. niger* N400.

5.4.8. Discusión.

Se ha observado que *A. flavipes* FP-500 al crecer en cáscara de limón como única fuente de carbono, produce 3.5 veces más actividad endo-PG en comparación cuando se utiliza pectina como única fuente de carbono [30], esto se debe a la propia naturaleza de *A. flavipes* FP-500, cabe recordar que esta cepa fue aislada de una fruta en descomposición, y para poder contaminar a dicho fruto debe ser capaz de producir enzimas que le permitan romper la pared celular vegetal, la cual está conformada por celulosa, hemicelulosa, y pectina. Dependiendo de la

proporción de estos tres polisacáridos, la cepa requerirá producir mayor o menor nivel de determinada enzima. La capacidad de producción de los sistemas fermentativos por diferentes microorganismos, así como la evaluación de diferentes factores que lo afectan, se ha desarrollado a nivel de matraces agitados. Generalmente el traslado de las condiciones de operación a un biorreactor a partir de los datos obtenidos en matraz se hace un tanto en forma empírica. Ya que implica la elección de variables de operación como el volumen de trabajo, la velocidad de agitación, la velocidad de aireación, el posible control de pH, la tensión de oxígeno disuelto. Esto da como resultado que el ambiente que impera en el biorreactor sea totalmente diferente al ambiente de los matraces agitados, y por lo tanto en la fisiología del microorganismo, afectando así la productividad del sistema. Esto se puede observar en este trabajo, el proceso de purificación de un caldo de cultivo obtenido de matraz solo requiere dos pasos para obtener a la enzima endo-PG pura, mientras que con un caldo de cultivo obtenido de fermentador (biorreactor), el proceso de purificación de la misma enzima requirió un tercer paso. Debido a que no solo se obtiene más enzima endo-PG en fermentador, al cambiar las condiciones de matraz a fermentador, también producen otras enzimas que en un caldo de cultivo de matraz no se obtienen, al existir más proteínas en la mezcla inicial no es posible eliminarlas en dos pasos [31, 32, 33].

La purificación de poligalacturonasas producidas por diferentes especies de hongos, es ampliamente documentada; como es el caso de la poligalacturonasa de *T. aurantiacus* CBMAI-756, la cual es producida en matraces de 125 ml. Para comenzar el proceso purificación al filtrado enzimático original es dializado y

posteriormente concentrado por liofilización, y después se realizan 2 pasos, el primero hace uso de la filtración en gel, y el segundo paso hace uso de la cromatografía de intercambio catiónico [2]. Este protocolo de purificación es similar al de endo-PG de *A. flavipes* FP-500 producida en matraz, la purificación de esta enzima también consta de dos pasos, los cuales son de cromatografía de intercambio iónico, con la ventaja que no requiere ser concentrado en filtrado original.

La endo-PG de *A. flavipes* FP-500 tiene un pH óptimo de 4.5 el cual es muy cercano al de las endo-PG I, II y C de *A. niger* N400, el cual para las tres es de 4.2 [28]. Mientras que para la endo-PG E de *A. niger* N400 el pH óptimo es de 3.8 [3]. La endo-PG de *A. flavipes* FP-500 a pH de 3.5 presenta un 63.2% de actividad residual. [3,28]. Así como también presenta parámetros cinéticos elevados V_{\max} 9,560.22 K_m 6.63, y una masa molecular de 47.7 KDa, en comparación con la endo-PG de *A. niger* V_{\max} 5,940 K_m 1.35 y una masa molecular de 30 KDa [28].

VI. Conclusiones

Se obtuvo un protocolo de purificación para la endo-PG de *Aspergillus flavipes* FP-500, producida en matraz y en fermentador. Con el uso de la técnica de cromatografía de intercambio iónico, por medio de una resina y una columna de intercambio iónico.

Se determinaron las características bioquímicas de la endo-PG de *Aspergillus flavipes* FP-500; como son; el pH óptimo, la estabilidad a pH, el efecto de la temperatura, el efecto de diferentes iones sobre la actividad endo-PG y afinidad al sustrato, dónde los resultados obtenidos muestran similitud con otras endo-PG reportadas en *A. niger* y en otros géneros de hongos, como *S. sclerotiorum* y *C. lindemuthianum*. En cuanto a los parámetros cinéticos K_m V_{max} , los valores obtenidos resultaron más elevados en comparación con otras endo-PG reportadas.

VII. Bibliografía.

Kaur G., Sanjeev K., Satyanarayana T. 2004. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* apinis. *Bioresource Technology*. 94: 239-243.

Silva M. E., Silva D., Leite R.S. R., Gomes E. 2007. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 submerged fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91: 291-299.

Parenicová L. 2000. Pectinases of *Aspergillus niger*: A molecular and biochemical characterisation. Holanda. Wageningen Agricultural University. Tesis para obtener el grado de doctorado. 2-12, 48-51 pp.

Jayani R. S., Saxena S., Gupta R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 40: 2931-2944.

Saito K., Takakuwa N., Oda Y., 2004. Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. *Microbiological Research*. 159:83-86.

De Vries R. P. 1999. Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xilan and pectin degradation. Holanda. Wageningen Agricultural University. Tesis para obtener el grado de doctorado. 2-29 pp.

Woosley B. D., Hwan K. Y. 2006. Glycan analysis of recombinant *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase A. *Carbohydrate Research*. 341: 2370-2378.

Wade A.D., Boraston A. B. 2007. The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28 glycoside hydrolase. *Journal Molecular Biology*. 368: 1215-1222.

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR000743> Agosto 2007.

<http://www.expasy.ch/enzyme/> Agosto 2007.

O'Neill M. A., Darvill A. G., Albersheim P. 2001. Pectic substances. Encyclopedia of Life Sciences. 1-11.

Vidhyasekaran P. 1997. Fungal patogenesis in plants and crops. New York. Editorial Dekker. 106-111 pp.

De Vries R. P., Visser J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65:497-522.

Willats, W.G.T., McCartney L., Mackie W. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. Plant Molecular Biology. 47: 9-27

Harvey, L.M., McNeil, B. 1994. Liquid fermentation system and product recovery of *Aspergillus*. Smith J.E. Biotechnology Handbooks 7: *Aspergillus* Plenum Press. New York. pp 141-176

Serna S. 1996. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. México. AGT editor, S.A. 329 pp.

Trejo-Aguilar, B. A., Visser, J. and Aguilar, G. 1996. In pectins and pectinases. Elsevier Science, Amsterdam. 14:915-920

Peraza L., Ortiz M., Aguilar G. 2003. Growth and pectinase production by *Aspergillus* Mexican strain protoplast regenerated under acidic stress. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1: 15-27.

Galicia M. K. 2005. Aprovechamiento de residuos de manzana ricos en ramnoglacturonanos para la producción de enzimas pectinolíticas. México, D.F.

Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el grado de licenciatura. 37-62 pp.

Rivera del Río I. 2005. Producción de pectinasas y obtención de anticuerpos para la localización de enzimas en *Aspergillus sp.* FP-500. México, D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el grado de licenciatura. 44-68 pp.

Harris E. L. V. and S. Angal. 1995. Protein purification methods a practical approach. Ediciones IRL PRESS. Estados Unidos. 175,201-203 pp.

Bruce A., Dennis B., Julian L. 2002. Biología molecular de la célula. México. Tercera edición. Ediciones omega. 176-179 pp.

Miller L. 1959. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31:426-428.

Aguilar G., Trejo B., García J., Huitrón C. 1991. Influence of pH on endo- and exo-pectinase production of *Aspergillus sp.* CH-Y1043. Canadian Journal of Microbiology. 37:912-917.

<http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPep.html> Junio 2007.

<http://proteo.cnb.uam.es:8080/SAE-0.1/jsp/saeprostoio.jsp> Junio 2007.

Benen J. E., Kester H., Visser J. 1999. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. European Journal Biochemical. 259:577-585.

Keon J., Waksman G. 1990. Common amino acid domain among endopolygalacturonases of ascomycete fungi. Applied and Environmental Microbiology. 56: 2522-2528.

Mohamed S., Farid N., Hossiny E., Bassuiny R. 2006. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. Journal of Biotechnology 127: 54-56.

García C. R. 2007. Obtención de mutantes de *Aspergillus flavipes* FP-500 y evaluación de las alteraciones en la producción de enzimas pectinolíticas. México, D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el grado de licenciatura. 53-55 pp.

Buchs, J., Lotter, S. and Milbradt, C. 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors Biochemical Engineering Journal. 7:135-141

Buchs, J., Maier, U., Milbradt, C and Zoels, B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. Journal Biotechnology and Bioengineering. 68: 589-593.

Buchs, J., Lotter, S. and Milbradt, C and Zoels, B. 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. Biotechnology and Bioengineering. 68: 594-601.