

1 / 201

Universidad Nacional Autónoma de México

División de Estudios de Postgrado

Facultad de Química



PRODUCCION Y CARACTERIZACION INICIAL DE LAS SAPONASAS DE UN HONGO LEVADURIFORME

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA)

P r e s e n t a :

ALICIA CEA BONILLA

1 9 8 5



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.

Al Señor, mi Dios quien es
y da sentido a mi historia.

A mi amada familia
por su apoyo y cariño.

A mis profesores
por su consejo y saber

A todos mis amigos
por lo que hemos compartido

SUMARIO

	Página
INDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	1
INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
A. Panorama General de Esteroides	5
1. Estructura	5
2. Mecanismo de Acción de las Hormonas Esteroidales	11
3. Síntesis de las Hormonas Esteroides	13
B. Bioconversiones	16
1. Importancia	16
C. Diosgenina	
1. Importancia, Estructura y Fuentes	21
2. Obtención	24
D. β Glucosidasas	27
ANTECEDENTES EXPERIMENTALES	32
MATERIAL Y METODOS	
A. Medios de Cultivo	36
B. Soluciones	38
C. Sistemas de Solventes para correr las cromatografías.	40
D. Métodos	41
E. Reactivos	54
RESULTADOS Y DISCUSION	
A. Obtención Fermentativa de Diosgenina	56
B. Producción de las Saponasas del hongo <u>Aureobasidium</u> sp	74
C. Caracterización inicial de las saponasas del hongo <u>Aureobasidium</u> sp	

	Página
1. Actividades presentes	84
2. Estudios Cinéticos	87
3. Fraccionamiento de los Filtrados	92
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFIA	107

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA	1: Estructura del Ciclopentanoperhidrofenantreno	6
FIGURA	2. Estructura de la Diosgenina	10
FIGURA	3. Síntesis de Hormonas y Vitaminas Esteroidales	17
FIGURA	4. Vías de Obtención de Adrenocorticoides a partir de Diosgenina y Estigmasterol	20
FIGURA	5. Estructura de las Saponinas	25
FIGURA	6. Modelo de un posible Mecanismo de Acción de las β glucosidasas	29
FIGURA	7. Crecimiento de <u>Aureobasidium</u> sp en Diferentes Medios de Cultivo	57
FIGURA	8. Cromatografías de las Fracciones correspondientes a la purificación de Diosgenina en una Columna de gel de Sílice eluida con Hexano-Benceno.	59
FIGURA	9. Efecto del Tamaño de Partícula sobre la Producción de Diosgenina a dos Concentraciones	61
FIGURA	10. Efecto del pH inicial sobre la producción de Diosgenina	63
FIGURA	11. Efecto del Inóculo sobre la producción de Diosgenina a un pH inicial de 8.	65
FIGURA	12. Producción de Diosgenina en medios diferentes	67
FIGURA	13. Producción de Diosgenina en medios diferentes: BBC.	68

	Página
FIGURA 14. Efecto del Tween 80 y Urea sobre la producción de Diosgenina	70
FIGURA 15. Efecto de las condiciones de no esterilidad sobre la producción de Diosgenina.	71
FIGURA 16. Espectro de Absorción de Diosgenona	73
FIGURA 17. Actividad celulolítica sobre papel - filtro de los filtrados de <u>Aureobasidium</u> sp crecido en diferentes medios de cultivo	75
FIGURA 18. Actividad Saponinolítica de los filtrados de algunos medios fermentados con el hongo <u>Aureobasidium</u> sp	76
FIGURA 19. Efecto del Tamaño de partícula a dos concentraciones sobre la actividad - saponinolítica.	78
FIGURA 20. Efecto del inóculo sobre la aparición de saponasas en los filtrados de medios de Agua + Barbasco 2 %, pH inicial de 8	79
FIGURA 21. Actividad Saponinolítica de filtrados del hongo <u>Aureobasidium</u> sp crecido en tres medios diferentes	81
FIGURA 22. Actividad saponinolítica de una β glucosidasa comercial	82
FIGURA 23. Efecto del Tween 80 y de urea sobre la aparición de saponasas del hongo - <u>Aureobasidium</u> sp	83
FIGURA 24. Curva estándar de p-nitrofenolglucósido	85
FIGURA 25. Curva estándar de Diosgenina por cromatografía de gases	89

	Página
FIGURA 26. Curva de progreso de Saponasas	91
FIGURA 27. Efecto del pH sobre la actividad de Saponasas	93
FIGURA 28. Efecto de la Temperatura sobre la actividad de saponasas	94
FIGURA 29. Efecto de la Concentración de Sustrato sobre la actividad de saponasas	95
FIGURA 30. Volumen de Exclusión de una columna de Sephadex G-25	97
FIGURA 31. Fraccionamiento de Filtrados - de medio BBC en una columna de Sephadex G-25	99
FIGURA 32. Fraccionamiento del Filtrado - de medio BB en una columna de Sephadex G-25	100
FIGURA 33. Fraccionamiento de un filtrado del medio AB en una columna de Sephadex G-25	101

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA I, Actividad Saponinolítica de los - Filtrados de algunos hongos celu- lolíticos.	33 y 34
TABLA II. Producción de Diosgenina en medio de Agua + Tween 80 al 0.2 % + Ha- rina de Barbasco en tres tamaños- de partícula y dos concentraciones	62
TABLA III. Actividad de β glucosidasa de fil- trados de <u>Aureobasidium</u> sp crecido en tres medios diferentes	86
TABLA IV. Actividad de Saponasas de algunos filtrados del hongo <u>Aureobasidium</u> sp.	90

CAPITULO I
R E S U M E N

El barbasco es un producto natural renovable del que se extrae la principal materia prima para la síntesis química y/o microbiológica de hormonas esteroidales: la diosgenina.

México ocupó hasta 1974, el primer lugar en la producción de materias primas para la síntesis de esteroides a nivel mundial.(1). Sin embargo, en el mercado internacional se han buscado fuentes alternativas a la diosgenina para poder satisfacer la demanda de estos -- compuestos, desplazándola del mercado de materias primas para la síntesis de hormonas y derivados esteroidales. Por otro lado, la diosgenina que se obtiene en México es desaprovechada debido a que nuestra industria de esteroides no ha sido capaz de desarrollar la tecnología básica para lograr la autosuficiencia en la producción de esteroides farmacológicamente activos.

Con el fin de recuperar el lugar de la diosgenina, es necesario contar con procesos eficientes que mejoren su obtención y su utilización en la producción de compuestos de uso terapéutico.

La diosgenina se encuentra en el barbasco asociada

a azúcares (saponinas) y la ruptura del enlace glucosídico se lleva a cabo por un tratamiento químico con H_2SO_4 concentrado, a altas temperaturas durante 4 horas. Sin embargo, este tratamiento es muy drástico y trae consigo una serie de problemas en el reactor, en el medio ambiente, además por la aparición de otros productos, - los cuales deben ser evitados.

Como una alternativa a este proceso se ha estudiado el uso de microorganismos o parte de ellos (Enzimas) para la liberación de la diosgenina de las saponinas del barbasco, lo que disminuye lo drástico del tratamiento químico.

El análisis de la estructura que Marker, Kawasaki y Espejo (2,3,4,5,6) proponen de las saponinas del barbasco permite observar que el enlace entre el azúcar y el aglucón es β 1 \rightarrow 3 glucosídico. Por otro lado, hay antecedentes en el laboratorio de que algunos microorganismos celulolíticos producen β glucosidasa con una actividad sobre las saponinas del barbasco.

En vista de estos datos, nos abocamos a obtener la diosgenina del barbasco utilizando un hongo levaduriforme del género Aureobasidium. Este microorganismo fue aislado de bagacillo de caña en el laboratorio y se seleccionó por ser el que mostró actividad sobre un mayor nú

mero de las saponinas del barbasco.

Con el fin de aprovechar integralmente los productos de la fermentación (sólidos y filtrados), y conociendo la naturaleza insoluble del barbasco, se decidió explorar la existencia de enzimas involucradas en la hidrólisis de las saponinas en los filtrados de la fermentación del barbasco con el Aureobasidium sp, así como estudiar los parámetros que afectan su producción. Además, se decidió estudiar la cinética de la actividad de las saponasas e intentar una caracterización inicial de ellas, con el objeto de usarlas en la optimización del proceso de obtención de diosgenina.

Se encontró que la diosgenina se obtiene en un medio muy sencillo, consistente sólo de una fuente de carbono y un surfactante, en condiciones estériles, y su presencia se encuentra asociada a la aparición de las saponasas.

También se encontró que las condiciones óptimas de actividad de las saponasas son 24 horas de incubación, pH = 6, T = 45°C, con una Km global aparente de 2.94 mg para el extracto metanólico del barbasco (mezcla de todas las saponinas presentes en el barbasco). Finalmente, estudios preliminares sugieren que la actividad de las saponasas de este hongo está asociada a la de la β -

glucosidasa.

Todos los datos anteriores pueden ser utilizados para usar más racionalmente las saponasas en la obtención de nuestro producto de interés, la diosgenina, en una forma más pura y controlada, que mejore la calidad y costos de producción, además de permitir recuperar su lugar en la industria mundial de esteroides.

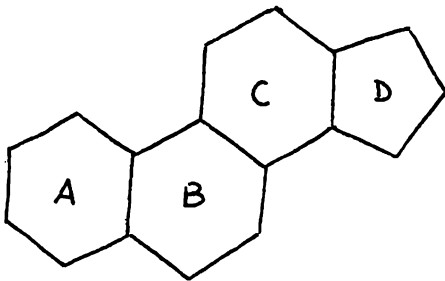
CAPITULO II
I N T R O D U C C I O N

A. PANORAMA GENERAL DE ESTEROIDES

1. Estructura

Los esteroides, compuestos con una estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 1), constituyen uno de los grupos más estudiados por su diversa actividad fisiológica. Esto se debe a que incluyen una gran variedad de compuestos de origen natural como los esteroles, los ácidos biliares, la vitamina D, las hormonas sexuales y adrenocorticales, los glucósidos cardiotónicos, las sapogeninas y algunos alcaloides (7).

Los esteroles son 3-monohidroxiesteroides que poseen de 27 a 29 átomos de carbono. Todos los esteroles de origen natural tienen un grupo 3 β hidroxilo y casi todos tienen uno o más dobles enlaces, siendo la posición de insaturación más corriente el carbono 5, aunque también puede darse en los carbonos 7 y 22. Este grupo de compuestos contiene algunos miembros importantes como el colesterol (del que hablaremos más adelante), el sitosterol y el estigmasterol (usados en la industria farmacéutica para la síntesis de hormonas esteroidales, aunque en baja proporción), el ergosterol (que-



**FIGURA 1: ESTRUCTURA DEL CICLOPENTANO
PERHIDROFENANTRENO.**

se convierte en vitamina D₂ por irradiación con luz ultravioleta o con luz solar) y el lanosterol entre otros.

Los ácidos biliares son esteroides de 24 átomos de carbono, de la serie 5β, con un grupo carboxilo en el C-24, que se une por un enlace peptídico a glicina o taurina. Se obtienen por la degradación del colesterol en el hígado y se secretan en el intestino delgado donde ayudan en la emulsificación y la absorción de los lípidos.

Se conoce como vitamina D o principio antirraquítico a un grupo de sustancias solubles en grasas que pueden dividirse en dos subgrupos: la vitamina D₂ o ergocalciferol y la vitamina D₃ o colecalciferol. Son compuestos de 27 o 28 átomos de carbono, con el anillo B del núcleo esteroidal abierto. Se obtienen por la irradiación con luz solar del ergosterol o del 7-dehidrocolesterol y su función es regular la absorción, transporte y fijación del Ca⁺² en los huesos.

Los andrógenos son compuestos de 19 átomos de carbono con sustituyentes oxigenados en C-3 y C-17. Los principales andrógenos de origen natural son la androsterona, la dehidroepiandrosterona y la testosterona, que es la más activa de las tres. Su función es originar el desarrollo de los órganos sexuales masculinos o caracte

rísticas sexuales secundarias, además de que la testos
terona regula indirectamente la espermatogénesis.

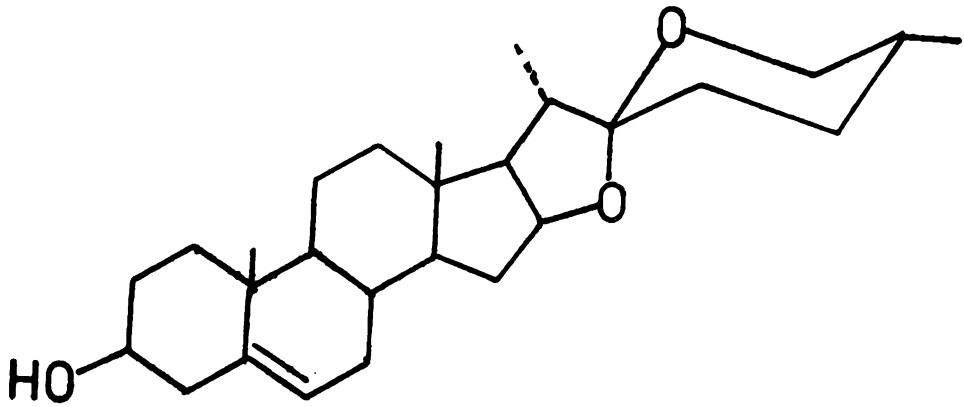
Los estrógenos son las hormonas sexuales femeninas que, junto con la progesterona, regulan el ciclo sexual de los mamíferos hembras. Fueron los primeros esteroides aislados y se caracterizan químicamente por tener el anillo A del núcleo esteroidal aromático y 18 átomos de car
bono. Los más importantes son la estrona, el estradiol y el estriol.

La corteza de las cápsulas suprarrenales produce - tres tipos de hormonas esteroidales involucradas en el metabolismo del agua y electrolitos (mineralocorticoides), en el de los carbohidratos y proteínas (gluco--corticoides) y con acción androgénica. En general, los corticoesteroides son compuestos de 21 átomos de carbono, con cadenas laterales muy oxidadas, un grupo Δ^4 3 - cetona y un grupo 20-21 cetólico o 17-20-21 dehidroacetónico, además de una función oxigenada en el C-11.

Los glucósidos cardiotónicos incluyen dos grupos: las cardenolidas y las bufadienolidas. Las cardenolidas son un grupo de esteroides de 23 átomos de carbono que se encuentran como glucósidos en una serie de plantas, - principalmente el digital, el lirio y el ranúnculo. Muchos de ellos muestran una poderosa actividad cardiotó-

nica (digitoxina). Presentan en su cadena lateral una lactona insaturada, un hidroxilo en 14β y otro en 3β -- por el que se une a azúcares como la glucosa, ramnosa u otros menos comunes como la desoxi y 2,6 didesoxihexosas, metiladas a menudo en el C-3. Las bufadienolidas son un grupo de esteroides de 21 carbonos con una cadena lateral de tipo lactona doblemente insaturada. Se encuentran en plantas de la familia de la escila en forma de glucósidos cardiotónicos y como parte de los compuestos de las glándulas venenosas de los sapos. Es notable que los aglucones (estructuras esteroides de los glucósidos) en el caso de los glucósidos cardiotónicos son muy lábiles, lo que dificulta su separación de los azúcares.

Las saponinas son esteroides de 27 carbonos con una cadena lateral de tipo espirocetal (Fig. 2), que se encuentran en las plantas en forma de glucósidos. Estos glucósidos (saponinas) disminuyen la tensión superficial del agua, forman espuma fácilmente y son capaces de provocar hemólisis. Las saponinas son solubles en etanol y en agua (parcialmente), pero no en éter; al ser hidrolizadas por ácidos o enzimáticamente dan lugar a las saponinas libres. Dentro de las saponinas más importantes se encuentran la diosgenina (que es una de



DIOSGENINA

FIGURA 2: ESTRUCTURA DE LA DIOSGENINA

las principales materias primas para la fabricación de hormonas), la hecogenina y la digitogenina.

Dentro de los alcaloides esteroidales más conocidos se encuentran los presentes en las plantas del género Solanum, como la solanidina y la tomatidina que son análogos nitrogenados de las sapogeninas y contienen 27 átomos de carbono.

2. Mecanismo de Acción de las Hormonas Esteroidales

(8, 9)

Desde hace algún tiempo se sabe que las hormonas - esteroidales, aunque altamente especializadas en su función, son capaces de afectar de alguna manera el metabolismo de las células blanco. Para poder ejercer su efecto, los esteroides penetran a la célula blanco y se unen en el citoplasma a un receptor específico, el cual en presencia de la hormona sufre un cambio conformacional y hace que el complejo hormona-receptor migre al núcleo donde interacciona con el DNA de una manera altamente específica e induce la transcripción de ciertos genes involucrados directamente con su acción en la célula -- blanco. De esta manera, el complejo hormona-receptor - actúa como un inductor que se une a un represor de ciertos genes o a una región específica en el cromosoma ad

cuado, que tiene funciones similares al operador de -- procariotes. Con respecto al mecanismo a nivel genético de la acción de estas hormonas, no hay nada definitivo.

A pesar de esto, se sabe que algunos esteroides tienen efecto en el metabolismo de las células blanco y este es el caso de los corticoesteroides.

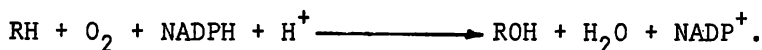
Los glucocorticoides parecen tener un efecto más directo en el metabolismo de muchas células animales. Estas hormonas, no sólo están involucradas en la adaptación al stress sino que son inductores de las enzimas gluconeogénicas como la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa la tirosinoaminotransferasa, la triptofanopirrolasa y otras enzimas que usan como precursores principales a -- los aminoácidos y en menor escala al glicerol y ácidos-grasos para sintetizar glucosa y glucógeno. También regulan la degradación de las proteínas y de los lípidos, así como disminuyen la síntesis de ново de DNA y RNA. Los miembros más importantes son el cortisol y su análogo sintético, la dexametasona, que aparte de tener ese efecto, se han utilizado como antiinflamatorios (reducen la reacción inflamatoria inicial, inhiben los mecanismos fagocitarios y defensivos así como la reacción inflamatoria tardía) en enfermedades reumáticas o alérgicas como la artritis reumatoide.

Los mineralocorticoides (aldosterona y desoxicorticosterona) tienen su efecto sobre la reabsorción del agua, del Na^+ , Cl^- y HCO_3^- en los túbulos renales y regulan de esta manera el metabolismo del agua, el equilibrio electrolítico e indirectamente la presión sanguínea.

3. Síntesis de las Hormonas Esteroides (9).

Las hormonas esteroides se sintetizan en las células animales a partir del colesterol. Este compuesto que forma parte de las membranas plasmáticas de muchas células animales donde regula la fluidez de la membrana, requiere ser degradado para convertirse en hormona esteroïdal activa. En esta conversión son de especial importancia las reacciones de hidroxilación llevadas a cabo por oxidasas de función mixta, que requieren de O_2 y -- NADPH. El oxígeno se "activa" por el citocromo P_{450} , que es el componente final de una cadena transportadora de electrones presente en las mitocondrias adrenales y en los microsomas del hígado. El NADPH dona sus electrones a una flavoproteína, quien a su vez los transfiere a una adrenoxina. Este compuesto reduce al citocromo P_{450} oxidado, dando lugar al "activador" del O_2 . En la reacción de hidroxilación, el O_2 dona uno de sus átomos pa-

ra formar el hidroxilo y el otro átomo se reduce, produciendo una molécula de agua. (10)



La primera etapa de la síntesis de las hormonas esteroides es la α -hidroxilación en el carbono 20 y después en el carbono 22, lo que prepara a la molécula para la acción de la desmolasa (una liasa), que elimina -- seis carbonos de la cadena lateral del colesterol y produce la pregnenolona. (9)

Esta conversión se ve estimulada por la hormona a-drenocorticotrópica (ACTH), un polipéptido de 39 aminoácidos sintetizado por la hipófisis anterior, que estimula principalmente la formación de glucocorticoides y presenta una influencia básica en la síntesis de todas las hormonas esteroides. Su efecto básico en la corteza suprarrenal está mediado por el AMP cíclico, que estimula la síntesis de la desmolasa y provoca la transformación del colesterol en pregnenolona, el precursor de todas las hormonas esteroides.

En los diferentes tejidos donde se sintetizan hormonas esteroidales, la pregnenolona sufre una serie de transformaciones que la lleva a los esteroides activos.

En la corteza suprarrenal puede convertirse en glucocorticoides o mineralocorticoides por dos vías conocidas como de los derivados Δ^4 y Δ^5 .

Para la síntesis de cortisol, que es la principal-hormona de la corteza, la Δ^5 -pregnenolona se hidroxila en la posición 17α y luego por la acción de la 3β -ol -- deshidrogenasa y de la $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerasa, se convierte en 17α -hidroxiprogesterona. Este compuesto sufre dos hidroxilaciones sucesivas en los carbonos 21 y 11 para dar como producto la hidrocortisona (Fig. 3).

En la misma figura es posible ver la vía de síntesis de los mineralocorticoides. Esta se inicia con la conversión de la Δ^5 -pregnenolona en progesterona, quien sufre tres hidroxilaciones subsecuentes en los carbonos 21, 11 y 18 (desoxicorticosterona, corticosterona y 18 -hidroxicorticosterona, respectivamente) y una deshidrogenación que da origen a la aldosterona (que es el mineralocorticoide más potente), la cual toma la forma acetal.

Los andrógenos pueden sintetizarse por dos vías diferentes: a partir de la 17α -hidroxipregnenolona (vía de los derivados Δ^5) o de la 17α -hidroxiprogesterona - (vía de los derivados Δ^4). Ambos precursores pierden dos átomos de carbono por acción de la 17 - 20 liasa y se

convierten en la dehidroepiandrosterona (DHEA) y en Δ^4 -androstendiona, respectivamente. Este último compuesto se reduce por un sistema de 17- δ oxidoreductasa y se convierte en testosterona. Existe otra vía de síntesis de testosterona a partir de DHEA. Este compuesto se reduce por la 17- δ oxidoreductasa a androstendiol, el cual se oxida por la 3β -ol-deshidrogenasa y se isomeriza por la $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerasa produciendo testosterona (Fig. 3).

Los estrógenos se sintetizan a partir de androstendiona y testosterona en el ovario, por la acción de la 19 hidroxilasa, por una deshidrogenación no catalizada-enzimáticamente y por una aromatasa, produciendo estrona y estradiol, respectivamente.

B. BIOCONVERSIONES.

1. Importancia.

Como se puede deducir de lo expresado anteriormente, los esteroides juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis y su deficiencia repercute seriamente en las funciones del organismo. Por este motivo es necesario, desde el punto de vista farmacológico, buscar formas de obtener estas hormonas para utilizarlas en el tratamiento de sus deficiencias. Además, algunas de ellas presentan otros efectos interesan

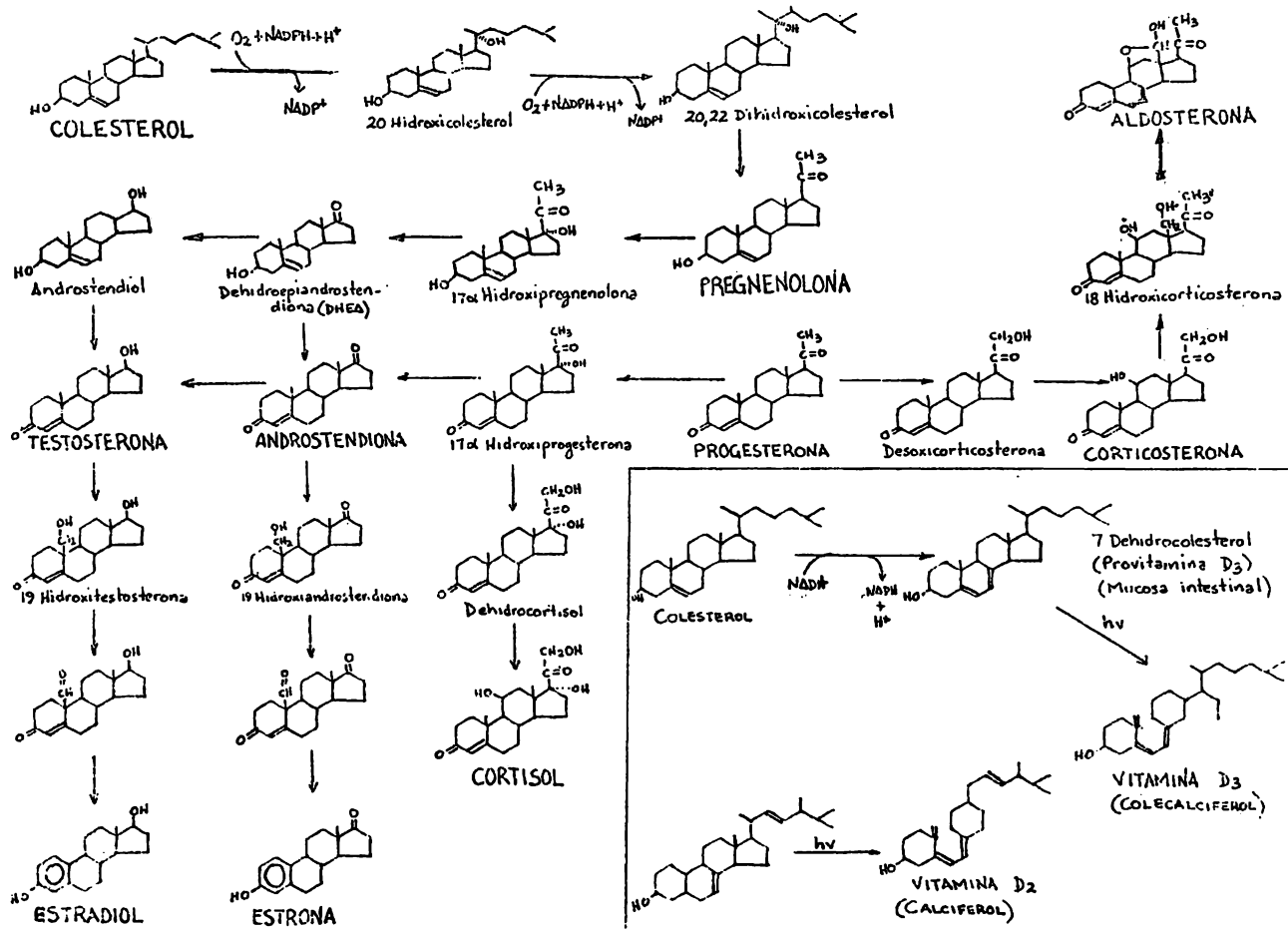


FIGURA 3. SINTESIS DE HORMONAS Y VITAMINAS ESTEROIDALES

tes desde el punto de vista terapéutico, como es el caso de la cortisona en el tratamiento de enfermedades reumáticas y alérgicas, como se mencionó en la sección anterior

Una de las formas de obtención en la industria farmacéutica es la síntesis total de las hormonas, en la que algunos pasos son muy críticos, pues los compuestos biológicamente activos son estereoespecíficos y en las reacciones de síntesis química se obtienen mezclas, que bajan los rendimientos de hormona activa, y aumentan -- sus costos.

Es por este motivo que se han buscado alternativas a este proceso, siendo una de las más interesantes la bioconversión de las moléculas esteroidales de las plantas,

Las bioconversiones o transformaciones biológicas (10) consisten en la conversión de un compuesto en otro estructuralmente relacionado por medio de las enzimas de una célula. Estos procesos presentan una serie de ventajas sobre las reacciones químicas, entre las que cabe destacar:

- a) Transcurren a temperatura ambiente y en condiciones suaves.
- b) Emplean agua como disolvente.
- c) Son altamente específicas.,

Entre las bioconversiones más exitosas se encuentra la síntesis de hormonas esteroidales.

Desde el principio de los años treinta, E.C. Kendall y T. Reichstein aislaron la cortisona y una década después, P.S. Hench y E.C. Vendal demostraron que la administración de cortisona aliviaba el dolor de pacientes con artritis reumatoide, lo que motivó su gran demanda. Se desarrollaron métodos químicos que requerían hasta 37 pasos y algunos de ellos en condiciones extremas; sobre todo era especialmente crítica la introducción del oxígeno en la posición 11, del que depende la actividad fisiológica de la cortisona.

Este problema pudo resolverse cuando en 1952, D.H. Peterson y H.C. Murray descubrieron que una cepa de Rhizopus arrhizus introducía un grupo hidroxilo en la posición 11 de la progesterona, quien es un intermediario temprano de la cortisona. El uso de microorganismos redujo los pasos de la síntesis de 37 a 11 y esto se tradujo en una disminución de los costos de producción.

Desde entonces se han desarrollado una serie de procesos que utilizan los microorganismos en la síntesis industrial de esteroides, entre los que incluyen la cortisona, la hidrocortisona, la prednisona, la dexametasona, la testosterona, el estradiol, el metabolito ac

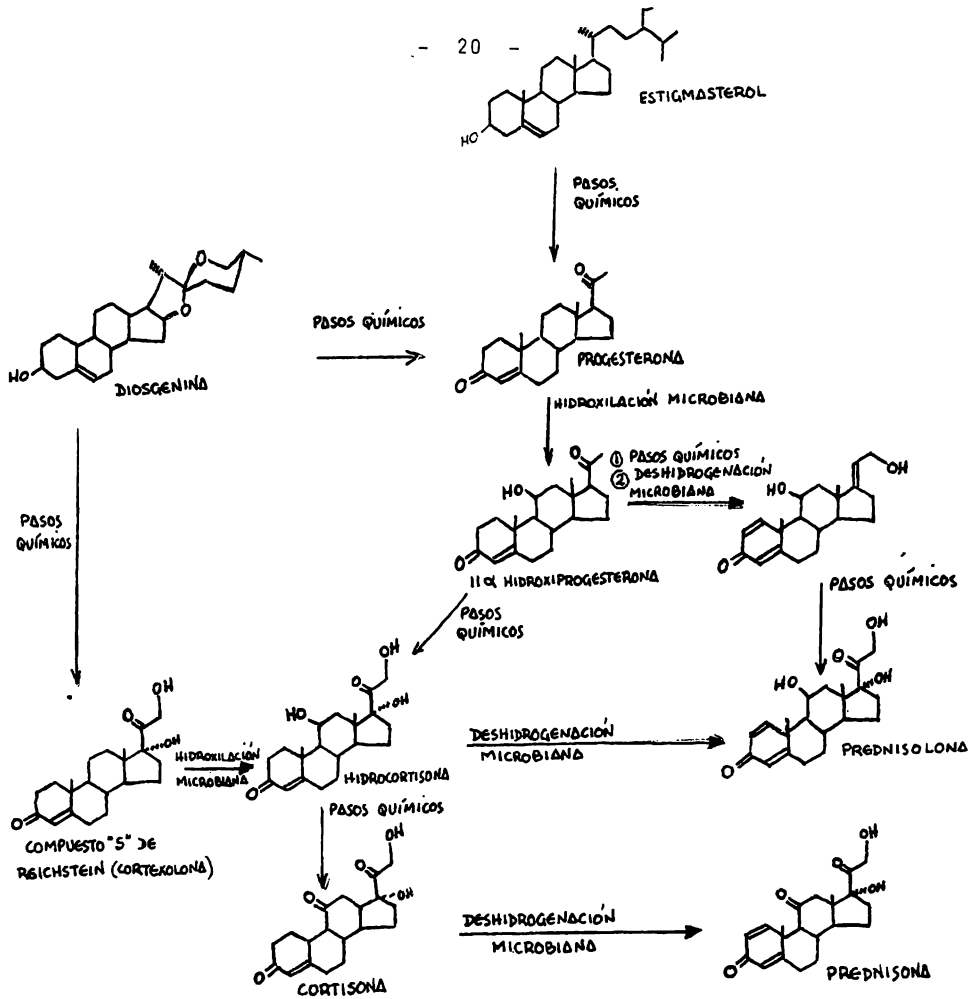


FIGURA 4: VIAS DE OBTENCIÓN DE ADRENOCORTICOIDES A PARTIR DE DIOSGENINA Y ESTIGMASTEROL.

tivo de la vitamina D₃ (1 α ,25 dihidroxicolecalciferol) y el antidiurético espironolactona.

Las materias primas de todos ellos son los esteroides, cuyas fuentes más comunes son los desechos de la producción de aceite de soya, que son ricos en estigmasterol y sitosterol, y las raíces del barbasco mexicano (Dioscorea composita) que contiene diosgenina.

El primer paso en la producción de esteroides a partir de esteroides vegetales es la degradación de la cadena lateral del esteroide, la cual es llevada a cabo por algunas micobacterias que usan los esteroides como fuente de carbono y energía (Fig. 4).

La identificación de nuevos usos de los esteroides (como anticonceptivos, en el tratamiento de insuficiencias hormonales, de enfermedades de la piel, en inflamación y alergias) han aumentado su demanda y el desarrollo de procesos biotecnológicos (en los que se usa la maquinaria bioquímica de los microorganismos) que puedan satisfacer dicha demanda (11).

C. DIOSGENINA.

1. Importancia, Estructura y Fuentes.

La diosgenina (20 α ,22 α ,25-D-espiros-5en-3 β ol) es un compuesto muy importante para la industria farma-

céutica debido a que es la materia prima predilecta para la síntesis química y/o microbiológica de hormonas y vitaminas esteroidales.

Químicamente pertenece al grupo de las sapogeninas, esteroides de 27 carbonos con una cadena lateral de tipo espiroetano. Este grupo no se encuentra en ninguna otra clase de productos naturales y consiste en un anillo de cinco miembros (E) y otro de seis (F), ambos heterocíclicos. Los compuestos que presentan el anillo F abierto se conocen como furostanos.

Fue aislada por primera vez en 1936, a partir de Dioscorea tokoro y R.E. Marker degradó su cadena lateral en 1940 para obtener progesterona y testosterona. Debido a su gran utilidad en la síntesis de compuestos farmacológicamente activos, se le ha buscado desde entonces en diferentes tipos de vegetales.

Se encuentra naturalmente en una gran variedad de plantas, entre las que pueden mencionarse magueyes (género Agave), izotes (género Yuca), samandoca (Samueke carnerosana) y otras pertenecientes a las familias Liliaceae, Dioscoreaceae y Amarilidaceae. Sin embargo, su principal fuente de obtención, desde hace más de 35 años, es el barbasco mexicano (Dioscorea composita Hemsl) ya que la diosgenina constituye del 3.5 al 5 %

del peso seco de la planta y su cultivo es fácil y económico.

El barbasco es una planta que pertenece a la familia de las dioscoreas, arbustos trepadores que parten de grandes raíces tuberosas (hasta de 20 cms. de diámetro). Estos rizomas desecados constituyen la parte que se usa para la extracción de las saponinas, ya que las demás partes de la planta (tallo, hojas, flores y semillas) las contienen en pequeñas cantidades (12). En general, se sabe que la planta está compuesta de resinas, almidón, celulosa, oxalato de calcio y saponinas.

La diosgenina no se encuentra libre en la planta - sino que está en forma de heterósidos, compuestos derivados de las formas cíclicas de los azúcares, en las que el hidrógeno del oxhidrilo hemiacetálico es reemplazado por un grupo arilo o alquilo, formando un nuevo enlace acetal. Estos compuestos reciben el nombre genérico de glucósidos y están formados por dos clases de moléculas diferentes: un azúcar o "radical heterosídico" y una -- fracción de diversa naturaleza llamada "aglucón", que -- va desde ácidos grasos hasta compuestos aromáticos (flavonas, xantonas, purinas, esteroides, etc.) (13).

Gracias a los estudios de Marker, Kawasaki y Espejo (2,3,4,5,6) se ha determinado la naturaleza y caracte

terísticas de las saponinas (glucósidos de la diosgenina) del barbasco y se ha determinado que la planta contiene una compleja mezcla de saponinas, de las que las más abundantes son las siguientes:

Dioscina: Diosgenina-(2,4-bis- α -L-ramnopiranosil)
 β -D-glucopiranosido.

Trillina: Diosgenina-3- β -D-glucopiranosido.

Prosapogenina A: Diosgenina-3-O-(α -L-ramnopiranosil 1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido.

Prosapogenina B: Diosgenina-3-O-(α -L-ramnopiranosil 1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido. (Fig. 5)

Además, también hay glucósidos de furostanol en los que los restos de glucosa se unen en los carbonos 3 y 26 del núcleo esteroidal (13).

2. Obtención

Como se mencionó anteriormente, la diosgenina se encuentra en las plantas asociada químicamente a un azúcar por un enlace β -glucosídico, el cual debe hidrolizarse para obtener el núcleo esteroidal libre (aglucón) que constituye la materia prima de la síntesis de compuestos biológicamente activos. \

Tradicionalmente la ruptura del enlace glucosídico se lleva a cabo por medio de una hidrólisis ácida (14) empleando ácidos minerales (ácido sulfúrico concentra-

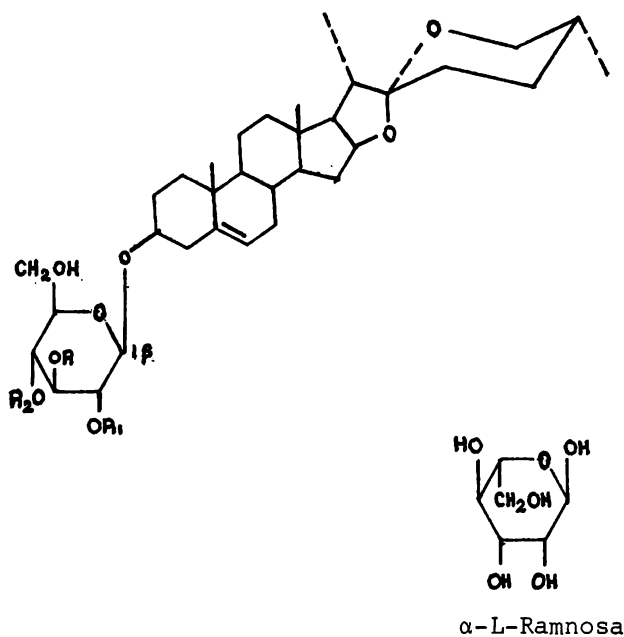


FIGURA 5: ESTRUCTURA DE LAS SAPONINAS.

PROSAPOGENINA A: $R_1 = \alpha$ -L-Ramnosa $R_2 = H$

PROSAPOGENINA B: $R_1 = H$ $R_2 = \alpha$ -L-Ramnosa

DIOSCINA: $R_1 = R_2 = \alpha$ -L-Ramnosa

TRILLINA: $R_1 = R_2 = H$

do) y altas temperaturas (400°C), que constituyen unas condiciones muy drásticas de reacción. Hay además, otros inconvenientes como son: la aparición de productos indeseables, desgaste excesivo de los reactores, contaminación ambiental, necesidad de neutralizar el exceso de ácido, necesidad de enfriar, etc.

Una alternativa a este proceso es el uso de microorganismos o sus enzimas para llevar a cabo la hidrólisis en condiciones más suaves.

Ya en 1954, Krider y colaboradores (15) reportaron que era posible la hidrólisis de los glucósidos de 5 α ,22a espirostanos usando extractos acuosos de las plantas que los contenían. El mismo año, el mismo grupo de trabajo reportó que había hidrólisis de las saponinas extraídas de Agave cerulata cuando se ponían a incubarse 96 horas a 25°C con un cultivo activo de algunas cepas de Aspergillus y Penicillium, y mencionan que las enzimas que presentaban actividad saponinolítica son inducibles e insensibles a represión por azúcares (16). En 1955, Rothrock y colaboradores (17) probaron que algunos hongos de los géneros Aspergillus, Penicillium y Fusarium liberaban entre el 90 y el 100 % de la diosgenina esperada por la hidrólisis ácida de Dioscorea ---- barbasco amarilla.

Posteriormente han aparecido reportes aislados del uso de bacterias, hongos y plantas (18,19,20,21,22) - para la obtención de saponinas, cardiotónicos y otros aglucones esteroidales; sin embargo, la investigación - para la obtención de diosgenina no se ha continuado y a nivel industrial, se sigue empleando la hidrólisis ácida del barbasco y/o de las saponinas.

D. β -GLUCOSIDASAS.

Si se observa la estructura de las saponinas y de los glucósidos esteroidales en general, es de notar que el enlace que une al azúcar con el aglucon es un enlace de tipo β -glucosídico y puede inferirse que puede ser - hidrolizado por β glucosidasas.

Este tipo de enzimas pertenecen al grupo de las hidrolasas (23), con una gran especificidad en cuanto - al enlace que hidrolizan y al tipo de sustituyentes cer- canos a dicho enlace, pero con poca especificidad en -- cuanto a que no importa la fuente de la que provengan, - sus características de hidrólisis son las mismas y pueden actuar en forma cruzada.

Un posible mecanismo de acción de estas enzimas in- volucra la participación de dos áreas en la superficie - de la enzima que interactúan con el sustrato: una con -

el azúcar y otra con el aglucón. El primer paso de la - reacción consiste en la adsorción del sustrato (la que tiene lugar por medio de puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals y enlaces covalentes débiles) a las dos regiones del sitio activo de la enzima. Una vez adsorbido el sustrato, se adiciona una molécula de agua o un ión hidronio al enlace glucosídico, el cual se rompe, formando un complejo enzima azúcar y aglucón. Este complejo a su vez, se disocia y libera los productos (Fig. 6). Hay dos factores importantes en la hidrólisis de los β glucósidos que son:

i) la fuerza del enlace glucosídico a hidrolizar.

ii) la fuerza y la posición de los enlaces entre el sustrato y la enzima.

Existen diferentes fuentes de β glucosidasas, que van desde algunos frutos como la almendra hasta bacterias.

Cuando se usan sustratos celulósicos, como es el caso de las plantas de las que se obtienen algunos glucósidos esteroïdales, el uso de hongos y bacterias celulóliticos se vuelve especialmente interesante, pues estos microorganismos, al inducir su actividad de celulasas (complejo de diferentes enzimas como endoglucanasas y exoglucanasas) inducen la producción de β gluco-

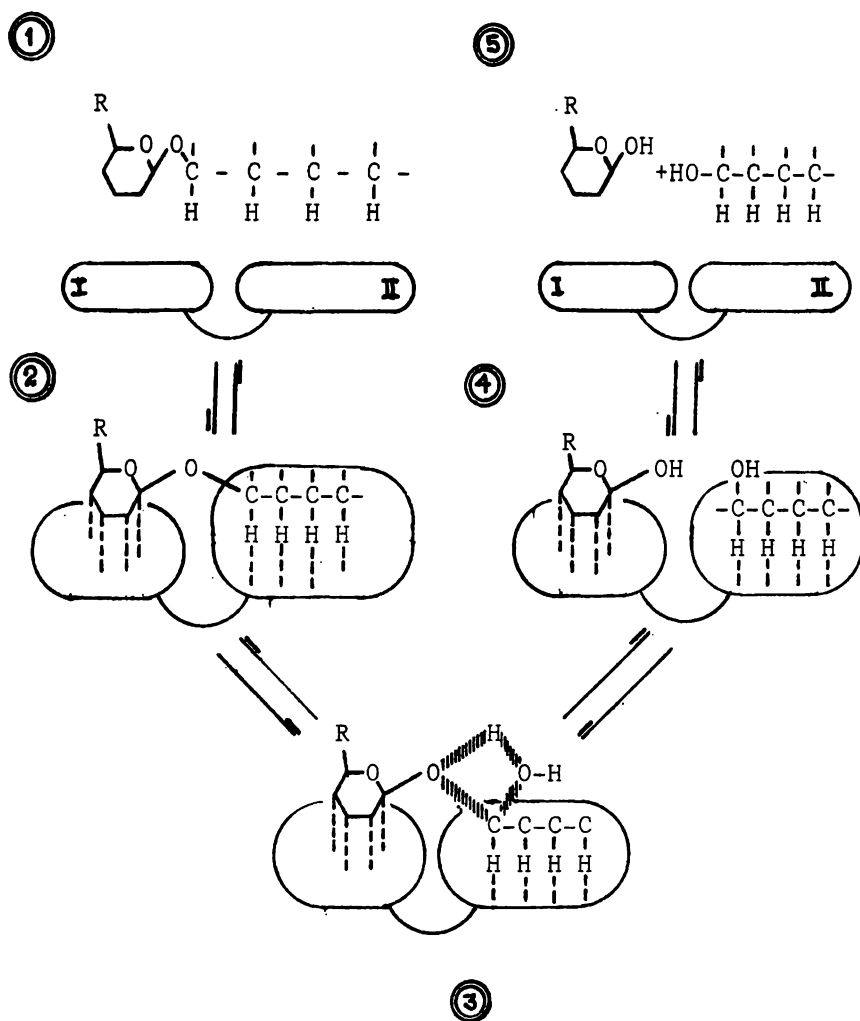


FIGURA 6: MODELO DE UN POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE LAS β GLUCOSIDASAS.

sidasa con el fin de hidrolizar la celobiosa y algunos-oligómeros pequeños de glucosa y, como vimos previamente, esta glucosidasa puede hidrolizar a los glucósidos-esteroidales, liberando los aglucones que son de interés farmacológico.

Existen algunos reportes del uso de emulsinas (extractos crudos de algunos hongos y plantas con actividad de glucosidasas) y de β glucosidasas para la obtención de aglucones esteroidales. En 1975, Hermann y Repke (19) reportaron la ruptura selectiva de glucósidos de cardiotónicos usando la beta glucosidasa A_3 de ----- Aspergillus wentii y en 1977 Rumyantseva (20) reportó que la β glucosidasa de Aspergillus niger juega un papel importante en la hidrólisis de glucósidos esteroides. Además, hay un reporte de Mellor y Layne, en 1974, sobre la purificación de una β -D-glucosidasa esteroideal de hígado de conejo (24) que actúa específicamente sobre - los 3- β -D-glucósidos de estrona, 17 α estradiol y 17 β estradiol.

Sin embargo, no existen más reportes sobre el uso de enzimas en la liberación de estos compuestos esteroidales y no hay un estudio formal y completo sobre el empleo de β glucosidasas para la obtención de la diosgenina del barbasco.

Por todo lo anteriormente dicho nos pareció interesante plantearnos los siguientes objetivos:

i) Obtener la diosgenina por un método fermentativo usando como sustrato harina de barbasco y buscando un medio económico para hacerlo.

ii) Producir las enzimas que degraden las saponinas del barbasco mexicano

iii) Hacer un estudio de los parámetros cinéticos que afectan la actividad de las saponinas con el fin de poder utilizarlos posteriormente en la obtención más racional de la diosgenina, y le permitan a este compuesto recuperar su lugar en la industria mundial de esteroides.

CAPITULO III

A N T E C E D E N T E S E X P E R I M E N T A L E S

Como se mencionó en el capítulo anterior, los microorganismos que crecen en sustratos celulósicos (como el barbasco) inducen la producción de β glucosidasa como una de las actividades del complejo celulasa.

En experimentos anteriores realizados en el laboratorio, se probó la actividad hidrolítica sobre las saponinas del barbasco de un microorganismo celulolítico, - Trichoderma reesei, reportado por Mandels (25) como - productor de β glucosidasa extracelular cuando se crece en celulosa microcristalina como fuente de carbono y energía, así como de algunos hongos aislados de otros sustratos celulósicos como pulpa de henequén, bagacillo de caña y del mismo barbasco. Como puede observarse en la Tabla I, ninguno de los microorganismos fue capaz de hidrolizar todas las saponinas del barbasco pero los hongos Aureobasidium sp., TE-104, TE-201 y TE-204 hidrolizaron dos o más saponinas y sus actividades fueron complementarias. Una cosa interesante fue que estas actividades sólo se inducen en presencia de barbasco y/o su extracto metanólico que contiene a todas sus saponinas.

Basados en estos resultados se cuantificó la dios-

TABLA I: ACTIVIDAD SAPONINOLITICA DE LOS FILTRADOS DE
ALGUNOS HONGOS CELULOLITICOS.

MICROORGANISMO	FUENTE DE CARBONO	SAPONINAS HIDROLIZADAS					FUENTE DEL MICROORGANISMO
		A	B	C	D	E	
<u>T. reesei</u> QM 9414	CELULOSA	-	-	-	-	-	Colección M. Mandels
	CELULOSA + SAPONINAS.	-	-	-	+	+	
<u>Aureobasidium</u> sp.	CELULOSA	-	-	-	+	+	Bagacillo de Caña
	BARBASCO	-	+	-	+	+	
	CELULOSA + BARBASCO	+	+	-	+	+	
	CELULOSA + SAPONINAS	-	+	-	+	+	
TE-104	CELULOSA	+	-	-	-	-	Pulpa de He- nequén
	CELULOSA + SAPONINAS	+	-	+	+	-	
TE-105	CELULOSA	+	-	-	-	-	Pulpa de He- nequén.
	BARBASCO	-	-	-	+	+	
	CELULOSA + BARBASCO	-	-	-	-	+	
TE-201	CELULOSA	+	-	-	-	+	Rizoma Seco de Barbasco
	BARBASCO	+	+	-	-	-	
	CELULOSA + BARBASCO	+	+	+	-	-	
TE-202	CELULOSA	+	-	-	-	-	Rizoma Seco de Barbasco
	BARBASCO	-	-	-	-	+	
	CELULOSA + BARBASCO	+	-	-	-	+	

MICROORGANISMO	FUENTE DE CARBONO	SAPONINAS HIDROLIZADAS					FUENTE DEL MICROORGANISMO
		A	B	C	D	E	
TE- 203	CELULOSA	-	-	-	+	-	Rizoma Seco de Barbasco
	BARBASCO	+	-	-	+	-	
	CELULOSA + BARBASCO	+	-	-	+	-	
TE-204	CELULOSA	+	-	-	-	+	Rizoma Seco de Barbasco
	BARBASCO	+	+	-	-	+	
	CELULOSA + BARBASCO	+	+	-	-	+	
TE-205	CELULOSA	+	-	-	-	-	Rizoma Seco de Barbasco
	BARBASCO	+	-	-	+	-	
	CELULOSA + BARBASCO	+	-	-	+	-	

+ : Hidrólisis - : No hubo hidrólisis.

Saponinas: A: Trillina B: Prosapogenina A

C: Prosapogenina B D: Dioscina

E: Furostanol β Glucósido.

genina producida por la actividad saponinolítica de los microorganismos preseleccionados y se utilizó este parámetro para seleccionar al Aureobasidium sp, un hongo levaduriforme aislado de bagacillo de caña, para estudiar su producción de saponasas (enzimas que rompen el enlace β glucosídico de las saponinas del barbasco y liberan a la diosgenina) así como hacer una caracterización inicial de estas enzimas.

•

CAPITULO IV

M A T E R I A L Y M E T O D O S

A. MEDIOS DE CULTIVO

1. Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA),

2. Medio B:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.14 %
Mg SO_4	0.03 %
CaCl_2	0.03 %
Elementos Traza	0.10 %
Tween 80	0.20 %
$\text{KH}_2\text{PO}_4^{\text{a}}$	0.20 %
Urea ^b	0.03 %

Elementos Traza: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500 mg/100 ml H_2O
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	160 mg/100 ml H_2O
ZnCl_2	170 mg/100 ml H_2O
CoCl_2	200 mg/100 ml H_2O

Este medio se suplementó con la fuente de carbono-correspondiente a las siguientes concentraciones:

Diosgenina micronizada	0.5 %
Saponinas	0.5 %
Harina de Barbasco ^c	0,75 y 2 %
Cèlulosa microcristalina (`Avicel)	0,75 %

a, b Se esterilizan por separado y se adicionan posterior

mente al medio estéril:

c Para los primeros experimentos se molió finamente en un mortero. En los experimentos posteriores se usó harina de barbasco sin moler (Bsm), molida durante 20 segundos en la licuadora y sin tamizar (Bmm) y molida finamente en un mortero (Bmf).

El pH del medio se ajustó después de esterilizar con HCl 0.1 N o con NaOH 0.1 N estériles, según el pH final deseado.

3. Medio AB:

Barbasco (Bmm) al 2 % en agua con un pH después de esterilizar de 8.

4. Medio BB:

Medio B + Barbasco (Bmm) al 2 %, pH después de esterilizar de 8.

5. Medio BBC:

Medio B + Barbasco (Bmm) al 2 % + Celulosa microcristalina Avicel 0,75 %, pH después de esterilizar de 8.

6. Medio T:

Agua + Barbasco (Bmm) al 2 % + Tween 80 al 0,2 % pH después de esterilizar de 8.

7. Medio U:

Agua + Barbasco (Bmm) al 2 % + Urea al 0,03 %, pH después de esterilizar de 8.

pH después de esterilizar de 8.

8. Medio TU:

Agua + Barbasco (Bmm) al 2 % + Tween 80 al 0.2 %
+ Urea al 0,03 %, pH después de esterilizar de 8.

Para las fermentaciones estériles, los medios se -
esterilizaron durante 15 minutos en la autoclave a 21 -
libras/pg² y 115°C.

B. SOLUCIONES

1. D.N.S.

- NaOH	1,40 %
Ac, 3,5 dinitrosali- cílico (DNS)	0.80 %
Tartrato de Sodio y Potasio	21,60 %
Fenol	0,54 %
Metabisulfito de Sodio	0.59 %

2. Soluciones para determinación de proteínas por-
el método de Lowry.

a) NaOH	0.1 N
Na ₂ CO ₃	2.0 %
b) CuSO ₄ .5H ₂ O	1,0 %
c) Tartrato de Sodio y Potasio	2.0 %

Solución de Proteínas: 100 ml Soln a + 1 ml soln b
+ 1 ml soln c.

3. Solución amortiguadora de citratos 0.075 M, --
pH 4.8.
4. HCl 1 N.
5. NaOH 1 N.
6. p-Nitrofenolglucósido (PNFG) 6 mM en solución
amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.8.
7. Na₂CO₃ 0.1 M.
8. Solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.8.
9. Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.8.
10. Solución amortiguadora de fosfatos 0.075 M, ---
pH 6.8.
11. Solución amortiguadora de KCl-HCl 0.2 M, pH 1 y
2.
12. Solución amortiguadora de ácido cítrico 0.1 M--
Na₂HPO₄ 0.2 M, pH 3, 4, 5, 6 y 7.
13. Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.
14. Solución amortiguadora de Boratos 0.025 M-HCl -
0.1 M, pH 9.
15. Solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M-NaOH
0.1 M, pH 10.
16. Solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M-NaOH -
0.1 M, pH 11.
17. Solución amortiguadora para muestra de electro-
foresis (Magic mix).

SDS	1,000	%
Mercaptoetanol	1.000	%
EDTA	0.002	M
Glicerol	10.000	%
Azul de Bromofenol	0.002	%

Solución amortiguadora Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8.

18. Solución amortiguadora Tris 2 M, pH 6.8.

19. Solución amortiguadora Tris 2 M, pH 8.8.

20. Solución amortiguadora Tris-Glicina 0.02 M, --
pH 7.2.

21. Solución estándar de diosgenina 1 mg/ ml.

22 Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 % (P/V)

23. Stock de Acrilamida 100 ml.

Acrilamida 30.0 g

Bis-acrilamida 0.8 g

H₂O destilada c.b.p. 100 ml.

24. Solución amortiguadora NaOH-KCl 0.2 M, pH 12.

C. SISTEMAS DE SOLVENTES PARA CORRER LAS CROMATOGRAFIAS

1. Para diosgenina:

Cloroformo-Acetato de etilo 1:1

2. Para saponinas:

Cloroformo-Metanol-Agua 14:6:1

Las placas se revelan con la siguiente solución re-
veladora de vainillina: Vainillina al 10 % (p/v) en -

la siguiente mezcla: Etanol 20. % (v/v) + H₂SO₄ 80 % - (v/v) y posteriormente se someten a calor.

D. METODOS.

1. Obtención de diosgenina micronizada.

Se disuelve la diosgenina en 25 volúmenes de etanol o en 10 volúmenes de acetona y se vacía la solución sobre agua (cinco veces el volumen de solvente) con agitación a temperatura ambiente. Se filtra la suspensión sobre membrana millipore de 0.45 µm de diámetro de poro y el residuo es el producto que es ligeramente más soluble en agua y más fácilmente degradable por los microorganismos.

2. Fermentación.

Se siembran de 20 a 30 cajas de medio PDA con esporas del hongo Aureobasidium sp por asada y se incuban a 29°C durante 72 horas. Se deja esporular 24 horas a temperatura ambiente y se hace una suspensión concentrada de esporas, de tal manera que el inóculo tenga una densidad óptica (D.O.) de 5 a 7. Se incuban a 29°C con una agitación de 200 rpm y se toman muestras, sacrificando un matraz por tiempo. Las muestras se centrifugan 30 minutos a 7000 rpm y se procesan como sigue:

a) El paquete celular de 5 ml de muestra original se resuspende en 2 ml de ácido tricloroacético (T.C.A.)

al 10. % y se homogeniza 5 minutos. Se centrifuga 10 minutos a 5000 rpm, se descarta el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en NaOH 1 N (en una proporción de 0.4 ml de NaOH + 0.6 ml de agua). Se determina la proteína por el método de Lowry.

b) El resto del paquete celular y sólidos se extrajo de tres maneras:

i) Con metanol-cloroformo para extraer las saponinas y la diosgenina.

ii) Con metanol durante 4 horas con reflujo para extraer todas las saponinas.

iii) Con hexano, durante 36 horas para extraer la diosgenina.

Al cabo de la extracción, se evapora el solvente y se determina el peso seco del producto. Se disuelve en una mezcla de cloroformo-metanol 5:1 o solo en cloroformo y se corren las cromatografías en placa fina para-determinación de diosgenina y saponinas o la cromatografía de gases para diosgenina.

c) El sobrenadante del medio original se trata de-dos maneras principales:

i) Se extrae con acetato de etilo, se evapora, se disuelve en cloroformo y se corre la cromatografía para-diosgenina.

ii) Se liofiliza en fracciones de 75 ml para la determinación de actividad saponinolítica.

También se toma una muestra para determinación de actividad de celulasas sobre papel filtro o para determinación de β glucosidasa sobre PNFG.

3. Extracción de Sólidos.

Los sólidos obtenidos de la fermentación se ponen en una charola de aluminio que se coloca sobre una superficie caliente (50 a 60°C), para secarlos a peso constante y una vez secos, se muelen en un mortero y se colocan en un cartucho de soxhlet (aproximadamente 15 a 20 g en cada cartucho) para su extracción. Esta se lleva a cabo usando 200 ml de n-hexano como solvente y se calienta con una mantilla eléctrica controlada por un reóstato durante 12 horas. La operación se repite tres veces. Al fin de la extracción, se evapora el solvente en un rotavapor y se obtiene el residuo aceitoso amarillento con unos sólidos cristalinos de color blanco, -- que serán sometidos posteriormente a una purificación en columna. Se les corre una cromatografía en placa fina para determinar la presencia de diosgenina y otros compuestos.

4. Extracción de los sobrenadantes.

Los sobrenadantes se extraen con volúmenes de 500-

ml de acetato de etilo en un embudo de separación y el procedimiento se repite tres veces por volumen de sobrenadante. Se separa la fase orgánica y se filtra con sulfato de sodio anhidro (con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua posible) y se colecta en un matraz de bola de 250 ml. Se evapora el solvente en el rotavapor y se obtiene un residuo aceitoso como en el caso de la extracción de sólidos. Se le corre una cromatografía en capa fina para determinar la presencia de diosgenina.

5. Purificación de la Diosgenina en Columna.

Para la purificación de los residuos aceitosos de la fermentación se empaca una columna de vidrio de 3 x 45 cm con una suspensión de 100 g de gel de sílice en 300 ml de benceno aplicando aire a presión y vibración-mecánica para que se empaque bien. Se deja bajar el nivel del solvente hasta el borde del nivel de empaque -- sin dejar que se seque la columna. Se colocan los residuos aceitosos (3 a 4 g) disueltos en una mínima cantidad de benceno, sobre la superficie de la columna y se empieza a eluir ésta con un gradiente de mezcla de solventes como sigue: Benceno, Benceno-Hexano 90:10, -- Benceno-Hexano 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 30:70; 20:80 y Hexano. El flujo de la elución es de 5 ml/min y las fracciones son de 8 ml.

Se corren cromatografías de las fracciones y se de termina si hay diosgenina. Las fracciones donde aparece diosgenina, se colectan y se recristalizan.

Para recristalizar, las fracciones con diosgenina más pura, se juntan en un matraz de bola, se evapora el solvente a sequedad y los cristales obtenidos se disuel ven en la mínima cantidad de acetona caliente. Se evapo ra en un baño de vapor hasta que queden aproximadamente 10 ml y se le adicionan 20 ml de metanol; se sigue ca-- lentando hasta que se evapore toda la acetona, se saca del baño de vapor y se deja enfriar un poco a temperatu ra ambiente. Se mete en un vaso con hielo y se obtienen los cristales de diosgenina más pura.

Se les corren cromatografía en capa fina, cromato grafía de gases y se determina su punto de fusión.

6. Cromatografía en Capa Fina.

Para la cromatografía en capa fina se usan las cro matoplacas Merck, las cuales se dividieron en 4 carriles y se aplican las muestras alternadas con los estándares correspondientes. Se satura la cámara con la mezcla de solventes adecuada al producto que se quiere detectar, según lo mencionado en la sección C de este capítulo. La muestra se deja correr hasta aproximadamente 3 cm antes del borde de la placa. Se deja secar y se revela con la

solución reveladora de vainillina, Se activa con calor y se determinan los Rf.

En el caso de las placas con indicador de fluorescencia, se tratan de la misma manera pero antes de revelar con vainillina, se observan en una lámpara de luz UV y se marcan las manchas que se revelan a 253.7 y 375 nm con un lápiz. Posteriormente se revelan con vainillina.

7. Determinación de Diosgenina.

La diosgenina se determina inyectando 2 μ l de una solución clorofórmica de diosgenina en el cromatógrafo de gases.

Las condiciones generales de operación de todas las cromatografías son las siguientes: Se usa una columna de vidrio de 2 mm de diámetro interno por 6 pies de longitud, empacada con una fase líquida OV-17 al 3 % sobre un soporte de Cromosorb-Q de 80 a 100 mallas. La temperatura del inyector es de 290°C, la de la columna es de 245°C, el detector de iones está a 290°C; la atenuación fue de 16 y la sensibilidad de 10^{-10} amp/mv. La velocidad de la carta del registrador es de 0.2 cm/min y el gas acarreador (nitrógeno) se mantuvo a un flujo de 50 cm³/min.

El cálculo de la concentración de la diosgenina se

hizo, sabiendo que el área bajo los picos es directamente proporcional a la concentración de los componentes de la solución analizada.

Normalmente se calcula el porcentaje de un compuesto en base al área producida por un estándar de concentración conocida, y con él se obtiene el factor de respuesta del detector del cromatógrafo al compuesto referido; sin embargo, cuando se trata de mezclas de compuestos desconocidos en una solución, se recurre al método del cálculo del % del componente X y sólo se toma en cuenta el área de los picos medida a la mitad de la altura, con la suposición de que el factor de respuesta para cada componente sea más o menos el mismo.

Para el cálculo de las áreas por este método se -- mantienen constantes la atenuación y sensibilidad del e lectrómetro del cromatógrafo. Mientras que en el método que considera el factor de respuesta, pueden variarse -- dichas condiciones y corregirse posteriormente al aplicar la ecuación del cálculo del porcentaje del compuesto X que involucra las condiciones como la atenuación apli cada al compuesto, la sensibilidad, la velocidad de la carta, la suma de las áreas corregidas de los picos que a su vez se determinan midiendo la altura de los picos -- y la amplitud en la base del pico a la mitad de la altu

ra. Con la atenuación, la sensibilidad y la velocidad - de la carta constantes, la concentración de diosgenina se determinó aplicando la siguiente fórmula

$$\% \text{ Diosgenina} = \frac{\text{Acd.} \times 100}{\Sigma \text{Act}}$$

donde Acd = área del pico de la diosgenina, tomando como base del pico, la amplitud a la mitad de la altura ($A = bh/2$),

ΣAct = suma de las áreas de todos los picos que aparecen en el cromatograma, igualmente medidas.

Es necesario aclarar que este método es aproximado, dado que se desconoce la naturaleza de la mayoría de los componentes de las muestras de las fermentaciones. Para el caso de las actividades de saponasas, se hizo una curva estándar y se calculó empleando las áreas calculadas con la altura total.

8. Determinación de Proteína.

La proteína se determina por una modificación del método de Lowry (26), que se basa en la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico (o aromático en otros casos como en el del triptofano, fenilalanina e histidina) de la tirosina de las proteínas, y -

el ácido fosfowolframomolibdico (color oro), que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas dando un color azul intenso que se puede medir a 625 nm usándose un estándar de albúmina sérica bovina a una concentración de 500 µg/ml.

Para la determinación de la proteína se toma una a lícuota del paquete celular resuspendido en NaOH 1 N o del filtrado y aforar el volumen a 1 ml con agua destilada. Se adicionan 5 ml de la solución de proteínas --- (IV.B.2), se agita bien y se deja reposar 10 minutos. Se adicionan 0,5 ml de reactivo de Folín Ciocalteau diluído 1:1 y se agita perfectamente. Se deja reposar 30 minutos y se lee la densidad óptica (D.O.) a 595 nm -- contra un blanco de agua en el colorímetro Bausch & Lomb spectronic 20.

$$\text{CALCULOS: } \begin{array}{l} \text{Concentración} \\ \text{de Proteínas} \end{array} = \frac{\text{St} \times \text{D.O.}_p \times \text{F.D.}}{\text{D.O.}_{\text{St}}}$$

donde F.D. es el factor de dilución de la muestra (alí cuota/ml de muestra original); D.O._p = Densidad óptica del problema y D.O._{St} = Densidad óptica del estándar.

9. Actividad de Celulasas sobre papel filtro.

Esta actividad se determinó por el método de Mandels (27) que consiste en la determinación de los azúcares

reductores producidos por la acción de las celulasas sobre papel filtro. El sistema de reacción contiene 50 mg de papel filtro, 1 ml de solución amortiguadora de citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado original y se incuba durante una hora a 50°C. La reacción se detiene adicionando 3 ml de reactivo de D.N.S. (IV.B.1). - Se hierve durante 5 minutos en baño maría, se deja enfriar a temperatura ambiente y se le añaden 15.5 ml de agua destilada. Se agita y se lee la densidad óptica a 550 nm. La concentración de azúcares reductores se calcula extrapolando los valores de D.O. en una curva estándar de glucosa, la cual es lineal hasta 1.5 mg de glucosa (datos no mostrados).

10. Actividad de β -glucosidasa.

Para cuantificar la actividad de β glucosidasa se usó p-nitrofenol- β -D-glucósido (PNFG) (28). El sistema de reacción tenía 0.25 ml de la solución de PNFG 6 mM (IV.B.6), 0.5 ml de la solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.8 (IV.B.8) y 0.25 ml del filtrado (enzima). Se incuba 10 minutos a 50°C y se retiran en ese tiempo exacto, 0.2 ml del sistema de reacción. - La alícuota se vacía sobre un tubo que contiene 4.8 ml de Na_2CO_3 0.1 M, se agita y se lee el color desarrollado a 420 nm. La concentración de p-nitrofenol liberado-

se calculó mediante una curva estándar del mismo (Fig. 24).

11. Actividad de Saponasas.

Para determinar la actividad de saponasas se usó como sustrato un extracto metanólico del barbasco que nos fue suministrado por Proquívemex, el cual contiene las cinco saponinas más abundantes del barbasco. El sistema de reacción consiste de 10 mg de extracto metanólico de barbasco, 4 ml de solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 6 (IV.B.13) y el liofilizado de 75 ml de medio (enzima). Se incubó 48 horas a 50°C y se detiene la reacción adicionando 10 ml de cloroformo. Se enfría a temperatura ambiente y se extrae tres veces con cloroformo. Se evapora el solvente y se redisuelve en 5 ml de cloroformo. Se corren placas cromatográficas para diosgenina y saponinas. Si aparece diosgenina, se cuantifica por cromatografía de gases y la concentración se calcula usando una curva estándar de diosgenina (Fig.- 25).

12. Preparación de los filtrados saponinolíticos.

El filtrado libre de células se concentró por liofilización y los sólidos se resuspendieron en amortiguador de citratos 0.1 M, pH 6. La solución se dializó en una columna de Sephadex G-25.

13. Filtración en Sephadex G-25.

Esta resina se hidrata resuspendiéndola en agua -- destilada o en la solución amortiguadora y se requiere de tres horas a temperatura ambiente o 30 minutos en baño maría a ebullición. Con el Sephadex G-25 se empaca una columna de 1.5 X 40 cm de Pharmacia Fine Chemicals, Suecia. La columna se equilibra con agua destilada o con el amortiguador necesario, calibrándola con una mezcla de dos colorantes, uno de peso molecular elevado y uno ligero, dextran azul y rojo de metilo respectivamente, en una proporción de 1:1. El volumen de exclusión del azul dextran se encuentra en la figura 30.

14. Fraccionamiento en DEAE-Sephadex A 50.

Con esta resina, preparada de acuerdo a las indicaciones del catálogo de intercambio iónico de Pharmacia-Fine Chemicals, Suecia se empaca una columna de 2.6 X 40 cm de Pharmacia Fine Chemicals. La columna se equilibra con amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 6.8. Colocada la muestra se eluye con el mismo amortiguador y después con solución amortiguadora de fosfatos 0.075 M, pH 6.8. Las fracciones son de 10 ml y el flujo de eluciónes de 30 ml/hora. Las muestras se leen a 280 nm en el espectrofotómetro Beckman.

15. Electroforesis.

Para la identificación de las proteínas se utiliza su movilidad electroforética en placas de gel de acrilamida conforme a la técnica de Lameli (29) empleando una cámara de electroforesis de Bio-Rad y una fuente de poder de Camaq. La preparación de electroforesis incluye los siguientes pasos:

a) Preparación de la muestra: La muestra se liofiliza y se resuspende en 40 μ l de una solución amortiguadora (magic mix). Toda la mezcla se sometió a ebullición en baño maría por dos minutos. La cantidad de muestra en cada carril se determina por Lowry y se ajusta a tener 75 microgramos en 40 microlitros.

En nuestro caso no la determinamos por Lowry sino por absorción a 280 nm.

b) Preparación del gel: El gel inferior contenía acrilamida al 11 %. Para preparar el gel se mezclaron -- 5.5 ml del stock de acrilamida, 3 ml de solución amortiguadora de Tris-HCl 2 M pH 8.8, 0.15 ml de SDS al 10 %, 5.95 ml de agua, 0.2 ml de persulfato de amonio al 1 %, se desgasificó por dos minutos y se agregaron 15 microlitros de TEMED. Se utilizaron 10 ml de esta mezcla para la formación de un gel de 14 X 8 X 0.075 cm. El gel superior contenía 1.75 ml de stock de acrilamida, 0.325 - ml de Tris-HCl 2 M, pH 6.8, 0.05 ml de SDS al 10 %, 5.75

ml de agua, 0.05 ml de persulfato de amonio al 1 % (Recién preparado), después de desgasificar se agregan 10 microlitros de TEMED. La electroforesis se corre inicialmente a 10 mA. Cuando el colorante que acompaña a la -- muestra entra en el gel inferior se cambia la intensi--dad de la corriente a 20 mA. El amortiguador que se emplea en la corrida es Tris-Glicina 0.02 M, pH 7.2.

c) Tinción del gel: Después de la electroforesis, se tiñe el gel con una mezcla de azul brillante de --- Coomasie 0.06 % (p/v), metanol 30 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v) y agua 60 %, lavando posteriormente con ácido acético al 10 % hasta la aparición clara de - las bandas.

E. REACTIVOS.

La harina de barbasco, la diosgenina y el extracto metanólico del barbasco (saponinas) fueron un obsequio de PROQUIVEMEX, S.A.

La urea, celulosa microcristalina (Avicel), el - medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA), el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) se obtuvieron de E. Merck, Alemania.

El Trizma base, el Tween 80, el reactivo de Folín-Ciocalteau y los reactivos para la electroforesis provienen de Sigma de México.

El Sephadex G-25 y el DEAE-Sephadex A-50 provienen de Pharmacia Fine Chemicals, Suecia.

Los demás reactivos y solventes se obtuvieron de - J.T. Baker Chemical Co, USA.

CAPITULO V

R E S U L T A D O S

A. OBTENCION FERMENTATIVA DE DIOSGENINA.

A fin de obtener el mejor medio de liberación de la diosgenina presente en la harina de barbasco, que fuera económico y a la vez con buenos rendimientos, se determinó el crecimiento de Aureobasidium sp. en diferentes medios sencillos, usando como fuente de carbono a la harina de barbasco finamente molida, al 2 %. Un parámetro importante para la utilización del hongo es que aproveche el barbasco y las saponinas para crecer, pero no la diosgenina.

Como se observa en la figura 7, el microorganismo es capaz de crecer en todos los medios que tienen barbasco como fuente de carbono, crece menos en los que tienen saponinas y no crece en los que tienen diosgenina. Estos resultados van de acuerdo con lo esperado si consideramos que el barbasco tiene almidón y celulosa, que son fácilmente aprovechados por el hongo.

Es importante hacer notar que se usaron medios con celulosa debido a que Aureobasidium sp. es un hongo celolítico que induce su β glucosidasa en presencia de celulosa microcristalina (30) y ya que el enlace de las saponinas es β glucosídico, puede ser hidrolizado por -

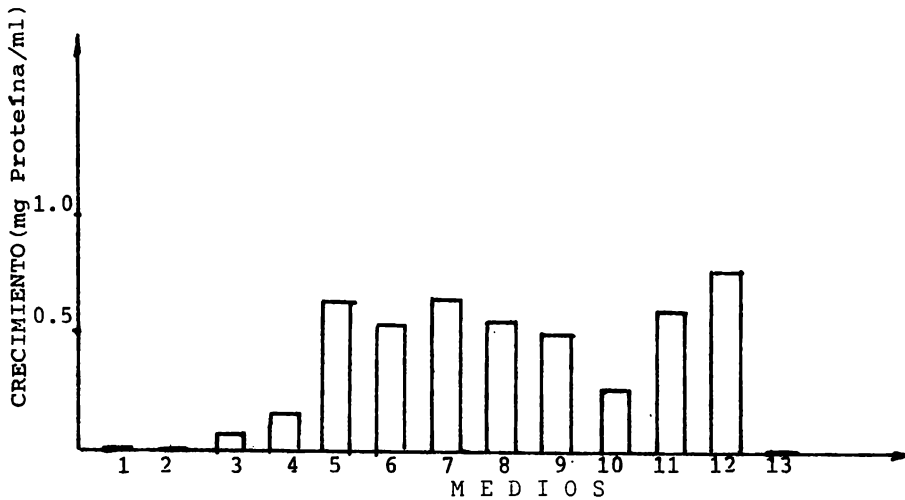


FIGURA 7: CRECIMIENTO DE AUREOBASIDIUM SP EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. Medio 1: Medio B + -- Diosgenina 0.5 % sin Tween 80; Medio 2: Medio B + Diosgenina 0.5 %; Medio 3: Medio B + Saponinas 0.5 % sin Tween 80; Medio 4: Medio B + Saponinas 0.5 %; Medio 5: Medio B + Barbasco al 2%; Medio 6: Medio B + Barbasco 2 % + Celulosa 0.75 %; Medio 7: Agua + Barbasco 2 % + Tween 80 0.2 %; Medio 8: Agua + Barbasco 2 % + Tween 80 0.2 % + Celulosa 0.75 %; Medio 9: Agua + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14 % + Barbasco al 2% + Tween 80 0.2 %; Medio 10: Agua + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14 % + Barbasco 2 % + Tween 80 0.2 % + Celulosa 0.75 %; Medio 11: Agua + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14 % + KH_2PO_4 0.2 % + Tween 80 0.2 % + Barbasco 2 %; Medio 12: Agua + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14 % + KH_2PO_4 0.2 % + Tween 80 0.2 % + Barbasco 2 % + Celulosa 0.75 %; Medio 13: Medio B sin fuente de carbono.

esta enzima.

Una cosa interesante en la selección del medio de liberación de diosgenina fue el hecho de que el hongo - Aureobasidium sp. es capaz de crecer en el medio 7, constituido sólo de agua, barbasco y Tween 80, el cual es muy económico. Basado en esto, se decidió probar la liberación de diosgenina por la fermentación de harina de barbasco en este medio. Bajo esta condición, se obtuvo 0,225 % de diosgenina (0,17 g de diosgenina a partir de 30 g de harina de barbasco con un 40 % de pureza, de terminada después de una cromatografía en columna de gel de sílice (Fig. 8)).

Este rendimiento es muy bajo en relación con el obtenido por una hidrólisis ácida, con la que se obtuvo un 3,2 % de diosgenina, con un 95 % de pureza.

Para explicar este resultado se pensó en la posibilidad de que la materia prima, molida finamente, al ponerse en agua, liberara una gran cantidad de azúcares solubles y que éstos fueran responsables de la baja cantidad de diosgenina liberada. Se determinó la concentración de azúcares reductores y se vio que de 185 µg/ml aumentaba a 1.4 mg/ml después de moler y ponerlos en agua.

Para eliminar el posible efecto de los azúcares so

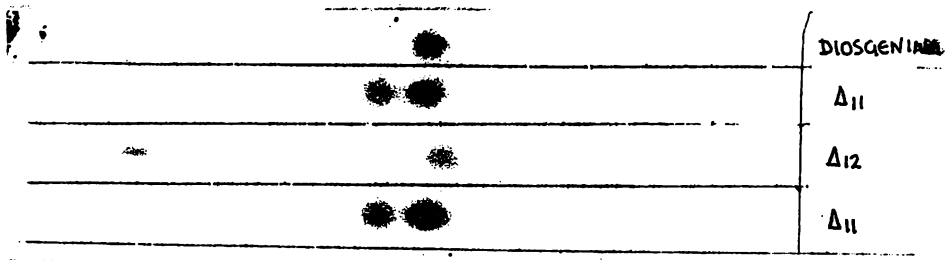
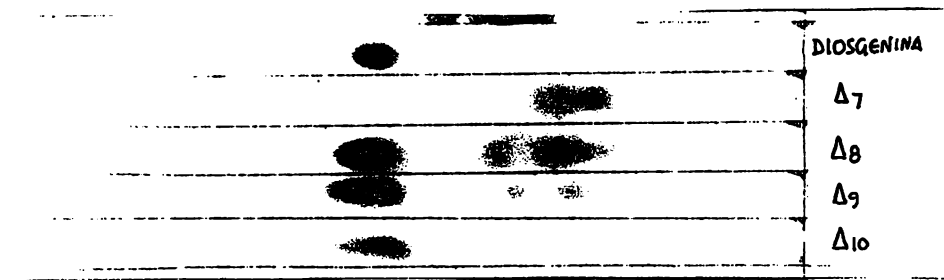


FIGURA 8: CROMATOGRAFIAS DE LAS FRACCIONES CORRESPONDIENTES A LA PURIFICACION DE DIOSGENINA EN UNA COLUMNA DE GEL DE SILICE ELUIDA CON HEXANO-BENCENO: A₇: Fracción eluída con Hexano-Benceno 20:80; A₈-A₁₁: Fracciones eluídas con Hexano-Benceno 50:50; A₁₂: Fracción eluída con Hexano-Benceno 80:20.

lubles sobre la producción de diosgenina, se decidió estudiar la liberación de este compuesto en tres tamaños diferentes de partículas en dos concentraciones, en el medio seleccionado (agua + harina de barbasco), En la figura 9 puede observarse que hay mayor concentración de diosgenina en el medio con harina de barbasco molida 20 segundos en la licuadora en una concentración del 2 %, Esto se repitió y se determinó la concentración de diosgenina. En la tabla II se ven los resultados. Basados en estos resultados, se decidió utilizar en lo futuro el medio de agua + harina de barbasco medio molida a una concentración del 2 %.

Otro parámetro que se estudió fue el efecto del pH, ya que como se mencionó en la introducción, la diosgenina se obtiene por hidrólisis ácida y hasta este momento, todos los experimentos se habían realizado a un pH de 4.5 antes de esterilizar.

Se probaron tres pH: 4,5, 6,0 y 8,0 y se encontró hidrólisis en los tres. Una cosa interesante fue determinar que había hidrólisis en un pH alcalino, la cual no se había reportado previamente. Se repitió el experimento en sólo dos pH que representaban las condiciones de hidrólisis ácida y alcalina. Como se observa en la figura 10, hay mayor cantidad de diosgenina a partir de

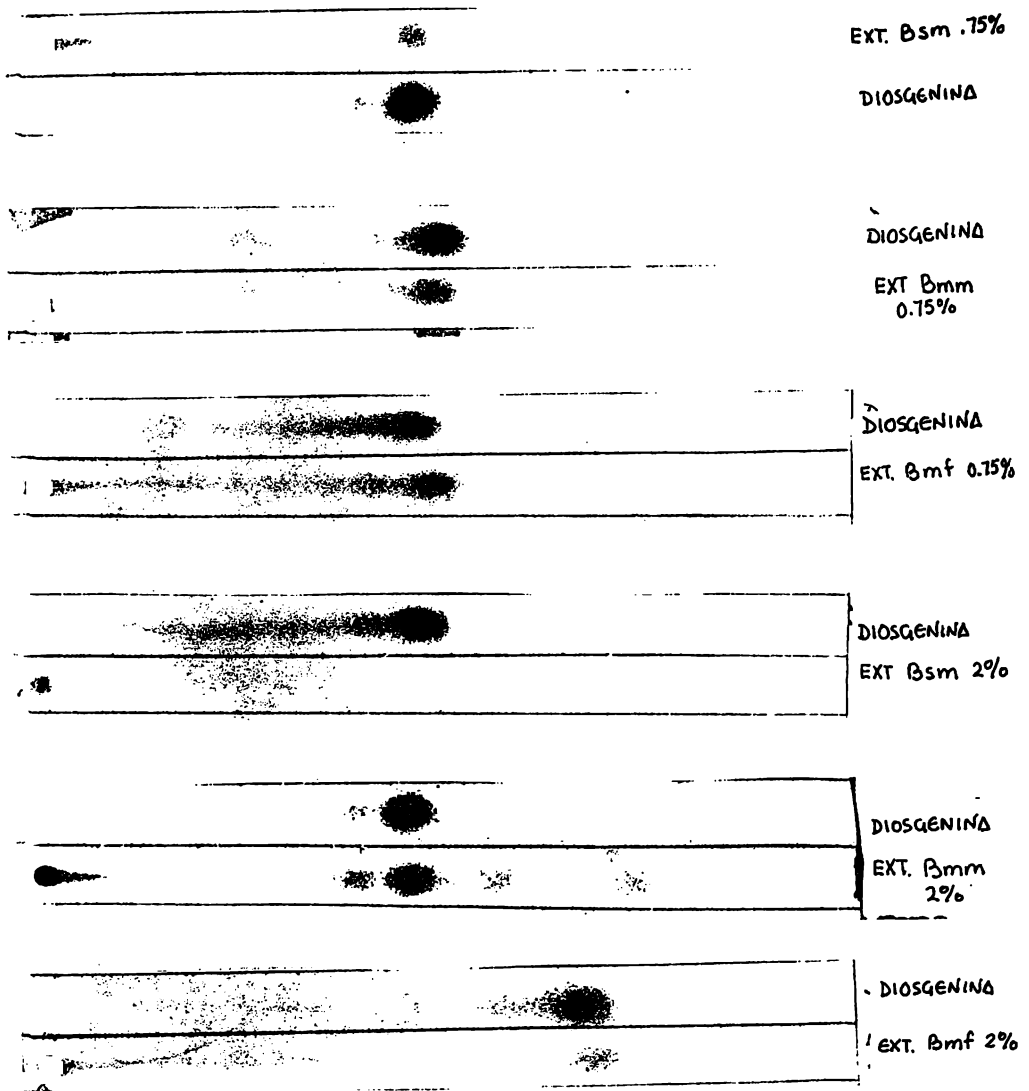


FIGURA 9: EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA SOBRE LA PRODUCCION DE DIOSGENINA A DOS CONCENTRACIONES: Bsm: Harina - de barbasco sin moler; Bmm: Harina de barbasco molida 20 segundos en licuadora; Bmf: Harina de barbasco molida finamente en un mortero.

TABLA II: PRODUCCIÓN DE DIOSGENINA, EN MEDIO DE A
GUA + TWEEN 80 0.2 % + HARINA DE BARBASCO
 EN TRES TAMAÑOS DE PARTICULA Y DOS-
 CONCENTRACIONES.

Condición	Rendimiento de Diosgenina (% en Peso Seco de H.B. ^a)
Bsm 0.75 %	0.17
Bmm 0.75 %	0.56
Bmf 0.75 %	0.19
Bsm 2.00 %	0.19
Bmm 2.00 %	1.40
Bmf 2.00 %	0.23

^aH.B.: Harina de Barbasco

Bsm: Harina de Barbasco sin moler.

Bmm: Harina de Barbasco molida 20 segundos en licuadora

Bmf: Harina de Barbasco molida finamente en mortero.

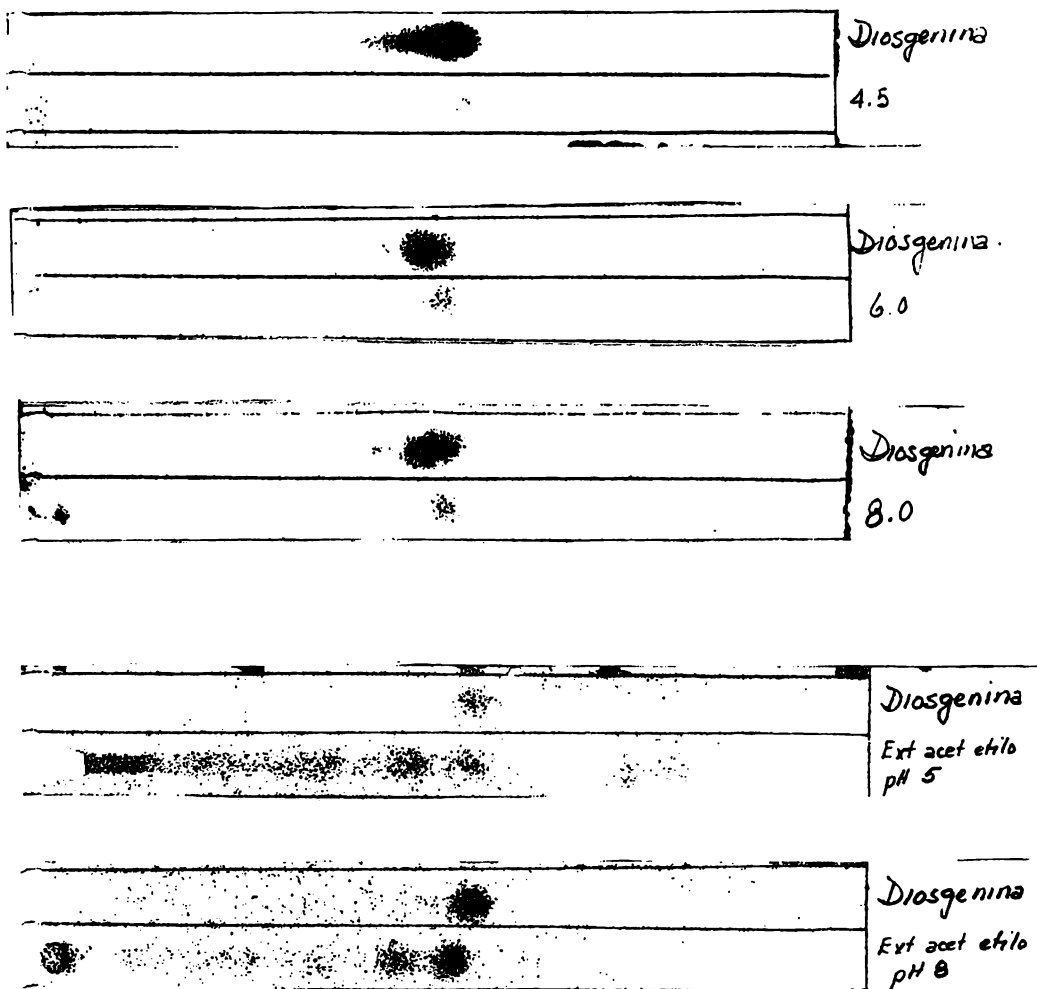
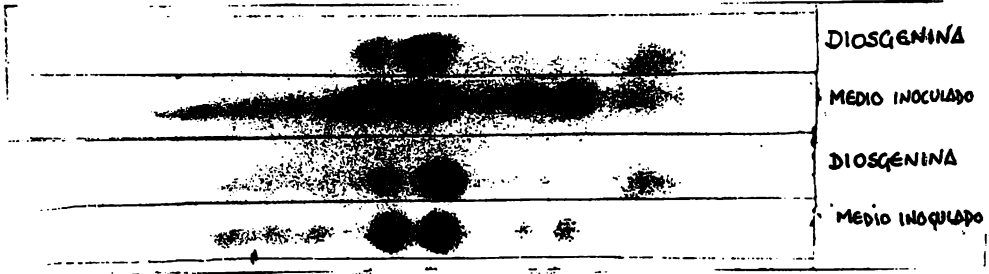


FIGURA 10: EFECTO DEL pH INICIAL SOBRE LA PRODUCCION DE DIOSGENINA.

un cultivo a pH inicial de 8 que a partir del cultivo a pH inicial de 5. Además, se vió que el producto de la extracción era más puro en pH de 8 y se determinó su rendimiento, siendo de 1.635 % (327 mg a partir de 20 g - de harina de barbasco en base seca).

Como no se ha reportado hidrólisis alcalina de las saponinas del barbasco, era importante determinar que - nuestros resultados se debían a la hidrólisis microbiana y no a la hidrólisis química (en este caso, alcalina). Con el fin de responder esta cuestión se hizo una fermentación del barbasco inoculado con el hongo ----- Aureobasidium sp. y un control sin inocular, en las mismas condiciones de tiempo, agitación y temperatura. Se extrajeron los sólidos con hexano y se corrieron las -- cromatografías correspondientes. Se observa en la figura 11 que aparece una cantidad de diosgenina (280 mg) en los extractos de barbasco fermentado con el hongo -- Aureobasidium sp, mientras que los productos de la hidrólisis alcalina, son compuestos diferentes a la diosgenina aunque algunos tienen una polaridad semejante a nuestro producto pero con dobles ligaduras conjugadas, - ya que absorben en el rango de la luz ultravioleta. Esto se determinó utilizando cromatoplasmas con indicador de fluorescencia que se observan con una lámpara de luz

HIDROLISIS MICROBIANA



HIDROLISIS QUIMICA (ALCALINA)

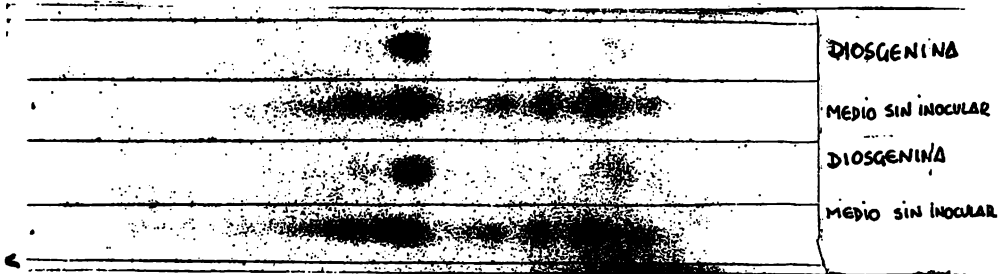


FIGURA 11: EFECTO DEL INOCULO SOBRE LA PRODUCCION DE -
DIOSGENINA A UN pH INICIAL DE 8.

UV. Cuando hay compuestos con dobles ligaduras absorben a 253,7 y 375 nm, y éste fue el caso en los productos obtenidos por la hidrólisis química (alcalina).

Con el objeto de optimizar la liberación de la diosgenina del barbasco y basados en antecedentes de que el hongo requiere Tween 80 y urea para producir y liberar su complejo celulolítico (y por ende, la β glucosidasa) al medio de cultivo, se decidió utilizar tres medios de cultivo para medir la liberación de diosgenina en ellos. Estos medios fueron el medio AB (agua + barbasco), BB (medio B + barbasco) y BBC (medio B + barbasco + celulosa) descritos en Material y Métodos. Se obtuvieron 200, 410 y 669 mg de sólidos no purificados correspondientes a diosgenina, respectivamente. Se recrystalizaron en acetona-hielo y se corrieron las cromatografías de gases que aparecen en las figuras 12 y 13. Como puede observarse, hay mayor cantidad de diosgenina en los medios BB y BBC que en el que sólo tiene agua y barbasco.

Para explicar la mayor aparición de diosgenina en estos medios y analizando su composición, observamos que hay Tween 80 y urea en estos medios y por ello se decidió probar el efecto de estos compuestos sobre la liberación de diosgenina por la fermentación de la hari

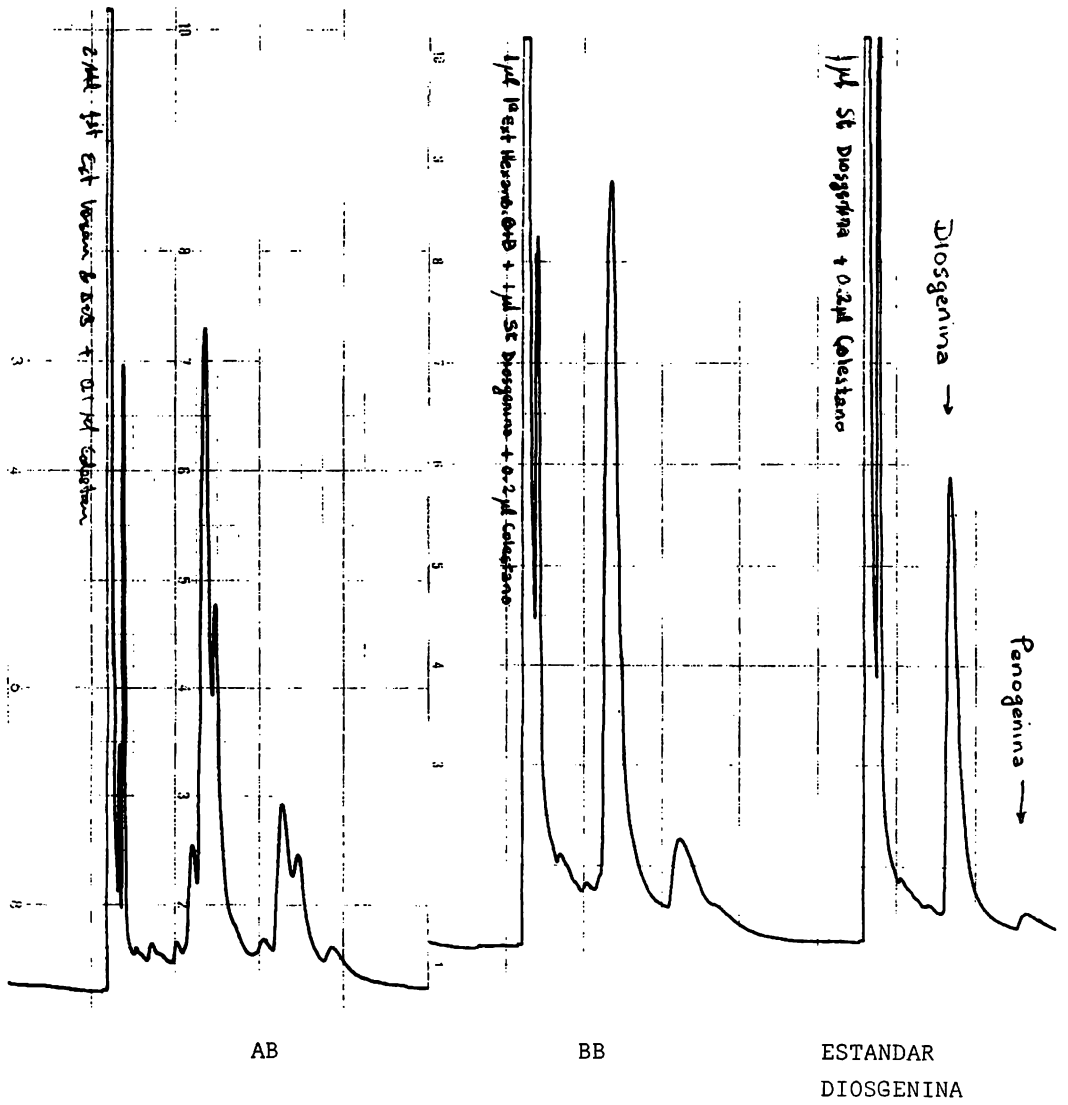


FIGURA 12: PRODUCCION DE DIOSGENINA EN MEDIOS DIFERENTES:
 AB: Agua + Barbasco 2 %; BB: Medio B (Material
 y Métodos) + Barbasco 2 %.

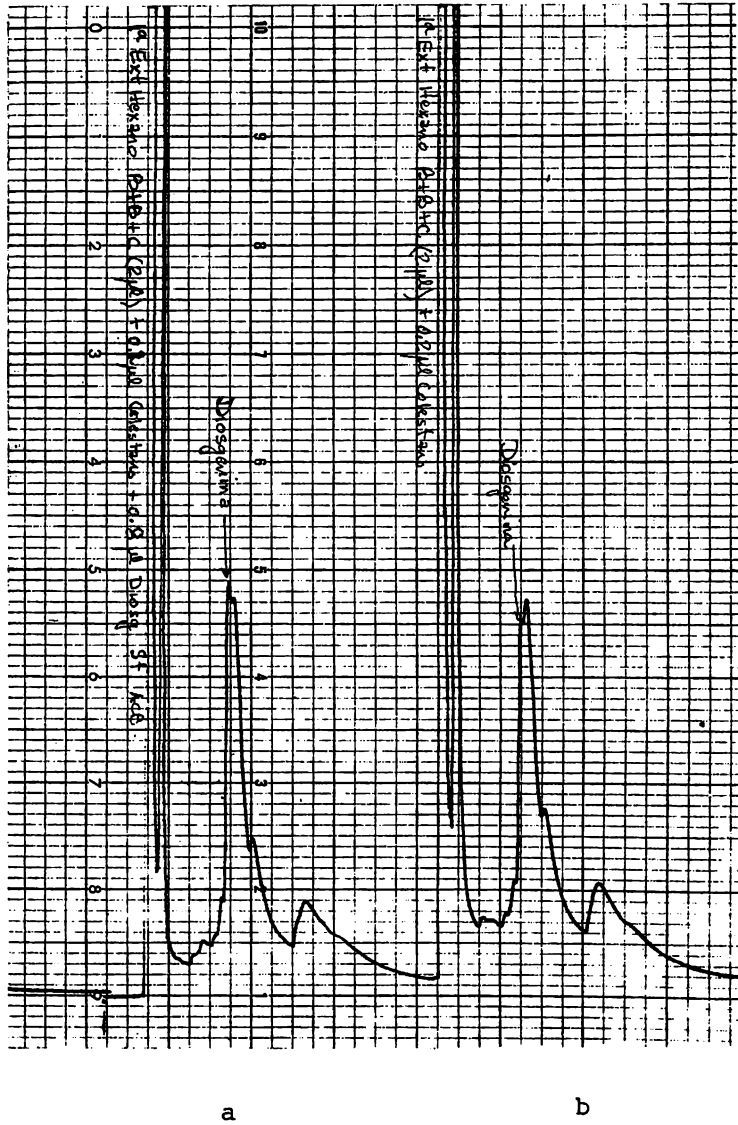


FIGURA 13: PRODUCCION DE DIOSGENINA EN MEDIOS DIFERENTES:
 BBC: Medio B + Barbasco (Bfm) al 2 % + Ce
 lulosa microcristalina (Avicel) al 0.75 %
 a) BBC + 0.8 µl Estándar de Diosgenina; b)
 BBC.

na de barbasco con el Aureobasidium sp.

En la figura 14 se encuentran los cromatogramas -- del efecto del Tween 80 y de Tween 80 + urea al 0.3 %, -- ya que como se mencionó previamente el hongo requiere de la urea para producir su complejo celulolítico completo entre el que se encuentra su β glucosidasa. Podemos ver que hay mayor concentración de diosgenina en el medio -- que sólo tiene Tween 80 que en el que tiene urea combinada o en un medio que sólo contiene urea. Por este motivo se decidió usar un medio que tuviera agua + harina de barbasco medio molida al 2 % + Tween 80 al 0.2 %, pH de 8.

Debido a que los procesos de esterilización a nivel industrial son muy caros, lo que aumentaría el costo del proceso al escalarlo, se pensó en evitar dicha esterilización. A este respecto se hicieron algunos experimentos en los que se determinó si era necesario esterilizar el medio de cultivo para obtener la diosgenina. En la figura 15 se observa que en condiciones no estériles, no aparece diosgenina sino un compuesto menos polar, que absorbe a $\lambda = 253,7$ y 375 nm (en placas con indicador de fluorescencia) y que sospechamos que es diosgenona, lo que se comprobó con un barrido en el espectrofotómetro de Beckman, determinándose su máxima ab

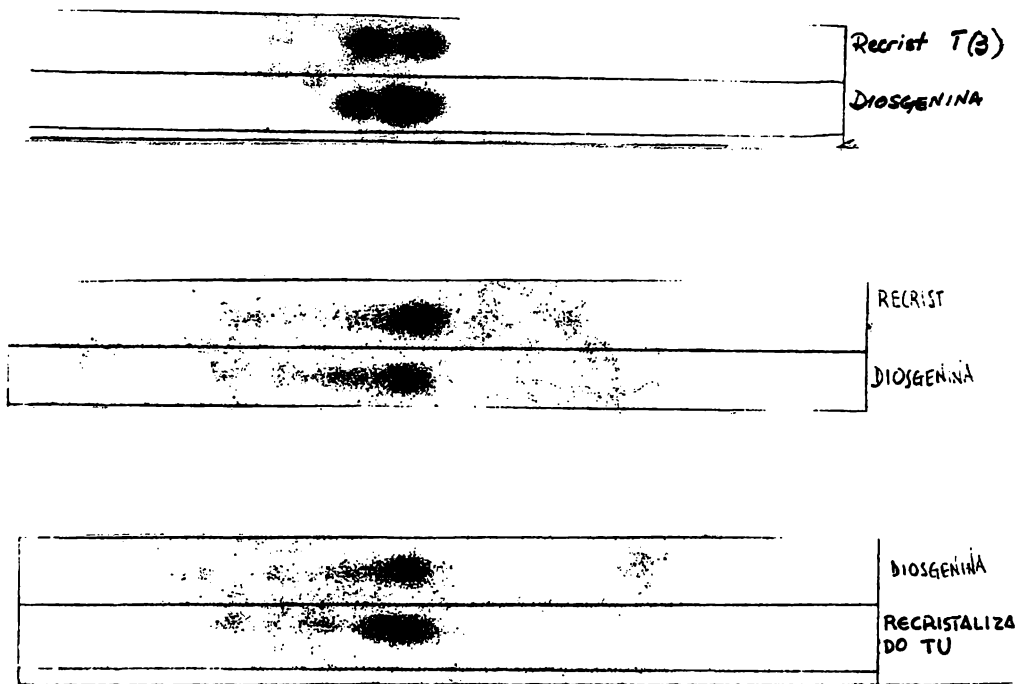


FIGURA 14: EFECTO DEL TWEEN 80 Y UREA SOBRE LA PRODUCCION DE DIOSGENINA: T: Agua + Barbasco 2 % + Tween 80 0.2 %; U: Agua + Barbasco 2 % + Urea 0.03 % TU: Agua + Barbasco 2 % + Urea 0.03 % + Tween 80 al 0.2 %.

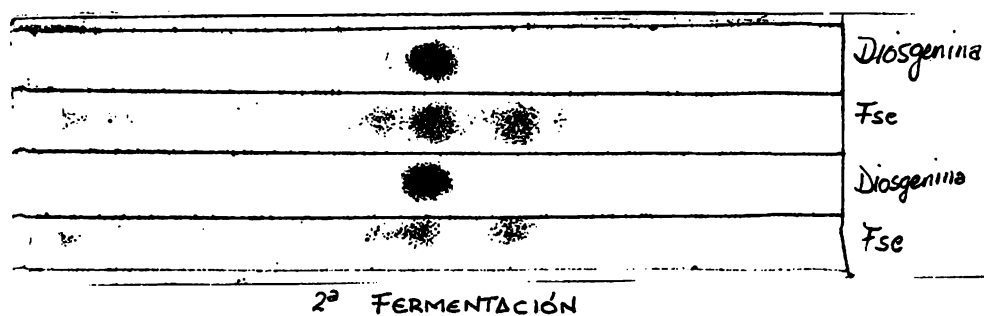
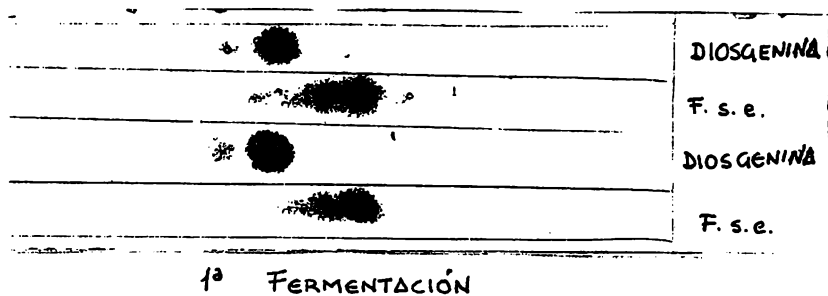


FIGURA 15: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE NO ESTERILIDAD SOBRE LA PRODUCCIÓN DE DIOSGENINA EN EL MEDIO Agua + Barbasco 2% + Tween 80 0.2 %, pH 8 F.s.e. : Fermentación sin esterilizar.

sorción a $\lambda = 235$ y 243 nm, como se espera de la comparación con los espectros de absorción teóricos para diosgenona (32) (Fig.16).

En un experimento posterior se logró obtener diosgenina por una fermentación no estéril pero su rendimiento fue muy inferior al de la fermentación estéril. La producción de diosgenina en estas condiciones puede deberse a que el inóculo de Aureobasidium sp fue muy grande (D.O. inicial de 7.5), sin embargo, debido al crecimiento de los otros microorganismos que se encuentran naturalmente en el barbasco, la cantidad de diosgenina liberada por nuestro hongo en estudio, se ve limitada:

a) por su transformación en otros compuestos menos polares (aparición de compuestos contaminantes, entre ellos la diosgenona)

b) por su posible utilización por los microorganismos presentes en el barbasco, como fuente de carbono. (A este respecto, cabe hacer notar que en el laboratorio se han aislado algunas bacterias y hongos que utilizan la diosgenina como fuente de carbono para crecer.),

En base a los resultados obtenidos en este experimento, se decidió seguir utilizando la fermentación estéril.

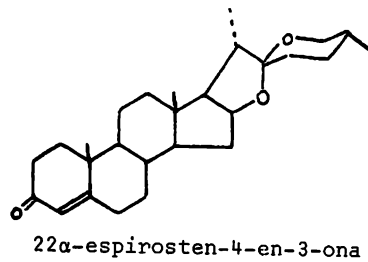
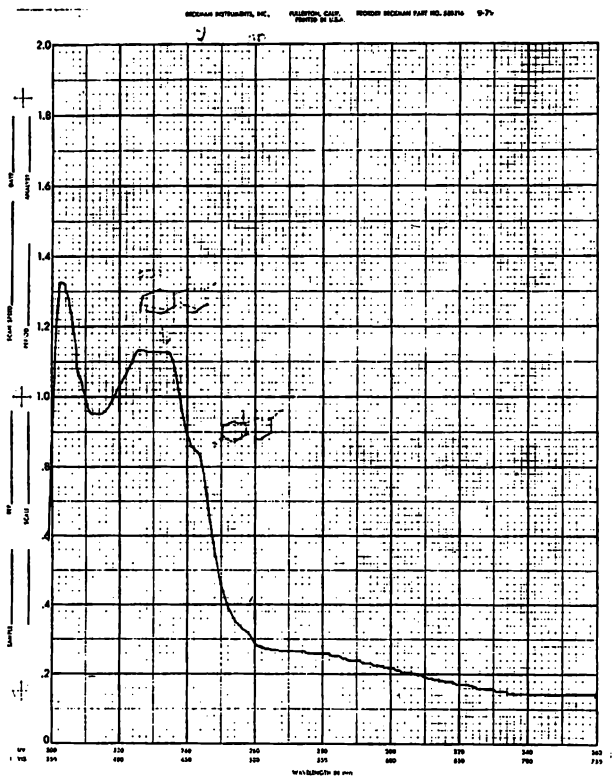


FIGURA 16: ESPECTRO DE ABSORCION DE DIOSGENONA.

B. PRODUCCION DE LAS SAPONASAS DEL HONGO AUREOBASIDIUM SP

Simultáneamente a la liberación de diosgenina a partir de la harina de barbasco, se estudió la aparición de la actividad enzimática de saponasas en los filtrados obtenidos en las diferentes condiciones de fermentación. Esto se hizo pensando en la posibilidad de utilizar esos filtrados in vitro para liberar la diosgenina residual del barbasco fermentado y optimizar de esta manera el -- proceso microbiológico.

En primer lugar se utilizaron los filtrados del experimento de crecimiento en diferentes medios de cultivo descrito en la sección anterior (Fig. 7), y en ellos se determinó la actividad de celulasas sobre papel filtro. Esto se realizó para determinar en qué medios podía existir β glucosidasa que pudiera asociarse a la actividad enzimática sobre las saponinas. Como se observa en la figura 17, la mejor actividad celulolítica se encuentra en los medios 5, 6, 8, 10 y 12. Se midió la actividad de saponasas en esos filtrados, además de la del filtrado proveniente del medio 7, debido a que este último fue el medio escogido para producir diosgenina en forma económica. Los resultados se encuentran en la figura 18, donde se puede ver que sólo hay actividad saponinolítica en los medios 6 y 8, lo que nos indicaba que el Tween 80

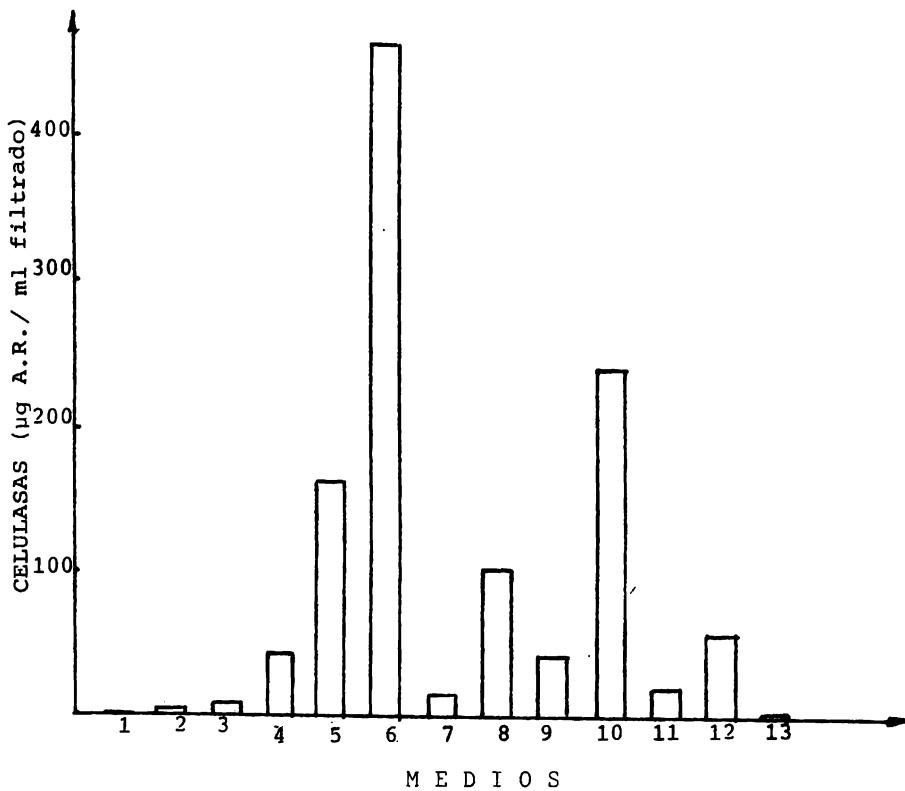


FIGURA 17: ACTIVIDAD CELULOLITICA SOBRE PAPEL FILTRO DE LOS FILTRADOS DE AUREOBASIDIUM SP CECIDO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. LOS MEDIOS SON LOS MISMOS DE LA FIGURA 7.

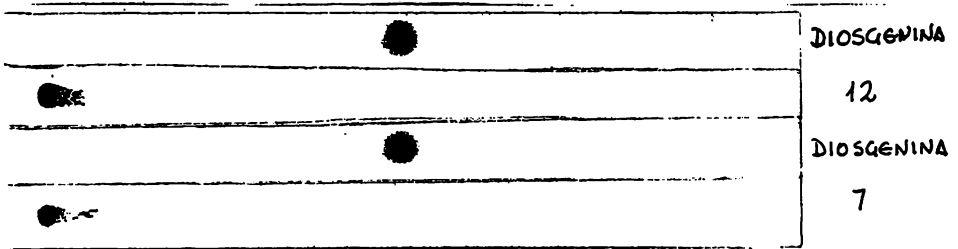
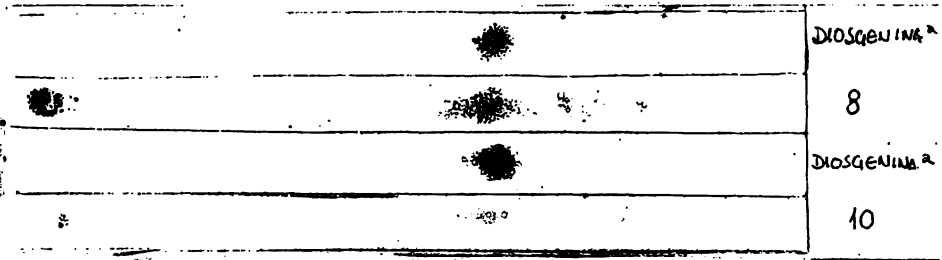
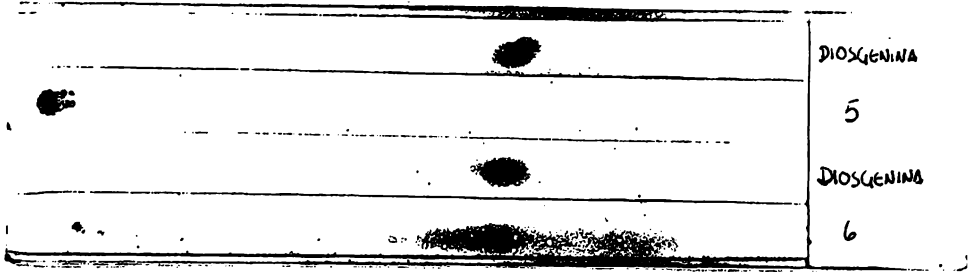


FIGURA 18: ACTIVIDAD SAPONINOLITICA DE LOS FILTRADOS DE ALGUNOS MEDIOS FERMENTADOS CON EL HONGO ---- AUREOBASIDIUM SP

era importante para la presencia de saponasas en el filtrado y que esta presencia se vea disminuida por algunas sales como el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el KH_2PO_4 .

Debido a que la aparición de saponasas en los filtrados se ve disminuida y esto puede deberse a la presencia de azúcares solubles, se decidió determinar el efecto de diferentes tamaños de partículas de harina de barbasco en dos concentraciones sobre la actividad de saponasas y como se ve en la figura 19, el mejor medio de producción de saponasas es el que tiene barbasco medio molido al 2 %.

Posteriormente se determinó la aparición de diosgenina cuando se crecía el hongo en un pH inicial de 8 y con el fin de relacionar esta liberación con la aparición de saponasas en los filtrados, se midió la actividad saponinolítica en los filtrados del medio inoculado y sin inocular. En la figura 20 se observa que no apareció diosgenina por la actividad de los filtrados del medio sin inocular, mientras que hubo liberación de una gran cantidad de diosgenina cuando se emplearon filtrados del medio inoculado con el hongo Aureobasidium sp. Además, como se ve en el cromatograma 20c desaparecen dos de las saponinas del barbasco asociadas con la aparición de la diosgenina.

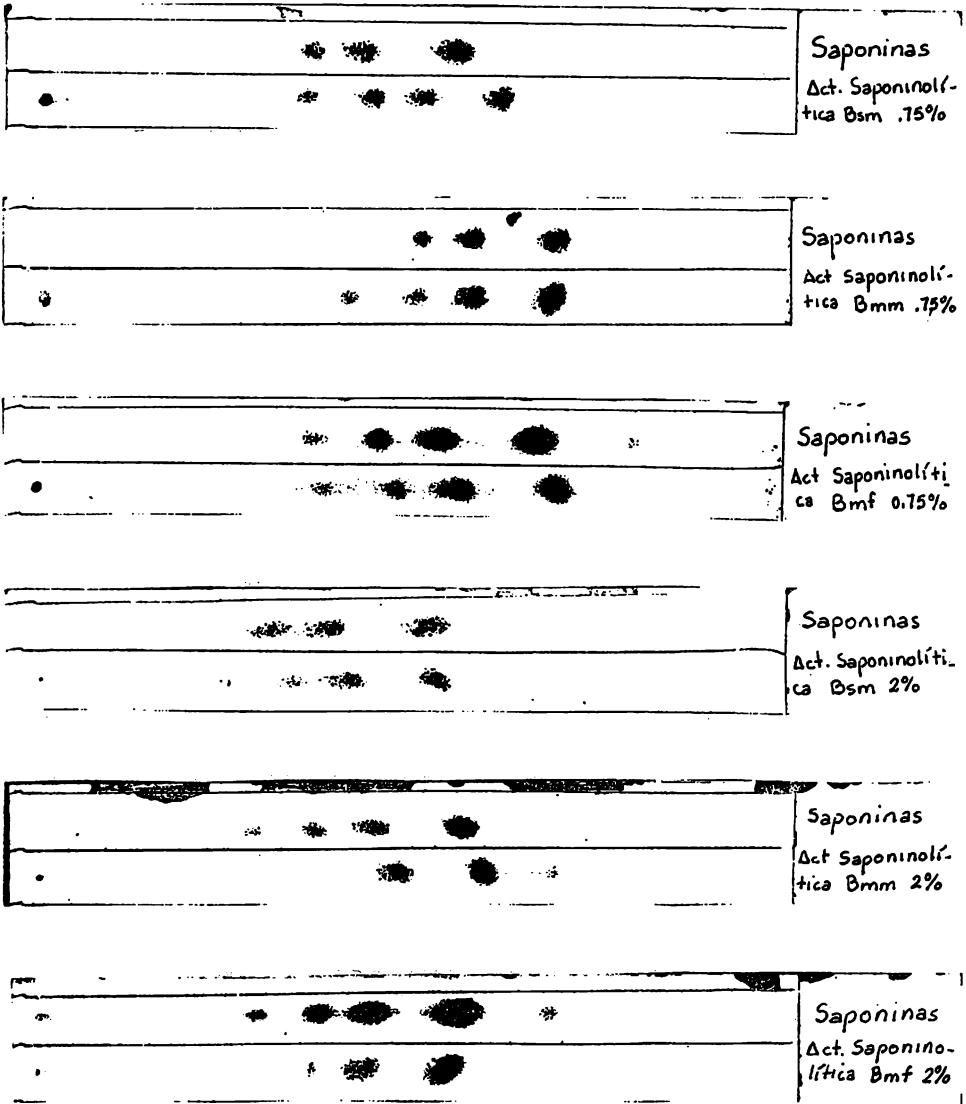


FIGURA 19: EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA A DOS CONCENTRACIONES SOBRE LA ACTIVIDAD SAPONINOLITICA LAS CONDICIONES SON LAS MISMAS DE LA FIGURA 9.

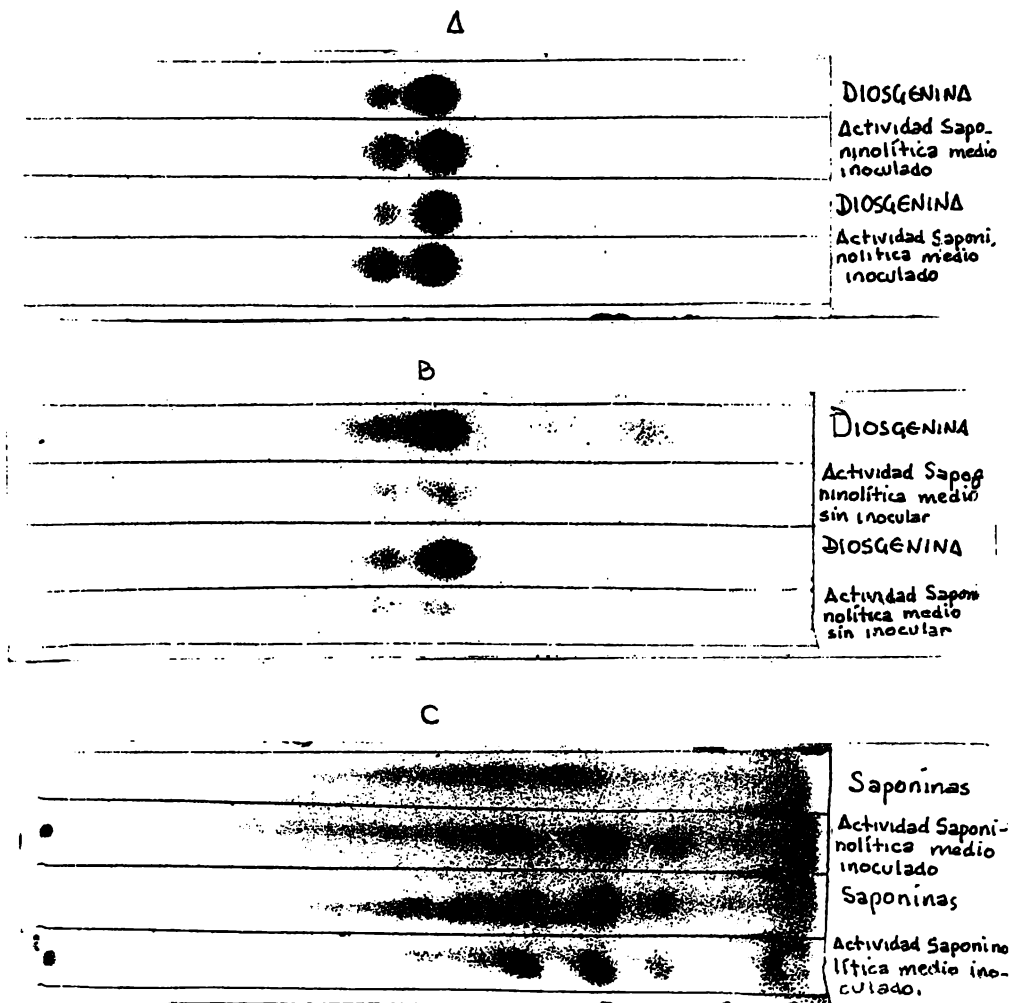


FIGURA 20: EFECTO DEL INOCULO SOBRE LA APARICION DE SAPONASAS EN LOS FILTRADOS DE MEDIOS DE AGUA + BARBASCO 2 %, pH INICIAL 8. A: Actividad de Saponasas en filtrado de medio inoculado con Aureobasidium sp. B: Actividad de Saponasas en filtrado de medio sin inocular. C: Actividad de Saponasas (por desaparición de su trato) del medio inoculado.

Se buscó saber si las enzimas se producían en las mismas condiciones de inducción de las celulasas y se midió la actividad de los filtrados del microorganismo crecido en tres medios diferentes: AB, BB y BBC. En la figura 21 se puede ver que en los tres medios desaparecen algunas de las saponinas pero la actividad es mayor en el caso del medio BBC (Medio B con barbasco y celulosa), por lo que se pensó que las enzimas requieren de algunos compuestos y un inductor para producirse y que pueden estar asociadas a la de la β glucosidasa del hongo. Sin embargo, el hecho de que en el medio AB (sólo agua y barbasco) haya hidrólisis enzimática podría ir en contra de la idea de que se trate de un solo tipo de enzima. Se decidió probar la actividad de una β glucosidasa comercial (emulsina de almendras) sobre las saponinas del barbasco y se observó que no presenta actividad sobre este sustrato (Fig. 22), a pesar de que se ha reportado que esta emulsina presenta actividad de glucosidasa sobre una gran variedad de sustratos (24).

Se determinó cuál de los factores del medio BB era el responsable de la aparición de la actividad saponinolítica en los filtrados y puede observarse en la figura 23 que en la presencia de Tween 80 apareció actividad saponinolítica, mientras que en el medio con Tween 80 +

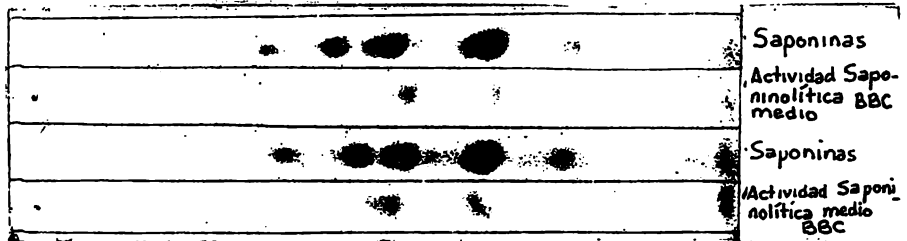
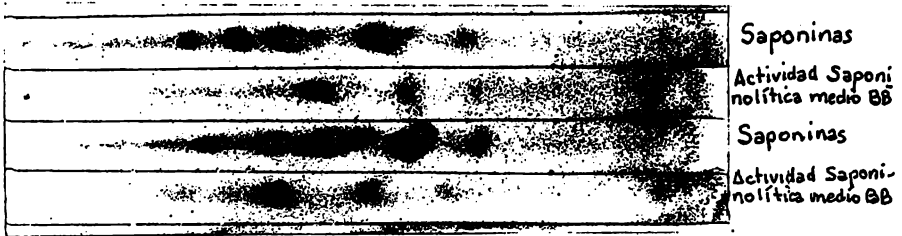
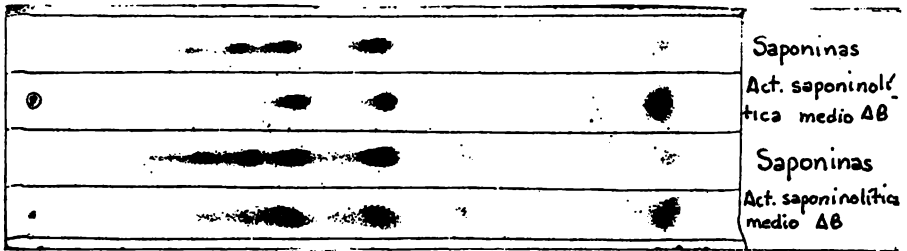


FIGURA 21: ACTIVIDAD SAPONINOLITICA DE FILTRADOS DEL HONGO AUREOBASIDIUM SP CECIDO EN TRES MEDIOS DIFERENTES. LA ACTIVIDAD SE MIDIO POR DESAPARICION DE SUSTRATO. LAS CONDICIONES SON LAS MISMAS DE LAS FIGURAS 12 y 13.

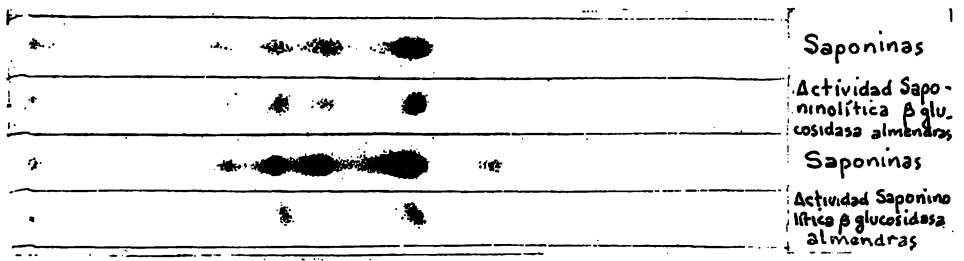


FIGURA 22: ACTIVIDAD SAPONINOLITICA DE UNA β GLUCOSIDA SA COMERCIAL (Emulsina de Almendras).

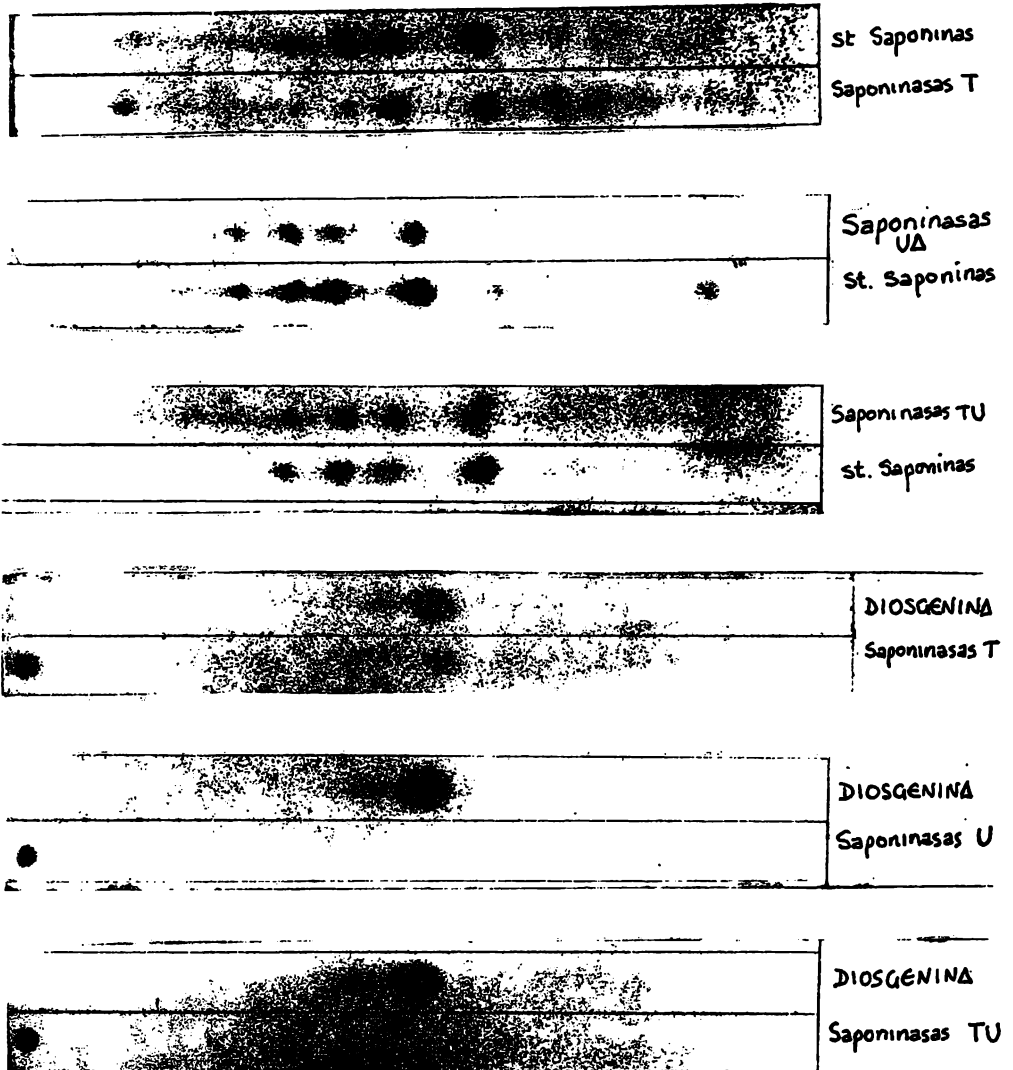


FIGURA 23: EFECTO DE TWEEN 80 Y DE UREA SOBRE LA APARICION DE SAPONASAS DEL HONGO AUREOBASIDIUM SP
LAS CONDICIONES SON LAS DE LA FIGURA 14.

urea, no existe actividad en los filtrados. Se repitió el experimento y se ve un efecto inhibitorio de la urea sobre la producción de saponasas,

C. CARACTERIZACION INICIAL DE LAS SAPONASAS DEL HONGO - AUREOBASIDIUM SP.

1. Actividades Presentes.

Con el fin de caracterizar las enzimas responsables de la liberación de la diosgenina del barbasco y basados en la estructura del enlace que rompían, se decidió medir la actividad saponinolítica por el método de p-nitrofenol- β -D-glucósido. La figura 24 muestra la curva estándar de PNFG.

Se determinó la actividad de β glucosidasa de los filtrados en los que apareció actividad de saponasas en la sección anterior (Medios AB, BB y BBC) con el fin de relacionarla con la actividad saponinolítica. Los resultados se encuentran en la Tabla III. Como se mencionó en las secciones anteriores de este capítulo, la concentración de diosgenina en el medio BBC fue mayor, así como la hidrólisis de las saponinas, lo que podría indicar que la β glucosidasa del hongo, la cual se induce en presencia de celulosa, actúa también sobre las saponinas -- del barbasco. Sin embargo, las saponasas no son las mismas enzimas que la β glucosidasa ya que el filtrado del

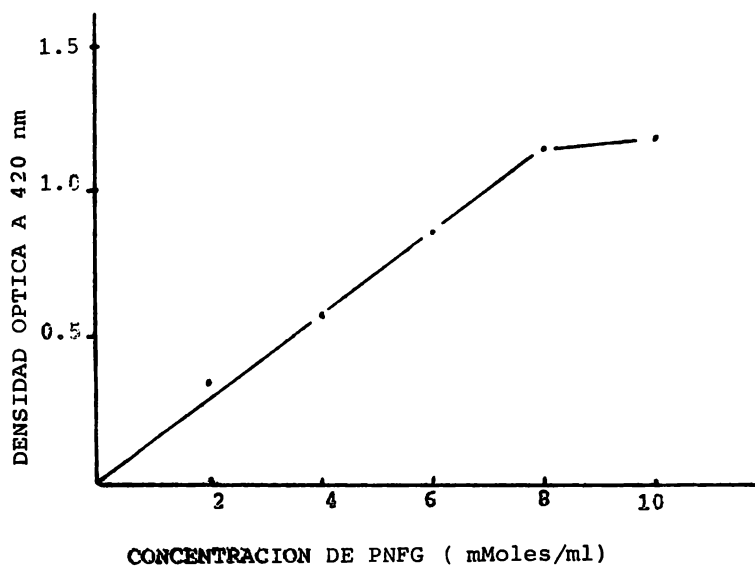


FIGURA 24: CURVA ESTANDAR DE p-NITROFENOLGLUCOSIDO (PNFG)

TABLA III: ACTIVIDAD DE β GLUCOSIDASA DE FILTRADOS DE AUREOBASIDIUM SP CRECIDO EN TRES MEDIOS DIFERENTES^a

MEDIO DE CULTIVO	ACTIVIDAD DE β GLUCOSIDASA (mM/ml/hr.)
AB ^b	0.0
BB ^c	4,2
BBC ^d	12,6

^a: El hongo se creció durante 7 días a 29°C y 200 rpm - de agitación. Al cabo de ese tiempo, se centrifugó - a 7000 rpm y se separó el sobrenadante que fue fil-- trado en membrana millipore de 0.45 μ y en este fil-- trado se determinó la actividad sobre PNFG.

^b: AB: Agua + Harina de Barbasco (Bmm) al 2 %.

^c: BB: Medio B + Harina de Barbasco (Bmm) al 2 %.

^d: BBC: Medio B + Harina de Barbasco (Bmm) al 2 % + - Celulosa microcristalina (Avicel) 0,75 %.

medio AB no presenta actividad de β glucosidasa, pero sí de saponasas.

Una cosa interesante fue el que la emulsina de almendras no presentó actividad saponinolítica, lo que sugiere que la β glucosidasa del hongo Aureobasidium sp es menos específica en cuanto al enlace que hidroliza que las glucosidasas de la emulsina de almendras o que la regulación de las saponasas está asociada a la regulación de la β glucosidasa del hongo.

Se determinó actividad de xilanasas y de pectinasas en los filtrados, pero no hubo actividad.

2. Estudios Cinéticos

Como puede observarse, hasta el momento, todas las determinaciones de actividad saponinolítica y algunas de producción de diosgenina, se habían hecho en forma cualitativa, por cromatografía en placa fina y, en forma cuantitativa, por la determinación del peso de los cristales obtenidos. Este método sólo detecta concentraciones muy grandes de producto. Sin embargo, debido a que la cantidad de diosgenina que se obtiene por la actividad de las saponasas in vitro es muy pequeña, se hizo necesario buscar un método más sensible de determinación de diosgenina y para ello se corrió una curva estándar de nuestro compuesto en el cromatógrafo de gases, determinándose el

área bajo la curva de los picos obtenidos por la inyección de 2 µl de soluciones de distintas concentraciones de diosgenina. En la figura 25 se puede ver la curva estándar de diosgenina, observándose que hay una linealidad hasta una concentración de 5 µg,

Basados en esta curva se cuantificó la actividad saponinolítica de algunos filtrados y se confirmaron los datos obtenidos previamente (Tabla IV),

Posteriormente se iniciaron algunos estudios cinéticos de la actividad saponinolítica de filtrados del hongo Aureobasidium sp crecido en el medio seleccionado para la producción de diosgenina en la primera parte del proyecto.

El primer punto a estudiar fue determinar la curva de progreso de la actividad de saponasas y como se ve en la figura 26, la máxima actividad se obtiene desde las 18 horas hasta las 48 horas, por lo que se escogió un tiempo de 24 horas para seguir determinando la actividad saponinolítica. Esto representó una reducción del tiempo original de reacción en 24 horas.

La actividad original se determinaba en agua, sin control de pH. Con el fin de determinar el pH óptimo de la actividad de las saponasas se probaron una serie de soluciones amortiguadoras con un rango de pH desde 1 has

TABLA IV: ACTIVIDAD DE SAPONASAS DE ALGUNOS FILTRADOS DEL HONGO AUREOBASIDIUM SP.

CONDICION	Actividad de Saponasas (mg de diosgenina/sistema de reacción)
18-8	2.430
SN-8	1.920
AB	2,475
BB	5,050
BBC	8,650
T	2,920
U	0,050
TU	0,250
C	0.000

18-8 Aureobasidium sp en medio de Agua + Harina de Barbasco
(Bmm) al 2 % + Tween 80 al 0.2 % pH inicial de 8.

SN-8 El medio anterior pero sin inocular.

AB, BB y BBC: Medios descritos en las figuras 12 y 13.

T Medio de AB añadido de Tween 80 al 0.2 %

U Medio de AB añadido de Urea al 0,03 %

TU Medio AB + Tween 80 al 0,2 % + Urea al 0,03 %.

C Medio de sales (B) + Celulosa microcristalina al 0,75 %

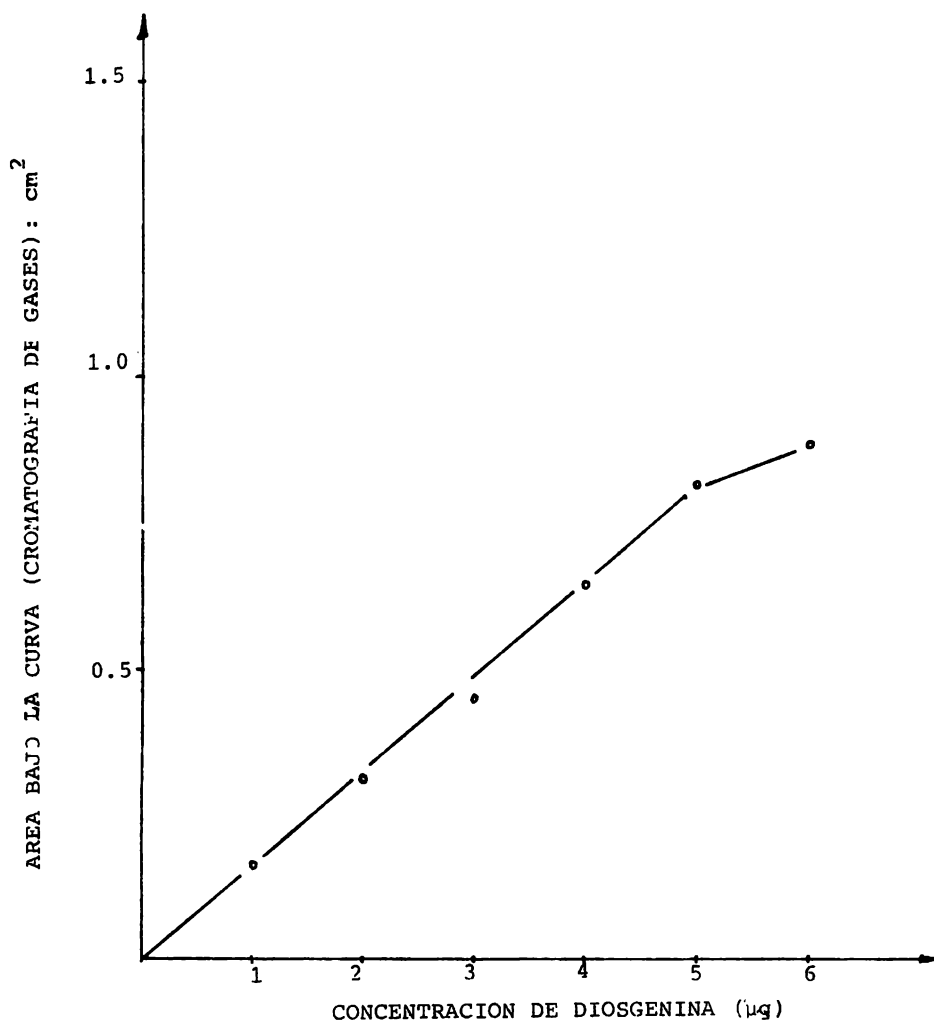


FIGURA 25: CURVA ESTANDAR DE DIOSGENINA POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

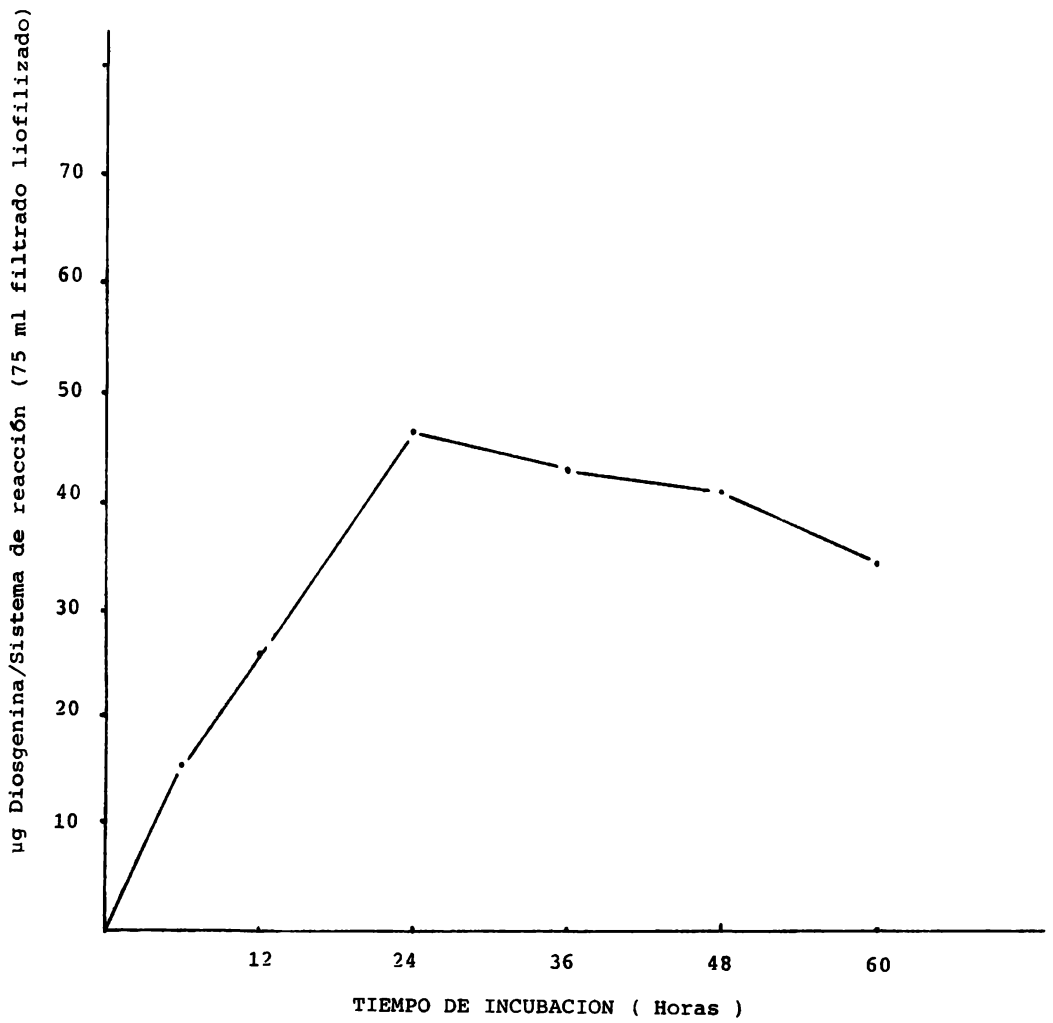


FIGURA 26: CURVA DE PROGRESO DE SAPONASAS

ta 12. Como se ve en la figura 27, el pH óptimo fue de 6. Se hicieron controles de hidrólisis química de las saponinas en los diferentes pH probados para la actividad y en ningún caso hubo hidrólisis a dos temperaturas: 29 y 50°C que son las temperaturas de crecimiento del microorganismo y la utilizada hasta este momento para determinar la actividad saponinolítica.

En el siguiente paso se determinó la temperatura óptima de las saponinas y como se ve en la figura 28, la máxima actividad saponinolítica se obtiene a 45°C, aunque todavía hay buena actividad a 37 y 50°C.

Se determinó la Km aparente total de los filtrados no fraccionados sobre las saponinas y fue de 2,985 mg como puede notarse en la figura 29.

Estas condiciones son importantes para la obtención de la diosgenina residual de la harina de barbasco fermentada pues poniendo los sólidos extraídos con hexano, en presencia de los liofilizados a pH de 6 (solución amortiguadora de citratos 0.1 M) y a 45°C durante 24 horas, es posible recuperar otro 1 % de diosgenina, lo que ya hace competente el método microbiológico con el químico, e incluso puede mejorarse al optimizar las condiciones de fermentación de la harina de barbasco.

3. Fraccionamiento de los Filtrados

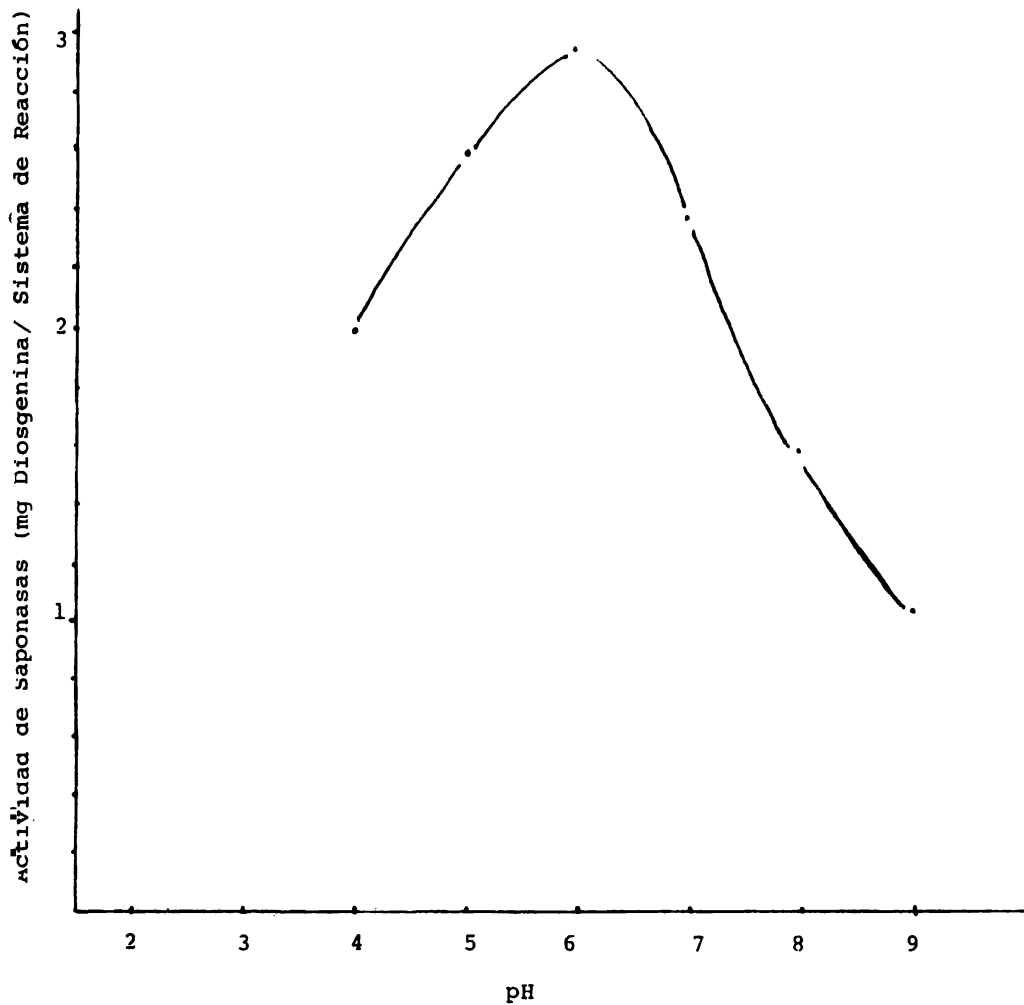


FIGURA 27: EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE SAPONASAS

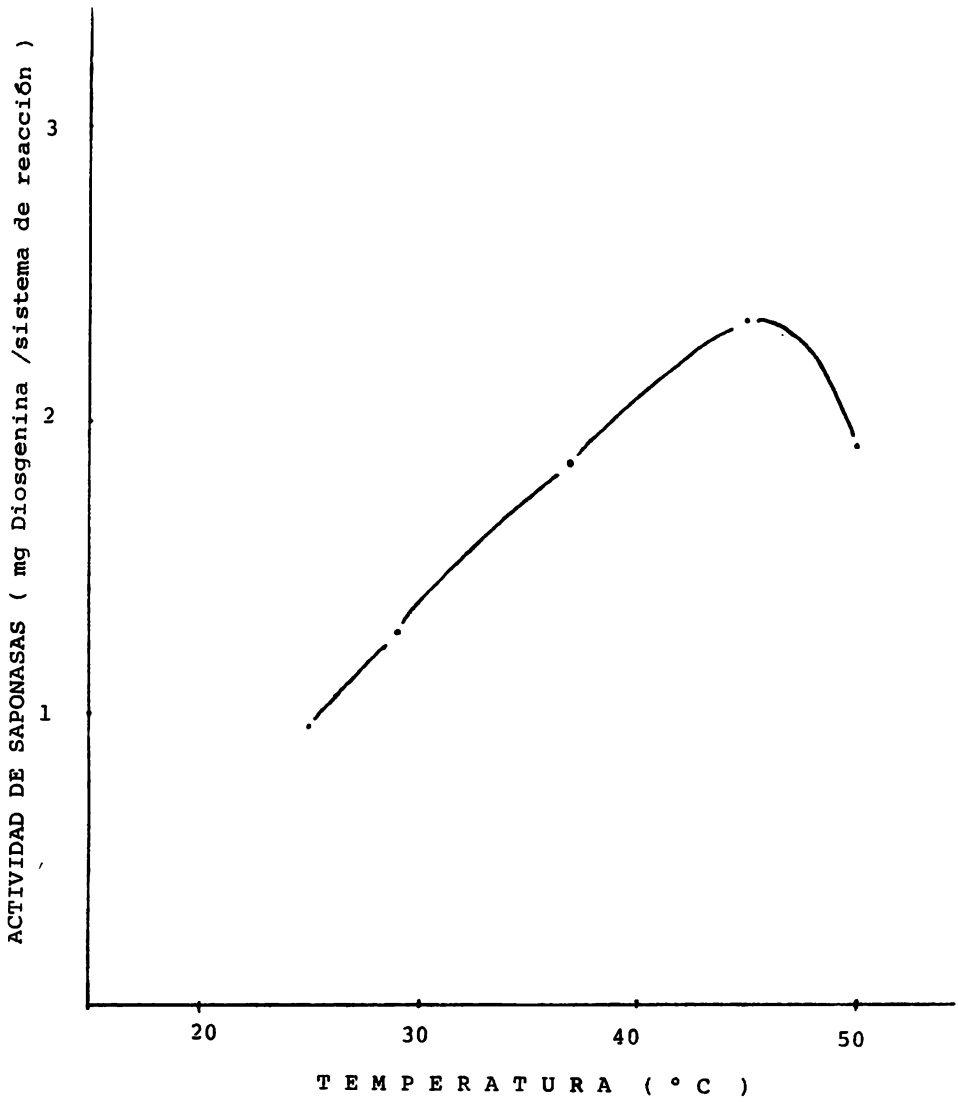


FIGURA 28: EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE SAPONASAS.

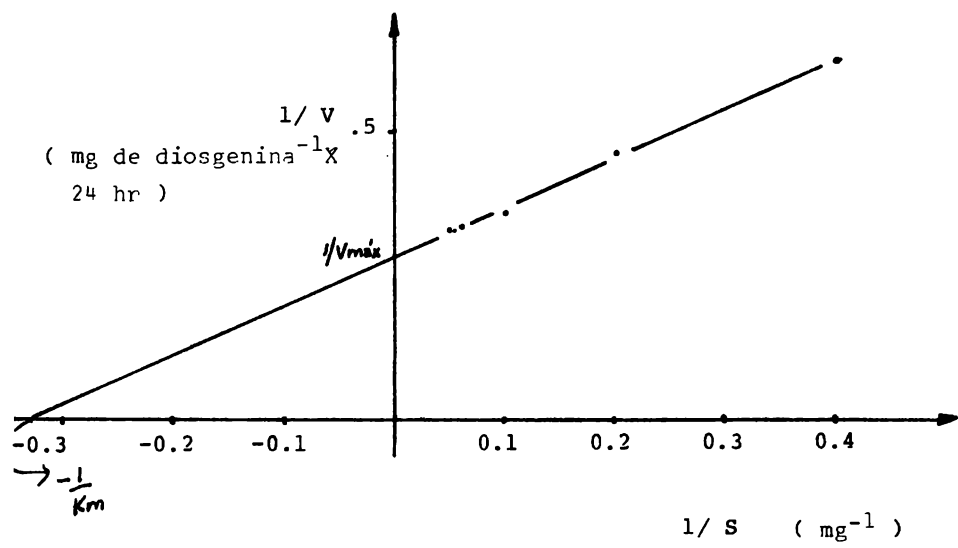
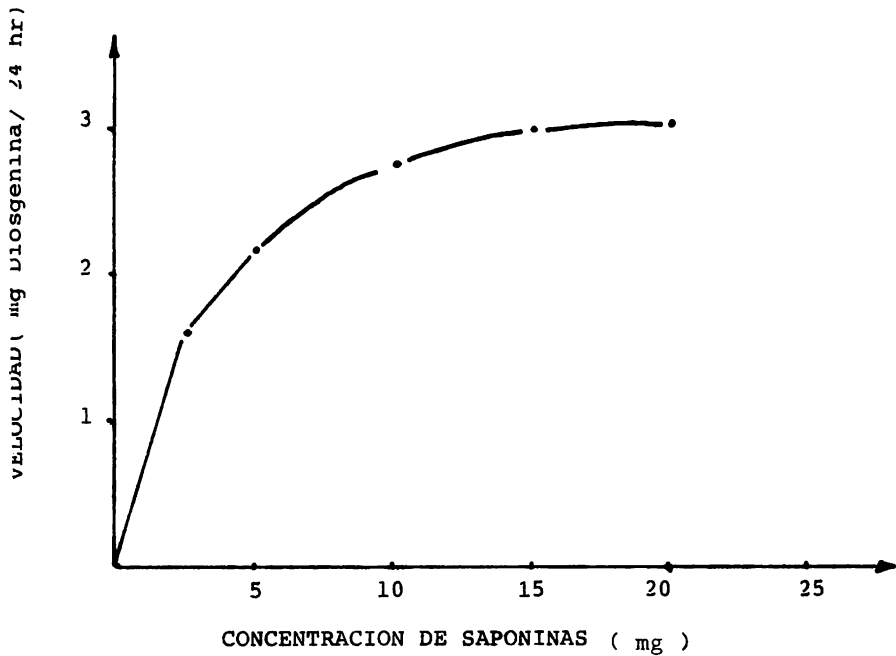


FIGURA 29: EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO (Ex tracto metanólico de Barbasco) SOBRE LA AC TIVIDAD DE SAPONASAS.

En base a los resultados obtenidos de la actividad saponinolítica de los filtrados en diferentes medios de cultivo en los que se vió que había cierta asociación entre la inducción de la β glucosidasa y la de las saponasas, se pensó conocer un poco más de los filtrados y ver si era posible que ambas actividades estuvieran en la misma fracción del filtrado o eran proteínas que no co-cromatografiaban.

Se hizo una liofilización para concentrar los filtrados y se resuspendieron en solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH = 6, de tal manera que hay una concentración de proteína de 302,5 μ g/ml (filtrado BB), 392 μ g/ml (filtrado BBC) y 1,599 mg/ml (filtrado AB). Se fraccionaron 4 ml de cada filtrado en una columna de Sephadex G-25 equilibrada con la misma solución amortiguadora (columna Pharmacia Chemicals de 1,6 X 40 cm con una cama de Sephadex G-25 de 72,4 ml y una velocidad de flujo de 30 ml/hr). Se calibró una columna con dos colorantes de diferente peso molecular (azul dextran y rojo de metilo), para determinar el volumen de exclusión. En la figura 30 se observa el volumen de exclusión del azul dextran en la columna.

Los resultados del fraccionamiento de los filtrados se encuentra en las figuras 31 (filtrado BBC), 32 (fil

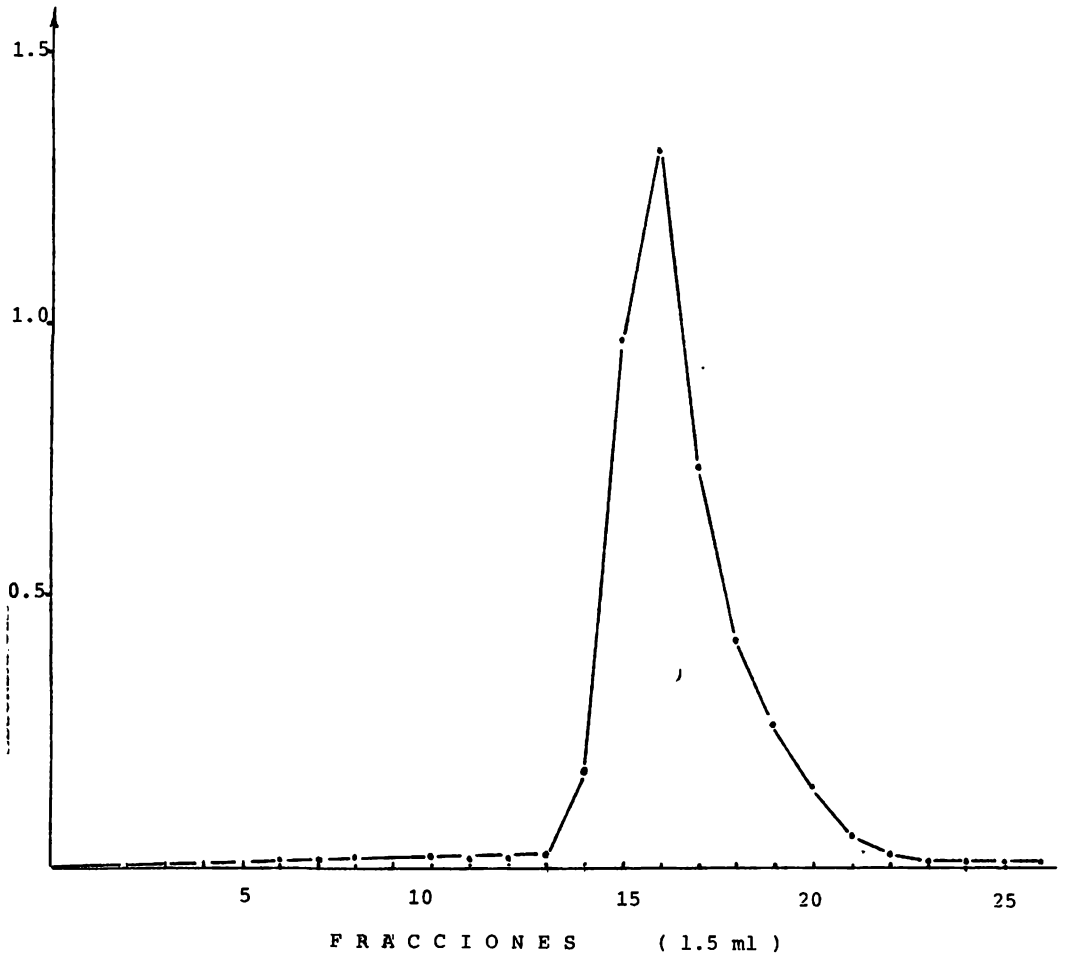


FIGURA 30 : VOLUMEN DE EXCLUSION DE UNA COLUMNA DE SEPHADEX G25.

trado BB) y 33 (filtrado AB),

Como se observa en la figura 31, aparecen dos picos de absorción a 280 nm. El primero sale un poco después - del volumen de exclusión (en las fracciones que siguen al volumen de exclusión) y otro pico en las fracciones- 18 a 32. Un comportamiento similar se observa en el caso del filtrado proveniente del medio BB (Fig. 32), solo que el segundo pico aparece en las fracciones de la 11 a la 20. En el caso del filtrado del medio AB aparece en el volumen de exclusión (Fig. 33).

Debido al volumen tan pequeño de las muestras no se pudo determinar la actividad de saponasas, por lo que se decidió coleccionar todas las fracciones con absorción a -- 280 nm del pico II (en el que aparece la actividad de β glucosidasa) y someterlas a una cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-Sephadex pero no se obtuvo fraccionamiento. Se utilizó otra resina (DE-Celulosa) y tampoco hubo fraccionamiento. Se ha pensado utilizar CM-Sephadex para hacer el fraccionamiento posteriormente.

Se determinó la actividad saponinolítica de las --- fracciones coleccionadas y fue de 2,75 mg de diosgenina/ sistema de reacción, lo que representa el 90 % de la actividad original.

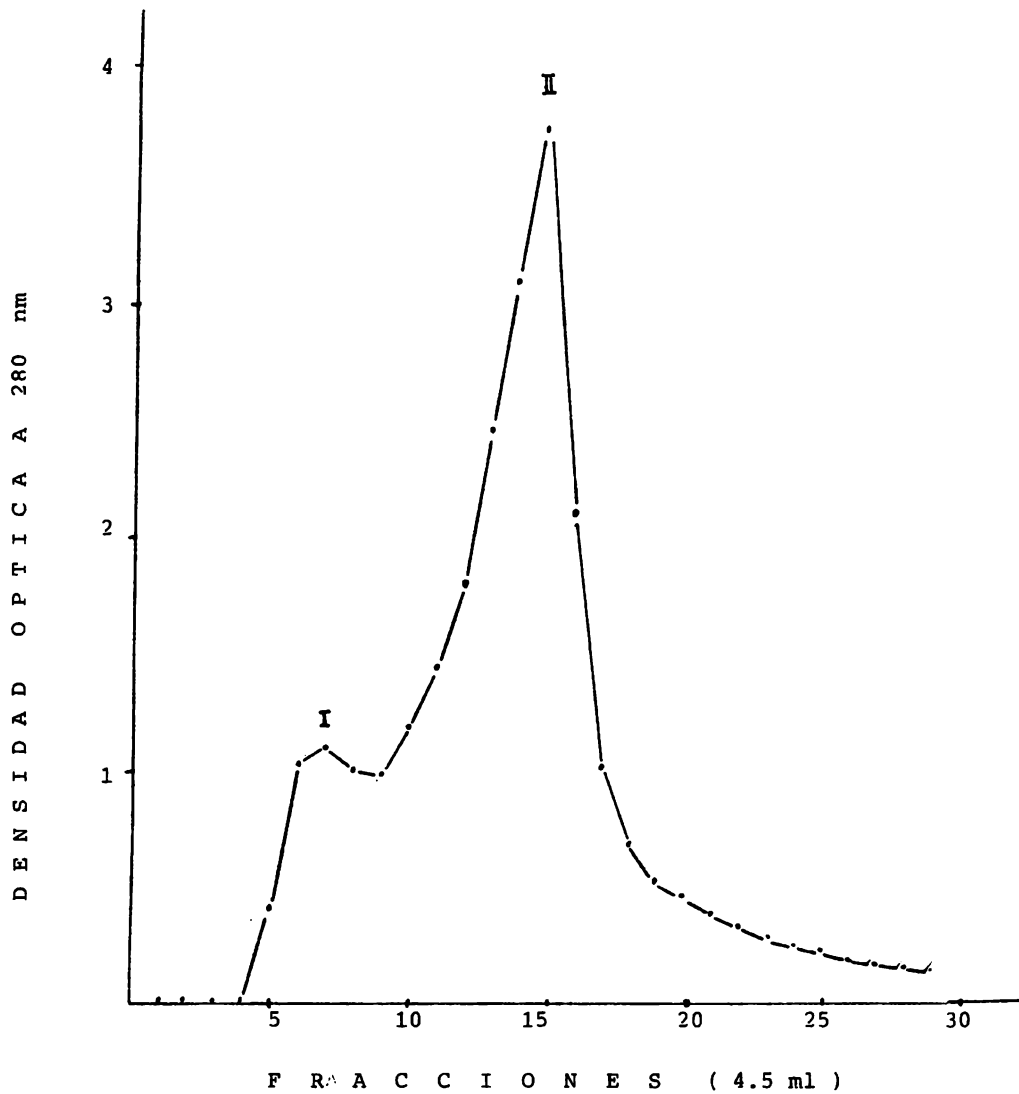


FIGURA 31: FRACCIONAMIENTO DE FILTRADOS DE MEDIO BCC EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G 25

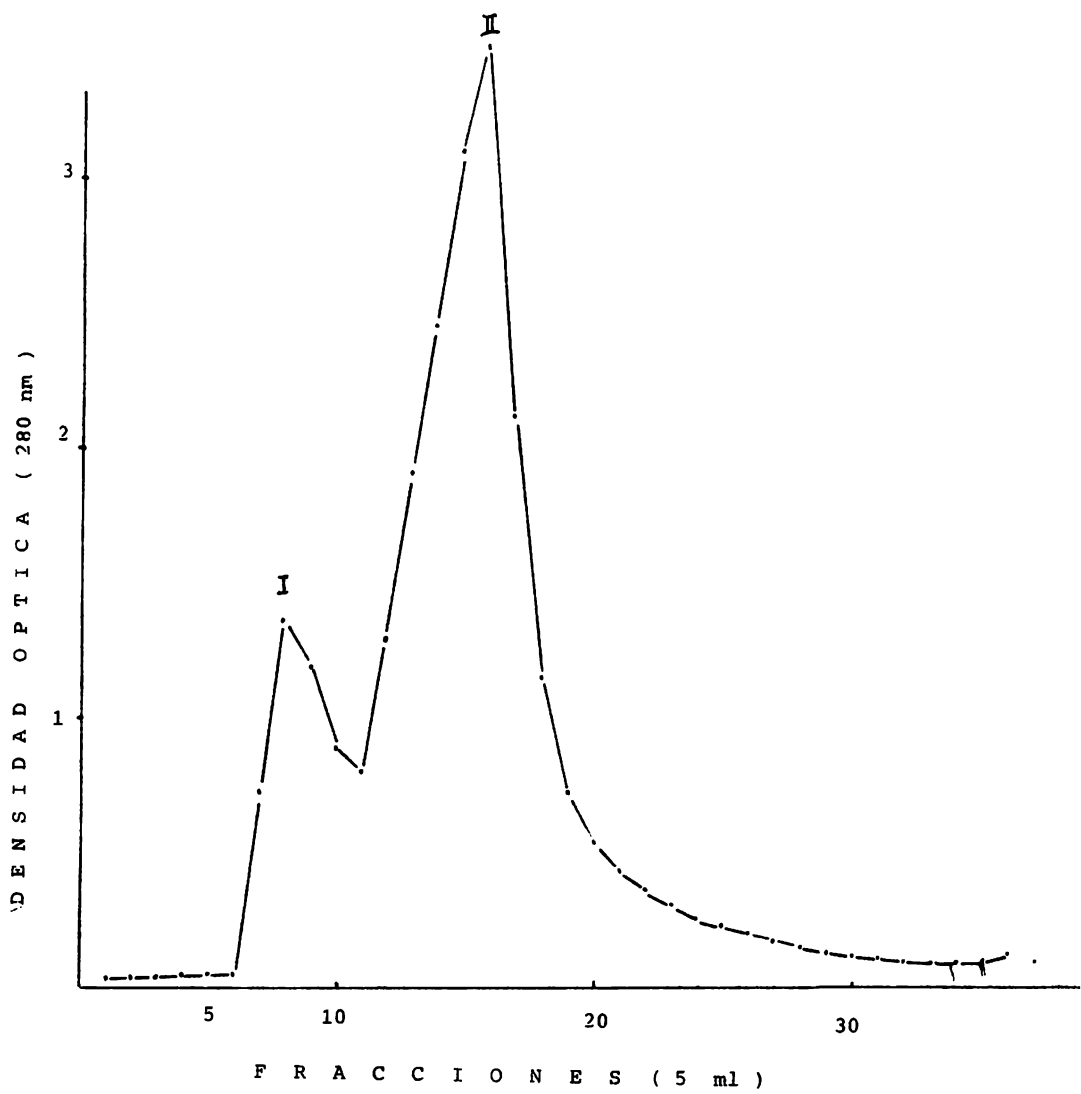


FIGURA 32: FRACCIONAMIENTO DEL FILTRADO DE MEDIO BB EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G 25

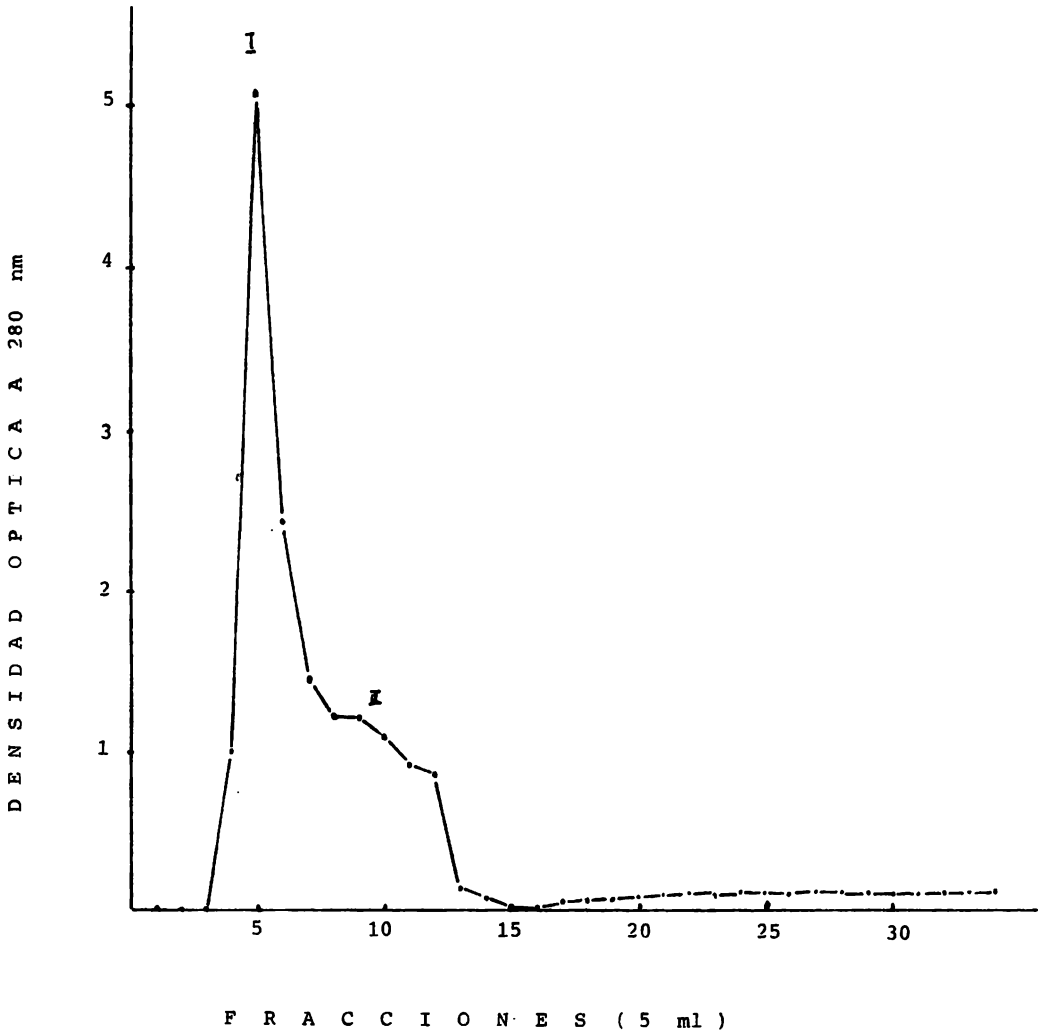


FIGURA 33: FRACCIONAMIENTO DE UN FILTRADO DEL MEDIO AB EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G 25.

Se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida con S,D,S. pero las bandas fueron muy leves a pesar de ser el producto de la liofilización de 50 ml de filtrado original, por lo que se pensó que la cantidad de proteína era muy pequeña, lo que se comprobó por el método de Lowry. Sin embargo, el filtrado original presenta actividad de saponasas.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos puede concluirse que:

Es posible obtener la diosgenina contenida en el barbasco por la hidrólisis microbiana de las saponinas del barbasco, empleando un hongo celulolítico del género Aureobasidium.

La producción de diosgenina se lleva a cabo creciendo al hongo en un medio sencillo que contiene agua + harina de barbasco (Bmm) al 2 % + Tween 80 al 0.2 %, pH inicial de 8, durante 7 días.

Esto representa una ventaja, desde el punto de vista económico, pues los medios reportados en la literatura para la producción de la diosgenina a partir de otras plantas, como agaves y dioscoreas, requieren de sales y compuestos complejos como KH_2PO_4 , NH_4NO_3 y peptona (16 y 17), que aumentan los costos de producción.

Una cosa interesante fue obtener diosgenina en condiciones alcalinas, lo que no ha sido reportado previamente. También es importante notar que las condiciones de esterilidad son necesarias para obtener nuestro producto de interés, pues de otra manera se obtiene diosgenona como Rothrock reportó anteriormente. (17).

La liberación microbiana de la diosgenina del barbasco se encuentra asociada a la aparición de las enzimas que hidrolizan las saponinas del barbasco en función de los siguientes resultados;

1) Sólo en las condiciones de aparición de las saponasas (presencia de barbasco) se obtiene diosgenina

2) Ambas apariciones están inhibidas por la presencia en el medio de cultivo de urea,

3) Ambas se incrementan en presencia de Tween 80.

4) Ambas aumentan en presencia de celulosa microcristalina.

5) Se ven igualmente afectadas por el pH inicial de la fermentación.

6) El tamaño de la partícula de la harina del barbasco, así como su concentración las afectan por igual.

7) Son igualmente afectadas por las condiciones de esterilidad.

Los estudios cinéticos de las saponasas indican que las condiciones óptimas de actividad saponinolítica son 24 horas, pH=6, 45°C. Su Km aparente total es de 2,985-mg y V máx es 3,478 µg de Diosgenina/24 hr.

Al comparar estas condiciones con las reportadas para las saponasas de otros microorganismos como Penicillium y Aspergillus (16), observamos que:

1) El tiempo de hidrólisis es menor en el caso de Aureobasidium sp (24 hrs.) comparado con los otros microorganismos (96 hrs.)

2) Los pH óptimos son similares para los tres microorganismos y caen en el rango de 5,5 a 6,0.

Debido a que no pudo ser fraccionado el filtrado - en DEAE-Sephadex proponemos que se trata de un filtrado con carga positiva y esto coincide con lo reportado para la β glucosidasa específica para esteroides por Mellor y Layne (24) que fue purificada por filtración - en carboximetilcelulosa (CMC).

Los estudios presentados parecen indicar que la actividad de saponasas está asociada a la de β glucosidasa del hongo, aunque falta hacer estudios más profundos que lo confirmen.

Por todo lo anterior, creemos que será necesario - hacer una caracterización más completa de las saponasas del Aureobasidium sp para saber más de su naturaleza y regulación, así como de su posible uso en forma pura o en filtrados (tanto los provenientes de un solo microorganismo como de más de un microorganismo con actividades saponinolíticas complementarias, es decir, que hidrolizan las saponinas que Aureobasidium sp no hidroliza), con el fin de liberar toda la diosgenina presente en el

B I B L I O G R A F I A

1. Asociación de Fabricantes de Esteroides, A.C.
Nov. 1974. La Industria de las Hormonas Esteroides en México.
2. Marker, R.E., D.L. Turner, R.B. Warner & P.R. Ulshafer.
J. Am. Chem. Soc, 63: 772 (1940).
3. Marker R.E., D.L. Turner, R.B. Warner & P.R. Ulshafer.
J. Am. Chem. Soc. 63: 774 (1940).
4. Marker R.E., D.L. Turner & P.R. Ulshafer.
J. Am. Chem. Soc. 64: 1655 (1942).
5. Kawasaki, T., T. Yamauchi.
Chem. Pharm. Bull. Japan 16: 1070 (1968).
6. Espejo, O., J. Campos-LLavot, H. Jung, F. Giral.
Phytochem. 21: 413 (1982).
7. Klyne, W.
Química de los Esteroides.
Compañía Editorial Continental, Nueva York (1970),
8. Guyton, A.C.
Tratado de Fisiología Médica,
Editorial Interamericana, S.A., 5a. Edición (1978),
México.
9. Malacara, J.M., M. García Viveros, C. Valverde.
Fundamentos de Endocrinología Clínica.
La Prensa Médica Mexicana, 3a. Edición (1980), México.

10. Stryer, L.
Biochemistry,
W.H. Freeman & Co. 1a. Edición (1975) San Francisco,
11. Aharonowitz, Y. & G. Cohen.
Investigación y Ciencia, Versión en español de Sci. Am. 62: Nov. 1981.
12. El Barbasco Mexicano. Condiciones y Perspectivas - para su Aprovechamiento. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. (1981).
13. Campos LLavot, J.
Tesis " Glucósidos de Dioscorea composita"
Facultad de Química. U.N.A.M., México, D.F. (1977)
14. Manual de Procedimientos: Extracción de Sapogeninas PROQUIVEMEX.
15. Krider, M.M., M.E. Wall
J. Am. Chem. Soc. 76: 2938 (1954).
16. Krider, M.M., T.C. Cordon & M.E. Wall.
J. Am. Chem. Soc. 76: 3515 (1954).
17. Rothrock, J.W.
Arch. Biochem. Biophys. 57: 151 (1955).
18. Kawasaki, T., T. Yamauchi,
Chem. Pharm. Bull. 13: 435 (1965),
19. Hermann, I., K.R.H. Repke,
Acta Microbiol., Acad. Sci, 22: 481 (1975).

20. Rumyantseva, G.N., K.A. Kalugants, D.A. Volosheva
M.A. Radionova, S.S. Shaïn.
Prikl. Biokhem. Mikrobiol. 13: 235 (1977),
21. Nagai, Y., M. Sawai, Y. Kurosawa,
Nippon Nogeï Kagaku Kaishi 44: 15 (1970),
22. González B.P., A. Cea, A. Gilbón, J.E. Herz & C.
Huitrón.
184th National American Chemical Society Meeting.
Kansas City, MO. U.S.A. Septiembre 12-17, (1980),
23. Pigman, W.W. Editor.
Specificity, Classification and Mechanism of Action
of the Glycosidases. (1950),
24. Mellor, J.D. & D. S. Layne,
J. Biol. Chem. 249: 361 (1974),
25. Mandels, M.
Biotechnol. & Bioeng. Symp. No. 5: 81 (1975).
26. Lowry, O.H., M.J. Rosenbrough, A.L. Farr & R.J.
Randall.
J. Biol. Chem. 193: 256 (1951),
27. Mandels, M., R. Andreotti & C. Roche.
Biotech. & Bioeng. Symp. No. 6: 21 (1976).
28. Sternberg, D. & S. Dorval,
Biotech. & Bioeng. XXI: 181 (1979),
29. Laemli, U.K.
Nature 227: 680 (1979),

30. Larios, G.
Tesis para obtener el grado de M, en IBB, C.C.H.
U.N.A.M., México, D.F. 1981.
31. Gilbón, A.
Tesis para obtener el grado de M, en IBB, C.C.H.
U.N.A.M., México, D.F. 1980.
32. Simon, W., T. Clerc.
Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por
Métodos Espectroscópicos.
Editorial Alhambra, S.A. 1a. Edición (1970), Madrid