

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

**TESIS**

**PRODUCCIÓN DE PECTINASAS Y OBTENCIÓN DE  
ANTICUERPOS PARA LA LOCALIZACIÓN DE ENZIMAS EN  
*Aspergillus sp.* FP-500.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**PRESENTA**

Irene Rivera del Rio

México D.F. 2005



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

m 343982



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Jurado asignado**

<b>Presidente</b>	<b>Prof. María del Pilar Granada Macias</b>
<b>Vocal</b>	<b>Prof. María Antonieta Silva Chávez</b>
<b>Secretario</b>	<b>Prof. José Guillermo de J. Aguilar Osorio</b>
<b>1° suplente</b>	<b>Prof. Mireya Rodríguez Penagos</b>
<b>2° suplente</b>	<b>Prof. Gloria Díaz Ruiz</b>

## **Sitio donde se desarrollo el tema**

**Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos  
Departamento de Alimentos y Biotecnología  
Conjunto E  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México.**

## **Asesor del tema**



**Dr. José Guillermo Aguilar Osorio**

## **Supervisor técnico**



**E. Blanca Trejo Aguilar**

## **Sustentante**



**Irene Rivera del Río**

**El presente trabajo se desarrollo con el apoyo del Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación", periodo 2003-2004 de la Facultad de Química, Coordinación de Superación Académica y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) UNAM, proyectos IN219604 y IN207603**

**Dedicado con todo mi amor y admiración  
A mis padres y hermana**

## **Reconocimientos**

### **Dr. Guillermo Aguilar**

No encuentro palabras para agradecerle tantas enseñanzas, el apoyo incondicional que recibí a lo largo de este camino.

### **Blanca Trejo**

Gracias por tu paciencia, por transmitirme tus conocimientos y tu gran pasión por el trabajo, sin tu guía este trabajo no hubiera sido posible.

### **Perla, Helena, Kari, Melissa, Carlos, Auro, Sandra**

Gracias por su apoyo y amistad, por escucharme cuando lo necesité. Sin su gran labor y ayuda no hubiera podido concluir esta etapa académica.

### **Maestra Antonieta y Maestra Pilar**

Les agradezco el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios.

## **Agradecimientos y dedicatoria**

### **A mis papás Irene y Hernán**

**Mamá**, eres el pilar de nuestra familia, mi maestra, mi admiración, mi amiga, mi ejemplo, gracias por todas las noches en vela, por las tardes de estudio, por tus virtudes, por tu amor, por tus cuidados, por tu pasión en todo lo que haces. Te quiero mucho

**Papá**, el líder de nuestra familia, mi ejemplo, mi guía, gracias por transmitirme tu enorme sabiduría, por inculcarme valores tan sólidos, por tu infinito amor, por el apoyo en esas madrugadas de estudio, por el interminable consejo.

Gracias por la educación y los valores que me han inculcado, por todo su esfuerzo, por sus regaños, por sus reconocimientos, por sus consejos, por su confianza. En resumen gracias por ser mis papás. Hoy celebramos el esfuerzo que los tres hemos hecho por 23 años... Los amo.

**Andrea**, gracias por todo tu amor, por enseñarme tantas cosas, por tu consejo que siempre me saca de problemas, por tu alegría. De las cosas que más admiro de ti es tu independencia, el gran amor que nos tienes, tu dedicación, tu inteligencia, tienes un corazón enorme, nunca lo pierdas. Muchas gracias por estar conmigo en las buenas y las malas. Te quiero muchísimo.

**Gabriel**, mi compañero en el camino, mi cómplice, gracias por tu amor incondicional, tu apoyo, tu cariño, tu amistad, tu sinceridad, tu consejo, tu apoyo. Gracias por permitirme compartir tus alegrías, tus tristezas, tus logros, tus fracasos, tus ilusiones, tu proyecto de vida. Eres una parte muy importante de la culminación de este logro.

**Abuelos, Luis y Sara** dedicado a ustedes donde quiera que estén, siguen con nosotros a través de sus enseñanzas y valores. **Irene y Mario** gracias por su gran cariño, apoyo y educación. A través de mi papá y mi mamá han forjado nuestra familia. **Rosa María**, gracias por tanto amor.

**Ivonne**, tu me dedicaste tu tesis, ahora yo te dedico la mía, gracias por todo tu cariño. A **Ivette, Ricardo, Enrique, María Laura, Tío Luis**, donde quiera que estés, **Tía Maye, Mónica, mi madrina Marilupe, Julio, Alejandro**, gracias por su amistad, consejo, sus atenciones, tienen un lugar muy especial en mi corazón.

Mis primos **Capullo, Claudia, Mayra, Priscila, Natalia, David, Ricardo, Aline, Julio, Cristina, Javier, Ian, Ania, Juanito**, muchas gracias por esa alegría y amor.

Mis grandes amigos y colegas **Malena, Lorena, Oliver, Alberto, Rubén, Aarón, Job, Mariana (Sra.)** su amistad es de lo más valioso que me llevo de la Facultad, sin su apoyo y ayuda durante la carrera no estaría escribiendo estas líneas. **Lorena**, tu sabes que a parte de ser un muy buen equipo de trabajo somos grandes amigas, espero que siempre sea así, gracias por todo el apoyo durante la carrera pero sobre todo gracias por tu invaluable amistad. **Malenos**, recuerda la gran admiración que te tengo, muchas gracias por tu amistad y por tu apoyo incondicional en todo momento, créeme que es recíproco. **Oliver**, gracias por tu amistad y por tus atinados consejos. **Rubén**, cuántos momentos divertidos compartimos, espero que nuestra amistad siga a través del tiempo. **Alberto**, gracias por tu amistad y por ese sentido del humor. **Aarón**, tu amistad fue una de las cosas más importantes en la carrera, gracias por esos momentos tan divertidos y por escucharme siempre que lo he necesitado. **Job**, tu fortaleza y tu alegría de vivir son de las cosas que más admiro de ti, gracias por enseñarme tantas cosas. **Mariana**, muchas gracias por escucharme siempre que lo necesité.

**Mariana (Babe), Mauricio Pardo, Lucía, Iren**, muchas gracias por ser tan buenos amigos, gracias por tantos momentos que hemos vivido y que nos faltan. Los quiero mucho.

A mis maestros que desde niña me motivaron a adquirir conocimiento, sin su dedicación y esfuerzo, no estaría aquí. Una mención especial a mis maestros de la carrera, que todos me proveyeron de las herramientas para defenderme en esta agitada vida profesional, en especial mis maestros **José Antonio Chamizo, Benjamín Ruiz, María del Rayo Salinas**, que no solo tuve la oportunidad de conocerlos como maestros sino también como personas. A la **Facultad de Química** y a la **UNAM** por el conocimiento que me brindaron y todas las valiosas que conocí durante mi estancia.

A **George Millili, Oscar Rivera y Miguel Ángel Jara**, gracias por la gran oportunidad de colaborar con Merck Sharp and Dohme, gracias por el invaluable apoyo que recibí para concluir este trabajo, gracias por confiar en mí. Miguel Ángel, te agradezco especialmente el seguimiento que le diste a este trabajo, gracias por la oportunidad de seguir aprendiendo. Oscar, muchas gracias por confiar en mí y por todos los consejos que me has dado.



<b>Introducción .....</b>	<b>9</b>
<b>I. Marco Teórico .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Generalidades sobre pectina .....</b>	<b>10</b>
1.1 La pared celular vegetal .....	10
1.2 Pectina .....	11
1.2.1 Composición química y estructura de la pectina .....	12
1.2.1.1 Ornamentación del Homogalacturonano .....	13
1.2.1.2 Ornamentación del Ramnogalacturonano I .....	13
1.2.1.3 Grado de metilación .....	15
1.2.2 Propiedades y aplicaciones comerciales .....	16
1.3 Degradación de pectina .....	17
1.3.1 Endopoligalacturonasa .....	20
1.3.2 Aplicaciones industriales de las pectinasas .....	21
<b>2. Generalidades sobre hongos filamentosos .....</b>	<b>23</b>
2.1 El Micelio .....	23
2.2 La Espora .....	24
2.3 La pared celular .....	25
2.4 Fermentaciones de hongos filamentosos .....	25
<b>3. El género <i>Aspergillus</i> .....</b>	<b>28</b>
3.1 Pectinasas presentes en el género <i>Aspergillus</i> .....	31
3.2 Inmunoquímica de la pared celular de <i>Aspergillus</i> .....	33
<b>II. Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>1. Objetivo .....</b>	<b>35</b>
1.1 Objetivos particulares .....	35
<b>III. Materiales y Métodos .....</b>	<b>36</b>
<b>1. Microorganismos .....</b>	<b>36</b>
1.1 Inóculo .....	36
<b>2. Medios y condiciones de cultivo .....</b>	<b>36</b>

<b>3. Determinación de biomasa</b>	<b>37</b>
<b>4. Determinación de azúcares reductores</b>	<b>37</b>
<b>5. Determinación de la actividad enzimática</b>	<b>38</b>
<b>6. Determinación de proteína</b>	<b>38</b>
<b>7. Fraccionamiento del filtrado enzimático por cromatografía de intercambio iónico</b>	<b>38</b>
<b>8. Determinación de la actividad enzimática a diferentes pH y temperatura</b>	<b>39</b>
<b>9. Electroforesis desnaturalizante (SDS-Page)</b>	<b>39</b>
<b>10. Determinación de actividad enzimática "in situ" sobre gel de SDS-Page (zimograma)</b>	<b>40</b>
<b>11. Obtención de anticuerpos</b>	<b>40</b>
<b>12. Prueba de especificidad de anticuerpos</b>	<b>41</b>
12.1 Doble inmunodifusión radial u Ouchterlony	41
12.1.1. Ruptura de esporas	41
12.2 Inmunoblot	42
<b>IV. Resultados y Discusión</b>	<b>43</b>
<b>1. Determinación de tipo de inóculo y fuente de carbono</b>	<b>43</b>
<b>2. Fermentación en diferentes fuentes de carbono</b>	<b>48</b>
<b>3. Fraccionamiento</b>	<b>53</b>
3.1 Perfil electroforético y zimograma	57
3.2 Determinación de la actividad de la enzima a diferentes pH y temperatura	59
<b>4. Inmunoquímica</b>	<b>62</b>
4.1 Obtención de anticuerpos policlonales de conejos	62
4.2 Ensayo de doble inmunodifusión radial u Ouchterlony	62
4.3 Inmunoblot	64
<b>V. Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>VI. Bibliografía</b>	<b>68</b>

La Biotecnología microbiana se define como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos. Se basa en diversas herramientas para explorar y explotar la biodiversidad natural de los microorganismos y sus amplias capacidades metabólicas. Esta disciplina incluye en su campo de estudio la remediación del medio ambiente, identificación de aplicaciones industriales asociadas a procesos productivos, el uso de métodos moleculares y genéticos que potencialmente pueden mejorar la calidad de vida del ser humano, entre otros.

La aplicación de enzimas en la industria constituye una de las aportaciones más recientes en las tecnologías de producción, debido a su elevada eficiencia catalítica, a que su uso no daña el medio ambiente y a su alta rentabilidad económica (Cherry et al, 2003).

En los últimos años ha aumentado de forma importante la aplicación de enzimas microbianas en la industria (Cherry et al, 2003). La mayoría de estas enzimas son degradadoras de polisacáridos de pared celular vegetal como celulosas, hemicelulosas y pectinas, sintetizadas por *Aspergillus* y otros microorganismos ya sean patógenos o saprófitos de plantas. La aplicación industrial de las pectinasas incluye a los sectores textiles, alimenticios, farmacéuticos, agrarios (Alkota et al, 1997; Hoondal et al, 2002), entre otros. *Aspergillus* es el principal productor de enzimas pectinolíticas.

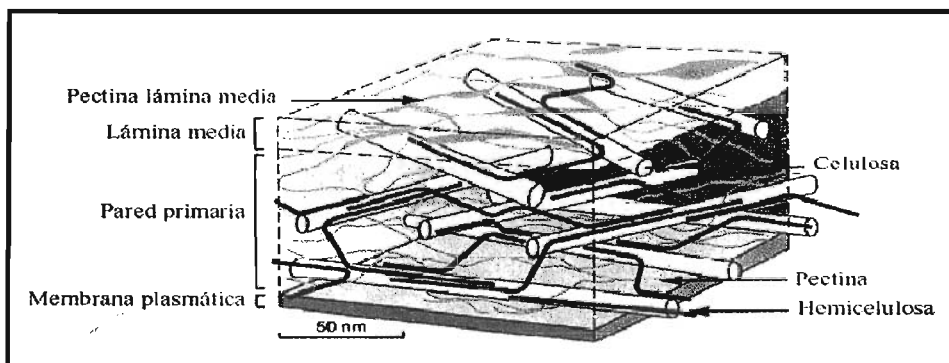
El objetivo del presente trabajo es la caracterización del sistema pectinolítico, el aislamiento y purificación parcial de una endopoligalacturonasa y la obtención de anticuerpos contra diferentes estructuras celulares (esporas y micelio) y enzimas extracelulares degradadoras de pectina, con el fin de enriquecer el estudio de la fisiología de *Aspergillus*.

### 1. Generalidades sobre pectina

#### 1.1 La pared celular vegetal

Las células vegetales están rodeadas de una estructura rígida, la pared celular, ubicada justo sobre la membrana celular. Esta estructura le confiere a la planta forma y soporte, ayuda a regular procesos fisiológicos (incluyendo respuestas químicas defensa) y actúa como barrera física contra la invasión de patógenos. Químicamente esta compuesta de una compleja mezcla de carbohidratos, lignina y proteínas (Goodwin y Mercer, 1990; McCann *et al*, 2001; Vries y Visser, 2001).

La pared celular de plantas se compone de tres capas: lámina media, pared primaria y pared secundaria (Figura 1). La lámina media es la capa más externa, formada principalmente por polisacáridos pécticos, su función principal es el mantener la unión entre las células adyacentes (McCann *et al*, 1995). La siguiente capa es la pared primaria formada principalmente por celulosa. Posteriormente se puede encontrar la pared secundaria que básicamente consiste de tres capas de microfibrillas de celulosa embebidas en lignina y hemicelulosa, es la estructura más gruesa y con mayor resistencia y rigidez.



**Figura 1.** Representación esquemática de la pared celular vegetal

Los polisacáridos constituyentes de la pared celular de las plantas, son los compuestos orgánicos más comunes en la naturaleza. Se pueden dividir en tres grupos por sus unidades monoméricas y su estructura, dichos grupos son: celulosa, hemicelulosa y pectina. La celulosa es un polisacárido de

cadena lineal compuesto de monómeros de D-glucosa con uniones  $\beta$ -1,4. Es el polisacárido más abundante y su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular vegetal, forma microfibrillas que forman una estructura cristalina con cadenas orientadas paralela y antiparalelamente. El grupo de las hemicelulosas constituye el segundo grupo de polisacáridos más abundante, son polisacáridos heterogéneos, es decir los monómeros que lo constituyen son D-xilosas, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, que se arreglan como una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas. La pectina es una mezcla compleja de polímeros neutros y ácidos. Algunos polisacáridos pécticos son el galacturonano, ramnogalacturonano I ramnogalacturonano II, galactano y arabinano (Vries y Visser, 2001).

### **1.2 Pectina**

La pectina es una mezcla compleja de polisacáridos, localizada en los tejidos vegetales, específicamente en la lámina media, confiriendo rigidez, actuando como sustancia cementante intercelular (Baduí, 1988; May, 1992). Constituye un tercio del peso seco de la pared celular de plantas, es decir, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Así mismo, la pectina esta involucrada en la textura y maduración de los frutos. Como una definición general se considera a la pectina como un polisacárido ácido complejo de naturaleza coloidal que contiene un esqueleto de ácido galacturónico que en ciertas regiones se encuentra sustituido por ramnosa y otras cadenas ramificadas de diversos monosacáridos.

Se pueden encontrar en la naturaleza distintas sustancias pécticas (Charley, 1987):

- a. Protopectina: se encuentra en los tejidos vegetales inmaduros. La mayoría de los carbonos carboxílicos de los residuos de ácido galacturónico se encuentran esterificados con radicales metilo a lo largo de toda la cadena. Su composición química exacta se desconoce. Es insoluble en agua.
- b. Pectina o ácido pectínico: presenta un grado de esterificación menor, sin embargo se pueden encontrar como pectina de alta esterificación (cuando poseen entre un 50% a un 85% de esterificación) o como de baja esterificación (menos del 50% de homogalacturonatos esterificados). Presentan mayor solubilidad que la protopectina.
- c. Ácidos pécticos: los grupos carboxilo del ácido homogalacturónico no se encuentran esterificados, formando entonces sales o pectatos con iones bivalentes como el Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y el Magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

## Generalidades sobre pectina

La proporción de protopectinas, pectinas y pectatos en los tejidos vegetales varía según la madurez de la planta. La pectina es una mezcla amplia de sustancias pécticas de diferente composición que contiene como principal componente ácido pectínico. La pectina en su forma nativa se localiza en la pared celular y puede estar entrecruzada con otros polisacáridos estructurales y proteínas para formar protopectina insoluble.

La distribución de la pectina en la pared celular ha sido determinada a partir del uso de anticuerpos como poderosas herramientas analíticas para la determinación de la localización, la distribución y los cambios estructurales de éste polisacárido durante el desarrollo del tejido y de la célula vegetal (Knox, 1997; Vicre *et al.*, 1999; Willats *et al.*, 1999 y 2000).

### 1.2.1 *Composición química y estructura de la pectina*

La pectina contiene dos tipos de esqueletos covalentemente unidos (Prade, 1999). Por un lado una cadena de ácido galacturónico, denominada homogalacturonano que forma una hélice lineal que contiene unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  (Figura 2). Algunos grupos carboxílicos del ácido galacturónico se encuentran esterificados por metilos en el carbono 6. El segundo esqueleto de la pectina es el llamado ramnogalacturonano I que consiste de dímeros de ácido D-galacturónico unidos por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , unidos a monómeros de L-ramnosa por enlaces  $\alpha(1\rightarrow2)$ . Ambos esqueletos presentan una gran variedad de "decoraciones u ornamentaciones" como por ejemplo esterificaciones del ácido D-galacturónico, cadenas laterales glicosiladas unidas al oxígeno de las posiciones hidroxiladas 2- ó 3- del ácido D-galacturónico o en la posición 4- de la ramnosa.

Por su composición estructural, se han nombrado dos regiones de la pectina. Al esqueleto homogalacturonano se le ha nombrado "región lisa", por su casi nula ramificación, caso contrario al esqueleto de ramnogalacturonano se le ha nombrado "región peluda", por su alta sustitución. Su esquematización se puede apreciar en la Figura 3.

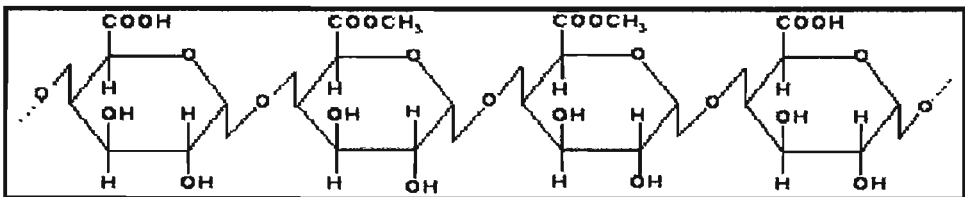


Figura 2. Representación esquemática de la cadena de ácido galacturónico

El número de repeticiones de ácido D-galacturónico y ramnosa es difícil de determinar y varía según el tipo de tejido vegetal que se trate, es por eso que no se cuenta con un cálculo certero del peso molecular de la pectina.

### 1.2.1.1 Ornamentación del Homogalacturonano:

- **Ésteres metílicos:** es un "accesorio" muy estudiado; se trata de metanol esterificado con los grupos carboxilos del homogalacturonano. El grado de metilación varía de planta a planta, de hecho de célula a célula. Se ha sugerido que, en algunos casos, el grado de metilación o de esterificación ocurre al azar y en otros se encuentra perfectamente definido. La actividad enzimática en muchos casos se ve directamente afectada por el grado de esterificación.
- **Ésteres no metílicos:** son ésteres, que provienen de alcoholes diferentes al metanol, los más comunes son los ésteres acetato en las posiciones hidroxiladas 2- y 3- del ácido D-galacturónico en el homogalacturonano.
- **Xilogalacturonano:** la xilosa ha sido reconocida como un componente menor y se concentra en ciertos lugares de la molécula, nombrados xilogalacturonano. La unión con el homogalacturonano se lleva a cabo mediante enlaces  $\beta(1\rightarrow3)$ .
- **Ramnogalacturonano II:** Se trata de una región dentro del homogalacturonano sustituida mayoritariamente por ramnosa, se denomina II para diferenciarla del ramnogalacturonano I que comprende la región "peluda" o el segundo esqueleto. La mayor parte del Boro de las plantas se encuentra concentrado en esta región del homogalacturonano.

### 1.2.1.2 Ornamentaciones del Ramnogalacturonano I:

- **Acetato y metil ésteres:** puede ocurrir la esterificación en las posiciones O2- y O3- del ácido D-galacturónico.

- Azúcares ligados a cadenas laterales: la mayoría de las cadenas laterales en el ramnogalacturonano están unidas a los residuos de ramnosa, unidas en la posición O-4. Estas cadenas laterales son variables en cuanto a su composición y longitud. Los azúcares más comunes son arabinosa y galactosa, en menor proporción fucosa, ácido galacturónico, ácido glucorónico, xilosa y ramnosa.

El entendimiento de la compleja estructura de la pectina ha sido posible, en gran medida, gracias al uso de exopoligalacturonasas, endopoligalacturonasas y liasas que fragmentan el homogalacturonano y el ramnogalacturonano I (Prade, 1999). El conocimiento de la distribución de los ésteres metílicos en el homogalacturonano se ha obtenido por métodos químicos (Mort, 1993) y tratando las paredes celulares, o incluso la pectina aislada, con pectinmetilesterasa, endopoligalacturonasa y endopectinliasa en combinación con espectroscopia de resonancia magnética nuclear (Grasdalen, 1988) y espectrometría de masas (Daas, 1998). Los resultados de estos estudios han demostrado que las preparaciones comerciales de pectina poseen un patrón irregular de metilación en el homogalacturonano a comparación de la pectina que ha sido aislada de paredes celulares. En estudios complementarios, como ya fue mencionado anteriormente, se han desarrollado anticuerpos capaces de reconocer homogalacturonano con diferentes grados de esterificación, otros que reconocen la región del ramnogalacturonano I, entre otros. Estos estudios de inmunolocalización han evidenciado que la estructura y localización de la pectina dentro de la pared celular tiene impacto en el desarrollo y crecimiento de la planta. Así mismo se ha encontrado como conclusión general de diversos estudios en diferentes plantas y frutos que el homogalacturonano sin esterificación se localiza en la lámina media, en las esquinas celulares y en espacios de aire; mientras que el homogalacturonano esterificado se localiza a lo largo de toda la pared celular (McCann *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Match *et al.*, 1998).

En la Figura 3 se presenta una esquematización de los dos esqueletos y las ornamentaciones que presenta cada uno.



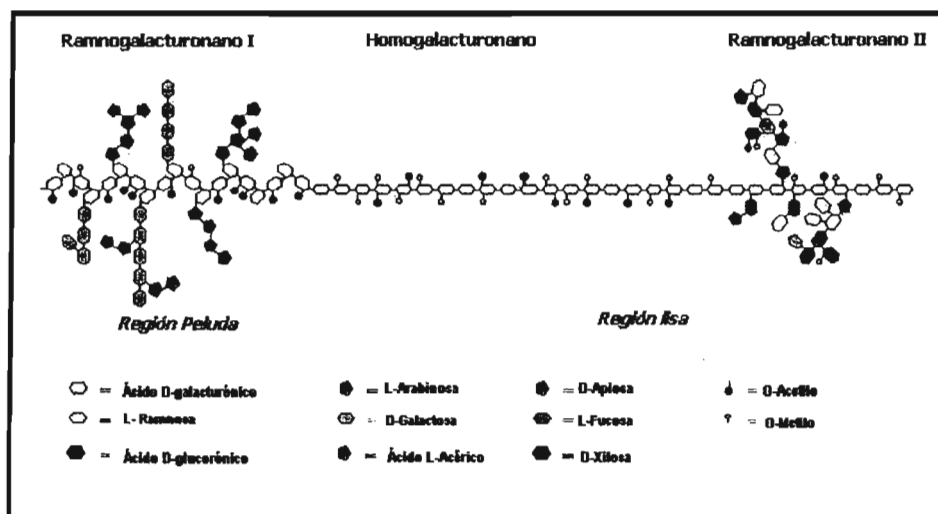


Figura 3. Representación esquematización de la molécula de pectina

### 1.2.1.3 Grado de metilación

Dependiendo del origen de la pectina y del modo de extracción, los grupos carboxílicos de los residuos de ácido galacturónico, presentan un grado variable de esterificación por metanol y pueden estar parcial o completamente neutralizados por iones sodio, potasio o amonio. En ciertas pectinas, adicionalmente, los grupos hidroxilados están parcialmente acetilados (Turquois *et al.*, 2001).

Un factor importante que caracteriza a la pectina es el grado de metilación, definido como el número de moles de metanol por 100 moles de ácido galacturónico. Se considera entonces que el máximo grado de metilación corresponde al 100% de esterificación. De acuerdo a este criterio las pectinas han sido clasificadas en dos grupos, las altamente metiladas, con más de un 50% de esterificación; y las que contienen menos del 50% de esterificación se han clasificado como pectinas de baja metilación. Se pueden encontrar pectinas de alta metilación en la piel de cítricos y manzana. La pectina de baja metilación puede obtenerse comercialmente por desmetilación química.

En general las pectinas de los tejidos vegetales se encuentran entre el 60% a 90% metiladas. El grado de metilación juega un papel muy importante en la firmeza y cohesión de los tejidos (Ridley *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Propiedades y aplicaciones comerciales

La pectina comercial se obtiene a partir de pulpa de manzana y frutos cítricos utilizando ácidos diluidos bajo ciertas condiciones de temperatura y pH para su extracción.

Sus principales propiedades son:

- Forman geles fuertes en presencia de sales o carbohidratos. Los geles formados son estables a intervalos de pH de 2.0 a 3.5 y a concentraciones de sacarosa de 60 a 65%.
- Absorben agua.

La pectina como un constituyente de todas las plantas es parte de la dieta cotidiana del hombre, por lo tanto es considerada como un aditivo de alimentos seguro por la agencia regulatoria de Estados Unidos, FDA (Food and Drug Administration de EUA).

Como otras gomas, la pectina forma soluciones acuosas muy viscosas aun a concentraciones del 1%. Forma geles cuando se encuentra en presencia de azúcares y un ambiente ácido, la formación del gel se lleva a cabo formando redes tridimensionales, en presencia de iones  $H^+$  para neutralizar la carga negativa de la pectina en solución.

La pectina tiene una posición dominante como agente gelificante en jaleas y mermeladas, debido a que se encuentra en gran proporción como constituyente de frutas (fabricación casera de mermelada), por su buena estabilidad a pH ácidos y al calor. El uso de la pectina en jaleas de frutas es una de las aplicaciones más utilizadas industrialmente, se utilizan principalmente pectinas de alto grado de metoxilación y con un alto contenido de azúcar (sólidos solubles por arriba del 60%).

Otro uso comercial que se le ha dado es como estabilizador de la mezcla de jugo y leche, bebidas de leche fermentada esterilizada y otras bebidas de leche ácidas. Las moléculas de caseína de la leche acidificada tienden a formar agregados, especialmente durante el tratamiento térmico, lo que provoca un aspecto arenoso y posteriormente sedimentación; estos efectos se pueden evitar adicionando pectina de alto grado de esterificación (Doesburg *et al.*, 1959). Su función estabilizadora también se ha utilizado para emulsiones aceite en agua de productos cosméticos.

Se han encontrado propiedades terapéuticas como que retardan el vaciamiento gástrico, tienden a reducir el colesterol plasmático al aumentar la conversión de colesterol a ácidos biliares y se han utilizado como antidiarreicos en suspensiones generalmente con caolín.

### 1.3 Degradación de pectina

Los organismos productores de enzimas pectinolíticas incluyen bacterias, levaduras, hongos e incluso se ha encontrado que varios protozoarios, insectos, nemátodos y plantas que las sintetizan (Whitaker, 1991). Los microorganismos sintetizan enzimas pectinolíticas a fin de utilizar la pectina como fuente de carbono, en el caso de las plantas las enzimas pectinolíticas son sintetizadas como parte del desarrollo normal al elongarse durante su crecimiento, al escindir las hojas en los árboles y durante la maduración de los frutos.

La pectina representa una fracción sustancial del total de contenido de carbohidratos del tejido vegetal. Los microorganismos reconocen a las pectinas, bajo una variedad de circunstancias fisiológicas, como una fuente compleja de carbono. Responden eficientemente a la presencia de pectina extracelular por activación de síntesis y secreción de un amplio número de enzimas que efectúan reacciones de modificación, degradación, transporte, asimilación y metabolismo de los residuos de azúcares libres. La degradación completa por pectinasas de la pectina resulta en ácido galacturónico y ramnosa en su fase primaria, y pequeñas cantidades de galactosa, arabinosa, metanol, acetato y otros azúcares como xilosa, fucosa o apiosa, son el resultado de una degradación secundaria, todos los anteriores asimilados y metabolizados para promover el crecimiento vegetativo del microorganismo.

La actividad más importante de las pectinasas, bioquímicamente hablando, es el corte del enlace glucosídico de las pectinas nativas produciendo su despolimerización. Generalmente éstas enzimas involucradas en la despolimerización son extracelulares y sus productos finales son asimilados y metabolizados, es decir los monómeros y dímeros son transportados al citoplasma y degradados por enzimas citoplasmáticas.

Los hongos filamentosos, y en específico *Aspergillus sp.*, sintetizan un arreglo de enzimas tan complejo como lo es la pectina, su sustrato. Se clasifican de acuerdo al sitio en el que actúan, en endo ó exo, endopectinasas si atacan un enlace dentro de la molécula ó exopectinasas si el enlace que atacan se sitúa en los extremos de la cadena; de acuerdo al sustrato que atacan, pectina o pectato.

Las pectinasas también se pueden clasificar en tres tipos principales: esterasas, polimerasas y protopectinasas. Las enzimas esterasas (pectinmetil esterasa) catalizan la desesterificación de los

## Generalidades sobre pectina

grupos metilo de la pectina, es decir liberan metanol del esqueleto homogalacturonano, el producto que se obtiene es ácido poligalacturónico o pectato. Las enzimas despolimerizantes se dividen a su vez en dos tipos, las hidrolasas y las eliminasas; las hidrolasas escinden el enlace glucosídico transfiriendo un protón de un aminoácido donador al oxígeno glucosídico a fin de separar las moléculas consumiendo una molécula de agua, el producto de esta reacción son oligómeros o monómeros, dependiendo del mecanismo exo o endo; las eliminasas, comúnmente llamadas liasas, rompen el enlace glucosídico por eliminación, el protón  $\alpha$  del grupo carbonilo es tomado por un aminoácido básico generando productos oligoméricos o monoméricos insaturados, en este caso el producto es ácido galacturónico con un doble enlace entre las posiciones 4 y 5. Algunos autores han propuesto otra clase de enzimas pectinolíticas, las protopectinasas que convierten la protopectina insoluble en pectina soluble, sin embargo esta clase de pectinasas no es del todo reconocida debido a que la secuencia de genes que codifican para esta proteína en *Trichosporum penicillatum* es muy similar a la secuencia de las endopoligalacturonasas (Igushi *et al.*; 1997), por lo que se cree que se trata de una endopoligalacturonasa con una mayor especificidad hacia la protopectina. En la tabla 1 se puede encontrar la clasificación de las enzimas y su clave EC (Comisión de Enzimas).

Tabla 1. Tipos de pectinasas

Clase	Nombre EC	Nombre común	Clave EC	Sustrato	Modo de acción
Esterasa	Pectin metil esterasa	Pectinesterasa	3.1.1.11	Pectina	Endo
Hidrolasas	Endopoligalacturonasa	Poligalacturonasa	3.2.1.15	Pectato	Endo
	Exopoligalacturonasa 1	Poligalacturonasa	3.2.1.67	Pectato	Exo
	Endopolimetilgalacturonasa	Pectin hidrolasa		Pectina	Endo
	Exopolimetilgalacturonasa	Pectin hidrolasa		Pectina	Exo
Liasas	Endopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.2	Pectato	Endo
	Exopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.9	Pectato	Exo
	Endopolimetilgalacturonato liasa	Pectin liasa	4.2.2.10	Pectina	Endo
	Exopolimetilgalacturonato liasa	Pectin liasa		Pectina	Exo

Las enzimas que degradan al homogalacturonano incluyen a la pectin metil esterasa y la pectin acetil esterasa, la endopoligalacturonasa, exopoligalacturonasa, pectato liasa y pectin liasa.

Las pectin liasas actúan en pectinas altamente metiladas. Las pectatoliasas actúan igual que las pectin liasas pero sobre residuos no esterificados de ácido galacturónico y requieren Caldo para alcanzar su actividad óptima. Ambas enzimas se producen principalmente en hongos filamentosos. La endopectatoliasa rompe la cadena de pectato en sitios internos que como producto resulta una mezcla de oligómeros insaturados, esta enzima comúnmente se encuentra en bacterias fitopatogénicas o saprófitas (Perenicová, 2000).

La pectin metil esterasa remueve grupos metílicos permitiendo la acción de las enzimas despolimerizantes. Así mismo la pectin acetil esterasa remueve los grupos acetilos del homogalacturonano.

Las poligalacturonasas o hidrolasas poli (1,4- $\alpha$ -D-galacturonido) glicano, catalizan el enlace glucosídico  $\alpha(1\rightarrow4)$  del esqueleto de ácido homogalacturónico. Se dividen en dos grupos las endopoligalacturonasas, que azarosamente catalizan la ruptura de los enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  internos en la cadena, generando oligómeros de ácido galacturónico; las enzimas exopoligalacturonasas actúan en el extremo no reductor de la cadena. Las poligalacturonasas son solo activas en regiones no esterificadas.

Las enzimas ramnogalacturonano acetil esterasa, ramnogalacturonano hidrolasa y ramnogalacturonano liasas actúan desacetilando y rompiendo el esqueleto de ramnogalacturonano I (región peluda), comúnmente se encuentran en hongos (Kofod *et al*, 1994; Mutter *et al*, 1994). Las ramnogalacturonasas atacan el esqueleto desacetilado de ramnogalacturonano, produciendo hexámeros o tetrámeros lineales con ramificaciones de galactosa. Otra enzima que degrada el esqueleto ramnogalacturónico es la ramnogalacturonano  $\alpha$ -D-galactopiranosiluronohidrolasa, que libera residuos de ácido galacturónico del extremo no reductor, por su parte la enzima que libera residuos de ramnosa es la ramnogalacturonano  $\alpha$ -D-galactopiranosiluronohidrolasa del extremo no reductor (Vries y Visser, 2001).

Se han encontrado, así mismo, arabinasas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, endo-(1 $\rightarrow$ 5)-  $\alpha$ -L-arabinasas, galactanasas, exo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactanasa y la endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 5)- galactofuronasa.

La actividad de todas éstas enzimas es expresada comúnmente en "unidades" (U). Una manera de definir tal "unidad enzimática de pectinasa" es como la cantidad de enzima que rompe un miliequivalente de enlaces, ya sea éster o glicosídicos, en un minuto, bajo ciertas condiciones experimentales dadas (Kilara y Benchura, 1990), sin embargo algunos autores han propuesto definiciones más pragmáticas adaptadas a los objetos de investigación, por ejemplo, para el caso de la endopoligalacturonasa es frecuente definir una unidad como la cantidad de enzima que disminuye en un 50% la viscosidad de una solución de pectina a cierta concentración, en un volumen y tiempo definidos (Saval, 1985; Aguilar y Huitrón, 1987; Leuchtenberg y Mayer, 1992). El uso de distintas definiciones de actividad enzimática se debe al uso industrial de las preparaciones comerciales de pectinasas, que consisten en mezclas complejas de distintos tipos y cantidades de las pectinasas descritas anteriormente, de modo que resulta complicado medir la actividad enzimática basándose en la actividad de una enzima específica (Kotzekidu, 1991).

### 1.3.1 *Endopoligalacturonasa*

La endopoligalacturonasa, enzima objeto del presente estudio, es una de las enzimas que degradan al homogalacturonano. Al igual que la exopoligalacturonasa, se trata de una enzima extracelular, comúnmente secretada en varias isoformas, sin embargo, algunos autores han reportado la presencia de actividad exopoligalacturónica en conidias y micelio de *Aspergillus sp.* (Aguilar y Huitron, 1993; Kawano *et al.*, 1999).

Las endopoligalacturonasas (así como las exopoligalacturonasas) son activas bajo condiciones de pH ácido y su temperatura óptima es de 50°C, los valores de  $K_m$  son de 0.15 a 5 mg/mL siendo el ácido poligalacturónico su sustrato. Las actividades específicas varían de 8.8 a 7000 U/mg de proteína.

La caracterización fisicoquímica de la endopoligalacturonasa sugiere que existen diferentes genes que la codifican, a partir de una preparación de enzimas pectinolíticas se encontraron distintas clases de enzimas endopectinolíticas, la familia de genes que codifican para ésta enzima se nombra como *pgaX*, X por el tipo de endopoligalacturonasa correspondiente.

A pesar que las endopoligalacturonasas fúngicas comparten un alto grado de similitud entre sus secuencias, sus velocidades de hidrólisis y modo de acción sobre el ácido galacturónico y sustratos oligoméricos pueden presentar cierta variación (Rexová, 1973).

Las endopoligalacturonasas tienen un distinto rol para el organismo que las produce, mientras que organismos saprófitos como *A. niger*, proveen de nutrientes al microorganismo, los microorganismos fitopatogénicos degradan la pared celular de plantas para facilitar la penetración y expandirse a través del tejido vegetal.

### 1.3.2 Aplicaciones Industriales de las pectinasas

Además de la relevancia en la naturaleza que tienen las pectinasas, estas enzimas presentan una gran importancia económica, ya que son utilizadas en muchos procesos industriales, sobre todo en el campo alimentario (Ghildyal *et al*, 1981). En 1995 el volumen de ventas reportado fue de aproximadamente 75 millones de dólares (Kashyap *et al*, 2001).

Desde el punto de vista de su aplicación, las pectinasas pueden clasificarse principalmente en pectinasas ácidas y pectinasas alcalinas. Las pectinasas ácidas provienen principalmente de fuentes fúngicas mientras que las pectinasas alcalinas son biosintetizadas por bacterias como *Bacillus sp*.

Entre las aplicaciones más importantes de las pectinasas ácidas se encuentran:

- a. Clarificación de jugo de frutas y vinos: es el principal uso de las pectinasas. Al extraer los jugos de las frutas frescas por presión, presentan cierta turbiedad y una elevada viscosidad, la aplicación de pectinasas logra disminuir la viscosidad e inducir la floculación de las partículas suspendidas que provocan la turbidez a fin de ser fácilmente separadas del jugo.
- b. Extracción de néctares: las pectinasas son utilizadas para macerar los tejidos vegetales, obteniendo células separadas en suspensión, especialmente utilizados en la manufactura de productos alimenticios (papillas) para bebés. Así mismo se han aprovechado en la producción de néctares de ciertas frutas, como la guayaba, la papaya, el chabacano y el plátano, ya que si las pectinasas se dejan actuar en conjunción con las celulasas el proceso puede llevar prácticamente hasta la licuefacción de los tejidos. Como se puede apreciar, las pectinasas son adecuadas para cierto tipo de frutos tropicales para los cuales no se ha diseñado ningún equipo de extracción de jugos.

## Generalidades sobre pectina

- c. Aumento de rendimiento en la extracción de jugos de cítricos: las pectinasas han sido usadas para aumentar el rendimiento durante la extracción de jugos de ciertos frutos, específicamente del grupo de los cítricos, en los cuales el bagazo que queda después de la acción de la maquinaria de prensado aun contiene un alto porcentaje de jugo y de sólidos solubles.
- d. Uso de desechos agroindustriales y obtención de subproductos: a fin de utilizar los desechos agroindustriales y poderles dar un fin a sus subproductos, con ayuda de las pectinasas se extraen aceites esenciales y pigmentos carotenoides de las cáscaras de los cítricos.

Las pectinasas alcalinas son utilizadas en el campo textil principalmente, en el procesado de fibras vegetales, obtención de fibras de lino (por liberación con hemicelulasas y pectinasas), tratamiento de aguas residuales generadas durante la fabricación de productos cítricos. Otra importante aplicación de este tipo de pectinasas es la purificación de virus de plantas, ya que estas enzimas pueden actuar sobre el tejido infectado y liberar el virus.

A continuación se presentan los principales microorganismos productores de pectinasas microbianas. (Tabla 2).

Tabla 2. Microorganismos productores de enzimas pécticas.

	Productor	Tipo de pectinasa	pH óptimo de actividad
PECTINASAS ÁCIDAS	<i>Aspergillus niger</i>	Endopectinasa	4.5 – 6.0
		Exopectinasa	3.5 – 5.0
	<i>Penicillium frequentans</i>	Endopoligalacturonasa	4.7
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Endopoligalacturonasa	3.5
	<i>Rhizoctonia solana</i>	Endopoligalacturonasa	4.8
	<i>Mucor pusillus</i>	Poligalacturonasa	5.0
PECTINASAS ALCALINAS		Poligalacturonasa	10.5
	<i>Bacillus sp.</i>	Pectato liasa	10.5
		Pectato transeliminasa	9.0
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Pectato liasa	8.0
	<i>Xanthomonas campestris</i>	Pectato transeliminasa	9.5



### 2 Generalidades sobre hongos filamentosos

El reino Fungi incluye una colección heterogénea de organismos heterotróficos que pueden ser saprófitos o parásitos, o, menos frecuentemente, simbioses en una asociación comensal con otros organismos. Hablar de hongos implica una gran variedad de formas morfológicas, desde levaduras microscópicas unicelulares hasta hongos macroscópicos pluricelulares.

Los hongos filamentosos son microorganismos heterótrofos, morfológicamente complejos, poseen diferentes formas a lo largo de su ciclo de vida, desde una estructura básica (espora) vegetativa hasta un filamento tubular, es decir la germinación de una espora reproductiva. La hifa crece, se ramifica formando una masa de hifas llamada micelio. Dependiendo de las condiciones de crecimiento, algunas especies de hongos filamentosos pueden crecer como células (división tipo levadura) o como micelio.

Ecológicamente, los hongos, son formas de vida muy exitosas capaces de desarrollarse en ambientes hostiles para otras formas de vida.

Los hongos filamentosos son explotados para aplicaciones biotecnológicas, principalmente, como por ejemplo producción de alimentos, bebidas, ácidos orgánicos, enzimas, polisacáridos y antibióticos, agentes de control biológico como pesticidas. Poseen un amplio arreglo de metabolitos secundarios y algunos poseen mecanismos de secreción de proteínas usados para la expresión de productos genéticos homólogos y/o heterólogos.

#### 2.1 *El micelio*

La unidad funcional del micelio es la hifa. La hifa se describe como una célula cilíndrica que incrementa su longitud por crecimientos de uno de sus extremos. Presenta un área de superficie donde las sustancias son intercambiadas con el medio ambiente, los materiales necesarios para la biosíntesis y desarrollo del hongo son absorbidos del medio y excretados al mismo. Así mismo existen flujos citoplasmáticos que llevan materiales de metabolismo a través de toda la hifa. Al conjunto de hifas se le conoce como micelio. El micelio es la estructura somática de los hongos, es decir cuando se encuentran en un estado vegetativo.

El micelio es una estructura que en términos de requerimientos nutricionales es muy demandante conforme crece. Cuando el medio no le provee suficientes requerimientos nutricionales del micelio, el hongo recurre a formar esporas, una forma eficiente de ahorro de energía y nutrientes.

### **2.2 La espora**

Es una estructura altamente especializada para la reproducción, supervivencia y distribución de los hongos filamentosos. Se caracteriza por un mínimo gasto metabólico, bajo contenido de agua y poco o nulo movimiento citoplasmático. Las esporas asexuales se producen por división mitótica, mientras que las esporas sexuales se dividen por meiosis y como tal son capaces de proveer nuevas recombinaciones genéticas. Aparte de su función ecológica de propagar en la naturaleza distintas especies de hongos, las esporas son muy utilizadas en el laboratorio para el mantenimiento de cultivos o como inóculo para producir biomasa en procesos experimentales o industriales.

Se considera que todas las esporas muestran cierto grado de inactividad debido a que no se involucran en la síntesis de nuevo material celular y tienen una actividad metabólica reducida. Básicamente existen dos tipos de inactividad: la constitucional y la exógena. En la inactividad constitucional las esporas no germinarán cuando se encuentran bajo condiciones ambientales adecuadas ya que primero requieren un proceso de activación para superar el estado innato de inactividad que puede ser una barrera para que los nutrientes penetren. Por otro lado, en la inactividad exógena las esporas se encuentran inactivas debido a condiciones físicas y/o químicas desfavorables, de tal forma que al encontrar condiciones favorables crecerán. La germinación es controlada por la necesidad de factores de crecimiento externos, mientras que en la inactividad constitucional existe una barrera entre los factores de crecimiento ambientales y los procesos de iniciación germinativa.

Cuando todas las barreras de inactividad se han superado, las esporas normalmente requieren de un nivel de humedad y temperatura favorables con ciertas sustancias del medio ambiente para iniciar el proceso de germinación. La respiración aeróbica aparentemente es un requisito para la mayor parte de las esporas al iniciar la germinación, mientras que otras demandan dióxido de carbono. La mayoría de las esporas requieren una fuente de carbono externa durante la germinación, mientras que otras adaptan sus reservas de carbono necesitando solamente agua.

## **Generalidades sobre hongos filamentosos**

---

La germinación básicamente se compone de muchos procesos y cambios que ocurren durante la reactivación del desarrollo o crecimiento de una estructura en reposo y su subsiguiente transformación morfológica en una estructura diferente (micelio). En los hongos filamentosos lo anterior involucra el cambio de una espora no polar a un tubo germinal polar que continuará creciendo por extensión de la punta. Las esporas pueden considerarse como el principio y el fin del ciclo de desarrollo del hongo. El crecimiento de la espora ocurre de forma esférica, el nuevo material de la pared celular recae en toda la superficie interna de la espora.

La germinación también tiene efecto sobre la síntesis de proteína, ARN y ADN. Estudios realizados han demostrado que esporas sin germinar contienen todos o la mayoría de los componentes para llevar a cabo la síntesis de proteínas como son ribosomas, ARNt, sintetasa y enzimas de transferencia. La proteína que se involucra en el tubo germinal inicial aparentemente se sintetiza en un ARN mensajero estable presente en la espora inactiva.

### ***2.3 La pared celular***

En los hongos la pared celular primeramente sirve como protección y separación de la célula con el medio ambiente. Así mismo, una pared celular rígida determina la forma de la célula. La pared celular es una estructura dinámica compleja, sitio de actividad enzimática a su vez. Las macromoléculas estructurales son quitina y celulosa con otros polisacáridos, proteínas y lípidos.

### ***2.4 Fermentaciones de hongos filamentosos***

Las fermentaciones son procesos metabólicos que pueden emplearse para la obtención de productos de interés industrial aprovechando las ventajas inherentes de los microorganismos, es decir, su crecimiento a temperatura ambiente (o temperaturas relativamente moderadas) y empleo de medios acuosos. La resultante del proceso será metabolitos en bajas concentraciones en el medio. Para mejorar la productividad del proceso se plantea el uso de cepas altamente productoras y medios que promuevan la síntesis del metabolito de interés.

En las fermentaciones se pueden producir metabolitos primarios como ácidos orgánicos (principalmente ácido cítrico), metabolitos secundarios como los antibióticos, anillos  $\beta$ -lactámicos, péptidos cíclicos, policétidos, polienos y enzimas extracelulares.

El proceso de fermentación en un hongo filamentoso consta de 4 fases:

- a. Fase lag o de pregerminación, donde las células fúngicas o esporas se adaptan al nuevo ambiente. Esta fase incluye el inicio de la producción enzimática e intermediarios que apoyan el crecimiento. La duración de esta fase no solo depende del estado fisiológico del hongo sino también de las características macroscópicas del inóculo, es decir un inóculo de esporas requiere un período de germinación, la inoculación de micelio en forma de pellet requiere previamente una disrupción mecánica, para posteriormente iniciar su desarrollo.
- b. Fase exponencial, el incremento de biomasa depende de la velocidad de reproducción, el ambiente fisicoquímico. Una reducción en la velocidad de crecimiento quiere decir que existe un ambiente desfavorable para el crecimiento que se puede deber a nutrientes limitados, pH adverso, acumulación de productos metabólicos finales. La velocidad de crecimiento se define por el modelo de Monod:

$$\mu = \mu_{\max} (s/k_s + s)$$

$\mu$ : tasa de crecimiento

$\mu_{\max}$ : tasa de crecimiento máxima específica

$s$ : concentración del sustrato

$k_s$ : constante de saturación

La  $k_s$  de *Aspergillus niger* en glucosa es de 5mg/L y la  $\mu_{\max}$  es de 0.1785 h<sup>-1</sup>, si la concentración de glucosa es de 10 mg/L, la velocidad de crecimiento es de 0.119h<sup>-1</sup>.

Si existe una acumulación de masa de hifas existe un almacenaje de material lo que provoca un metabolismo endógeno, las hifas comienzan a lisarse y así mismo a liberar nutrientes lo cual permite el desarrollo de nuevas hifas.

La formación de masas de micelio o pellets depende de la naturaleza del inóculo, constituyentes del medio, características físicas del medio como pH y temperatura. El crecimiento morfológico tiene un efecto significativo en la reología (viscosidad) del caldo de fermentación lo que afectará el desempeño del biorreactor. Al incrementarse la viscosidad

## Generalidades sobre hongos filamentosos

---

se obtiene un impacto negativo en las propiedades de transferencia de masa del caldo de cultivo.

- c. Fase de desaceleración
- d. Fase de tasa de crecimiento constante

El proceso de fermentación considera las siguientes variables:

- Medio de cultivo

Las propiedades del medio de cultivo que son fundamentales para las fermentaciones son:

- Viscosidad
- Solubilidad
- Temperatura
- Formación de espuma
- Costo
- Inóculo:

El desarrollo de un inóculo de esporas se consigue más efectivamente en un cultivo sumergido con las condiciones de esporulación convenientes, a una temperatura entre 20°C y 40°C velocidad de agitación entre 50 rpm a 300 rpm.

### 3 El género *Aspergillus*

El nombre del género *Aspergillus* data del siglo XVIII, Micheli lo describió como "cabeza rugosa" al observar sus esporas unidas a los conidióforos (Micheli, 1729).

Pertenece al subreino Eumycota que contiene microorganismos uni o pluricelulares, heterótrofos, con nutrición por absorción. La subdivisión a la que pertenece este género es Deuteromycotina o *Fungi Imperfecti* que incluye a hongos que solo se reproducen por mecanismos asexuales, es decir por conidias; aunque algunas especies de *Aspergillus* presentan teleomorfismo, es decir pueden reproducirse sexualmente. La clase de *Aspergillus* es Hifomicetes, que producen conidióforos como parte del micelio. El género *Aspergillus* se divide en seis subgéneros *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Ornati*, *Aspergillus* y *Clavati* (Gams et al, 1985).

La típica estructura morfológica de los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* consiste de un conidióforo, estructura de sostén, que parte de un micelio de pared gruesa llamada células-pie. Los conidióforos no son septados, alargados, que terminan en una vesícula globosa, a lo largo de la superficie de la vesícula se localizan las métulas, que a su vez sostienen a las fiálides. Las conidias son producidas desde las puntas de las fiálides, son estructuras globosas de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de superficie lisa u ornamentada. Las células de Hülle son células de pared gruesa, especializadas, que protegen las estructuras sexuales, se forman a partir de una extremidad de una hifa especializada. En la Figura 4 se puede observar esquemáticamente la morfología de los hongos del género *Aspergillus*, así mismo en la Figura 5, se aprecia una micrografía electrónica del hongo.

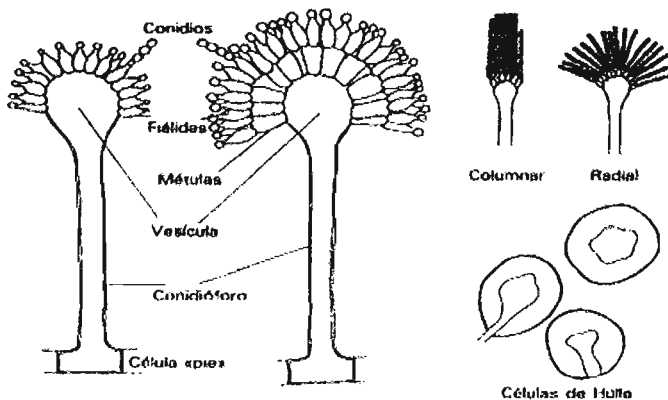
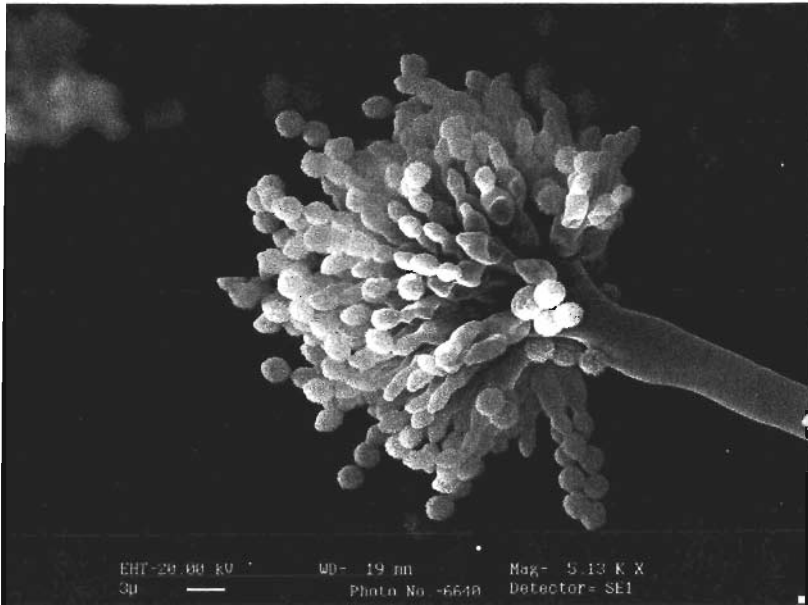


Figura 4. Representación microscópica de *Aspergillus* sp.



**Figura 5.** Microscopía electrónica de *Aspergillus sp.* (Cortesía de Schimmel y Schimmelpilze)

El micelio forma filamentos septados ramificados con cierto crecimiento atípico polarizado. La reproducción puede ser teleomórfica (sexual) o anamórfica (asexual). El estado conidial representa la fase reproductiva predominante.

Los hongos del género *Aspergillus* son saprófitos, su habitat más común es el suelo, son importantes agentes de descomposición y reintegración de materia orgánica al medio. Así mismo existen especies parásitas de plantas y animales.

El ciclo de vida de los hongos del género *Aspergillus* comprende dos etapas, una etapa asexual y otra sexual. La etapa asexual consiste en la producción de esporas por mitosis, también se le llama a esta etapa conidiación. Por su parte, la fase sexual forma un cleistotecio, una estructura esférica formada por una red de hifas dentro de la cual se desarrollan esporas derivadas de un proceso de meiosis. No todos los hongos del género son capaces de reproducirse sexualmente.

El género *Aspergillus* es usado industrialmente para la producción de metabolitos primarios como ácidos orgánicos, vitaminas, ácidos grasos, aminoácidos y enzimas (Tabla 3). La modificación de

cepas es necesaria para obtener una producción a gran escala. Una de las sustancias producidas por *Aspergillus* es el ácido cítrico muy utilizado en bebidas, cosméticos y medicamentos, la especie que más produce este compuesto es *A. niger*. Mientras que *A. niger* es ampliamente explotado en la industria de alimentos y bebidas, otras especies como *A. oryzae* son explotados por su producción enzimática.

Tabla 3. Algunos ejemplos de enzimas del género *Aspergillus* de interés industrial

<b>Enzima</b>	<b>Fuente</b>	<b>Acción catalítica</b>	<b>Ejemplo de uso</b>
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Oxida glucosa de D-glucano- $\delta$ -lactona liberando peróxido de hidrógeno	Análisis de glucosa en sangre
Catalasa	<i>Aspergillus niger</i>	Cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua	Remoción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de la leche después de la esterilización
$\alpha$ -amilasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Degrada los enlaces $\alpha$ -1,4 de la molécula de almidón resultado una mezcla de maltodextrinas	Producción de jarabe de maltosa
Glucamilasa	<i>Aspergillus niger</i>	Libera glucosa de los extremos de las cadenas de almidón	Producción de jarabe de glucosa
$\beta$ -glucanasa	<i>Aspergillus niger</i>	Hidrólisis de los enlaces $\beta$ -1,3	Filtración de cerveza
Celulasa	<i>Trichoderma spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Penicillium spp.</i>	Degrada los enlaces $\beta$ de glucanos	Digestivos
Pectinasa	<i>Aspergillus spp.</i>	Hidrólisis de enlaces de ácido $\alpha$ -1,4-D-galacturónico de pectina	Extracción y clarificación de jugo de frutas y vinos
Lactasa	<i>Aspergillus niger</i>	Hidrólisis de lactosa	Procesamiento de suero de leche
Lipasa	<i>Aspergillus spp.</i>	Liberación de ácidos grasos de ésteres glicéricos	Potenciador del sabor del queso
Proteasa fúngica	<i>Aspergillus oryzae</i>	Actividad proteolítica	Producción de soja Mejoramiento de masa para panes



**3.1 Pectinasas presentes en el género *Aspergillus*.**

El género *Aspergillus* es un importante microorganismo productor de pectinasas. Las pectinasas que sintetiza para hidrolizar el esqueleto de la región lisa son pectin liasas, pectato liasas y poligalacturonasas, llevando a cabo el mismo mecanismo de reacción que anteriormente se ha detallado. Se conocen las familias de genes que codifican estas enzimas (Hermsen *et al*, 1990; Bussink *et al*, 1991).

En la siguiente tabla (Tabla 4) se pueden apreciar los genes que codifican para estas enzimas.

Tabla 4. Genes codificadores de enzimas pectinoíticas en diferentes especies de *Aspergillus*.

Especie	Enzima	Gen
<i>A. aculeatus</i>	Poligalacturonasa	<i>pgaI</i>
	Ramnogalacturonasa	<i>rhgA</i>
	Ramnogalacturonano liasa	<i>rhgB</i>
<i>A. flavus</i>	Poligalacturonasa	<i>pecA, pecB</i>
<i>A. niger</i>	Poligalacturonasa (7 tipos)	<i>pgaI, pgaII</i>
		<i>pgaA, pgaB</i>
		<i>pgaD, pgaE</i>
	Ramnogalacturonasa	<i>pgaC</i>
		<i>rhgA, rhgB</i>
		<i>pelA, pelB</i>
Pectin liasa	<i>pelD</i>	
Pectato liasa	<i>plyA</i>	
<i>A. oryzae</i>	Poligalacturonasa (2 tipos)	<i>pgaA, pgaB</i> <i>pecA</i>
<i>A. parasiticus</i>	Poligalacturonasa	<i>pecA</i>
<i>A. tubingenis</i>	Poligalacturonasa	<i>pgaII</i>
	Exopoligalacturonasa	<i>pgaX</i>
	Exoxilogalacturonano hidrolasa	<i>xghA</i>

El análisis de la tabla anterior muestra que existe redundancia genética, ya que distintos genes están involucrados en la codificación de una enzima, lo que da ventaja al microorganismo al estar involucrado en un proceso saprofitico o patógeno con la pared celular vegetal, debido a que puede producir una gran variedad de enzimas en diferentes condiciones.

Con respecto a la regulación de la biosíntesis de pectinasas en *Aspergillus sp.*, existen tres tipos de enzimas extracelulares, las inducibles, las parcialmente inducibles y las constitutivas. En el caso de las pectinasas, por su aplicación fisiológica en los microorganismos, presumiblemente existen en un nivel basal que permitirá la degradación del sustrato, pueda ingresar a la célula y generar la inducción (Van der Veen, 1991), es decir un aumento en la concentración de una enzima como consecuencia de la presencia de cierta sustancia química o inductor.

Diversos estudios se han realizado en hongos fitopatogénicos y fitosaprofiticos reportan que existe cierta correspondencia temporal entre la síntesis de enzimas pectinolíticas y los polisacáridos que el hongo encuentra en las distintas capas de la pared celular vegetal, la interrogante entonces es cómo el hongo es capaz de reconocer el sustrato, siendo este una molécula grande que no puede penetrar a la célula e inducir la producción de enzimas que logren degradar al sustrato. La respuesta a aquella interrogante es un sistema constitutivo de enzimas extracelulares degradadoras de pared celular, así los productos de degradación, moléculas evidentemente más pequeñas, son capaces de atravesar la membrana celular del hongo e inducir una mayor producción de enzimas. Se sabe que el ácido galacturónico es capaz de aumentar la síntesis de enzimas pectinolíticas (Aguilar y Huitrón, 1987).

El nivel basal de concentración enzimática se considera como no inducible, la tasa de síntesis es constante, se ha encontrado en diversos estudios en sistemas microbiológicos que la mayor parte de las enzimas sintetizadas corresponden a enzimas inducibles. Así mismo, existen sistemas de control que son proteínas reguladoras que interactúan con la molécula inductora, ejerciendo un control positivo o negativo de la inducción o represión.

Los microorganismos reprimen la síntesis de ciertas enzimas cuando se encuentran en presencia de glucosa a fin de no efectuar gasto de energía siendo la glucosa un azúcar de poca complejidad, las enzimas usualmente reprimidas, son utilizadas en el metabolismo de otras fuentes de carbono.

El sistema de represión de enzimas pectinasas en el género *Aspergillus* esta dado por la proteína CreA, (por sus siglas en inglés "*Carbon catabolite repressing protein A*" o proteína represora de la catálisis de carbono A), que proviene del gen *creA*, la cual se une al ADN (Ruijter y Visser, 1997). En presencia de sustratos de fácil metabolismo como glucosa o fructosa, la proteína CreA reprime la expresión de ciertos genes al unirse a sitios específicos en las regiones promotoras del gen.

Otro factor que afecta la expresión de algunos genes que codifican para pectinasas (en general para las enzimas degradadoras de polisacáridos de pared celular) de *Aspergillus sp.*, es el pH. La proteína responsable de dicha regulación es la PacC, que se une al ADN, la cual es activa en un pH alcalino y tiene una función dual, por un lado activa la expresión de genes que codifican para enzimas alcalinas y por otro reprime la expresión de genes que codifican para enzimas ácidas. La endopoligalacturonasa es una enzima que ha sido reportada como reprimida por la proteína PacC (Kojima *et al.*, 1999).

### **3.2 Inmunoquímica de la pared celular de *Aspergillus***

La mayoría de estudios de capacidad antigénica de *Aspergillus* se han realizado en especies patogénicas a fin de desarrollar una herramienta de diagnóstico *in situ* (Levitz y Diamond, 1985). Sin embargo, dichos estudios han arrojado semejanzas entre la capacidad antigénica de especies patógenas y la capacidad antigénica de especies saprófitas. Estos estudios han evaluado la capacidad antigénica de la pared celular.

La pared celular de las esporas o conidias es distinta a la de las hifas ya que durante la germinación, la pared celular sufre acelerados y drásticos cambios. La pared celular de las esporas contiene menos proteína que la pared celular del micelio. Existe una lisis enzimática a medida que ocurre la extensión hifal.

Químicamente *Aspergillus* pertenece al grupo de hongos que se caracterizan por paredes celulares de quitina y glucano. La pared celular de las hifas consiste de  $\alpha$ -glucanos y glicoproteínas, que incluyen peptido-galactomananos. Las glicoproteínas tienen diversas funciones en la pared celular como el reconocimiento de sistemas y por otro lado como determinantes antigénicas. En la mayoría de las glicoproteínas, la parte proteica representa la parte funcional, mientras que el carbohidrato contribuye a la estructura terciaria de la proteína y así modifica la molécula para hacerla más estable

y fácil de secretar. El esqueleto de la pared celular comprende polisacáridos altamente cristalinos como quitina. Los galactomananos contienen unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosilo ligadas a  $\beta$ -D-galactofuranosilo.

Inmunoquímicamente un peptido-galactomanano, tanto de micelio como de esporas, puede generar reacciones de hipersensibilidad inmediatas. La reacción inmediata se asocia a la parte del galactomanano y una reacción retardada se debe a la parte proteica (Azuma *et al*, 1968). Al incubar tubos germinales (esporas en estado de germinación) e hifas ramificadas con suero de pacientes con aspergilosis (provocada por la aspiración de *Aspergillus fumigatus*) que desarrollaron anticuerpos contra *Aspergillus*, se obtuvo una reacción con los antígenos de superficie de ambas estructuras (Jonh *et al*, 1984), el estudio anterior se llevó a cabo por inmunofluorescencia para determinar que la reacción antígeno-anticuerpo se había llevado a cabo con los antígenos de superficie.

Así mismo, existen estudios (Aguilar y Huitron, 1993) que refieren enzimas pectinolíticas como la exopectinasa parcialmente unidas por interacciones iónicas a la pared de la spora y a la del micelio. Lo anterior se concluyó por el tratamiento de ambas estructuras con detergentes iónicos y enzimas líticas de la pared celular.

En diversos estudios se encontraron las mismas zonas antigénicas en extractos de esporas y micelio de *A. nidulans* que las encontradas en diversas especies patogénicas de *Aspergillus*. Lo anterior sustenta el hecho de que diferentes especies de *Aspergillus* comparten epítopes antigénicos (Puente *et al*, 1991).

### 1. Objetivo

Establecer las condiciones de producción de la enzima endopoligalacturonasa, sintetizada por *Aspergillus sp.* FP-500.

#### 1.1 *Objetivos particulares:*

- Determinar la fuente de carbono más adecuada para la obtención de altos perfiles de producción de endopoligalacturonasa a partir de fermentaciones de *Aspergillus sp.*
- Diseñar un protocolo sencillo para la purificación de la enzima endopoligalacturonasa.
- Determinar la presencia de enzimas constitutivas de *Aspergillus sp.* degradadoras de polisacáridos de pared celular de plantas.
- Obtener anticuerpos contra diferentes estructuras celulares (esporas y micelio) de *Aspergillus sp.* y enzimas extracelulares degradadoras de polisacáridos de pared celular de plantas, a fin de proveer herramientas y sentar las bases de la producción de anticuerpos contra enzimas degradadoras de pectina producidas por *Aspergillus sp.*

#### 1. Microorganismos

Se utilizó la cepa FP-500 silvestre del género *Aspergillus sp* aislada de frutos y materia orgánica en estado de descomposición. La cepa se mantuvo viable mediante resiembras periódicas en placa con medio agar papa dextrosa (PDA), se almacenó a 4°C.

##### 1.1 Inóculo

Como inóculo para las fermentaciones se utilizaron las esporas obtenidas de placas de medio sólido (Agar papa dextrosa, PDA). Estas fueron cosechadas con solución salina (0.9% P/V) Tween 80 al 0.005 V/V estéril. La concentración de esporas se determinó usando una cámara de Neubauer. Se inculó la cantidad necesaria de suspensión de esporas para alcanzar una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas por mililitro de cultivo.

En algunos casos las esporas se lavaron exhaustivamente con solución salina (0.9% p/v) estéril, centrifugando y resuspendiendo el botón por siete veces, a dichas esporas se les llama esporas lavadas.

#### 2. Medios y condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la selección, cultivo y mantenimiento de *Aspergillus sp*. FP 500 fue el Agar papa dextrosa (PDA). Los cultivos en medio sólido se incubaron en una estufa a 37°C por 72 horas.

Para cultivar al microorganismo en medio sumergido y llevar a cabo la producción de enzimas pectinolíticas se utilizó el medio basal compuesto de:  $K_2HPO_4$  al 0.2%,  $KH_2PO_4$  al 0.2% y  $(NH_4)_2SO_4$  al 0.5% y como fuente de carbono se utilizaron:

- Pectina de frutos cítricos Sigma-Aldrich® con un grado de esterificación del 61%.
- Pectina de frutos cítricos Sigma-Aldrich® con un grado de esterificación del 46%.
- Glucosa (Dextrosa anhidra Baker®).
- Residuo seco del procesamiento de la uva.

Todas las fuentes de carbono se adicionaron al 1% p/v. El medio de glucosa al 1% se suplementó con extracto de levadura al 0.1% p/v. El volumen final de todos los medios fue de 100mL, se prepararon en matraces Erlenmeyer de 500 mL.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizó agua destilada para la preparación de todos los medios.

Los cultivos sumergidos se incubaron a una temperatura 37°C por 72 horas, con agitación recíprocante a 200 rpm. Se tomaron muestras de 10 mL cada 24 horas para determinar el crecimiento celular, actividad enzimática, pH, consumo de sustrato, etc.

La esterilización de todos los medios y otras soluciones se llevó a 121°C y una atmósfera durante 20 minutos.

### **3. Determinación de biomasa**

En medio líquido la biomasa fue determinada por la técnica de peso seco, para lo cual se tomaron muestras de 5 mL de cultivo cada 24 horas durante la fermentación y se filtraron a través de una membrana Millipore® de 5.0µm, previamente pesada. La biomasa retenida en la membrana fue secada en una estufa a 80°C hasta obtener un peso constante.

### **4. Determinación de azúcares reductores**

Los azúcares reductores fueron determinados directamente en filtrados libres de células, usando el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959). Los productos de degradación de la pectina fueron expresados como ácido galacturónico, en los casos de fermentaciones que emplearon pectina o residuo de uva como fuente de carbono. En el caso de glucosa como fuente de carbono, la determinación de azúcares reductores residuales se llevó a cabo correlacionando con una curva patrón de glucosa.

### 5. Determinación de la actividad enzimática

La actividad exopectinólítica fue determinada por la cuantificación de los azúcares reductores producidos a partir de la reacción de las enzimas. El sistema de reacción consistió de una solución de pectina (0.5% p/v) disuelta en solución amortiguadora de acetatos 100mM pH de 5 y 0.1mL de filtrado libre de células. Se incubó a 45°C durante 20 minutos, se centrifugó y se miden los azúcares reductores mediante el ensayo de DNS (Miller, 1959) producidos durante la degradación del sustrato. Posteriormente se mide la absorbancia del sistema de reacción a una longitud de onda de 575 nm. Una unidad de actividad exopectinólítica está definida como la cantidad de enzima que catalizó la formación de 1.0  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturónico bajo las condiciones del ensayo.

La actividad endopectinólítica producida en medio líquido se evalúa por el cambio de viscosidad de una solución de pectina al 1% p/v disuelta en una solución amortiguadora de acetatos - salina a pH de 4.2 y una temperatura de 30°C, en un viscosímetro de Oswald (Kimax®). Se utilizan 500  $\mu\text{L}$  de filtrado libre de células en 10 mL de la solución de pectina durante diferentes tiempos de reacción. Se mide el tiempo de reacción y el tiempo que tarda en fluir la solución de pectina una distancia fija del viscosímetro. Una unidad de actividad endopectinólítica se define como la cantidad de enzima que redujo en un 50% la viscosidad de la solución de pectina, en un tiempo de 10 minutos (Aguilar *et al*, 1991).

### 6. Determinación de proteína

La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951). La valoración se hizo respecto a una curva patrón hecha con proteína de albúmina sérica bovina en un rango de concentración entre 0.025 a 0.1 mg/mL.

### 7. Fraccionamiento del filtrado enzimático por cromatografía de intercambio iónico

Con el objetivo de fraccionar el filtrado enzimático para obtener la enzima endopoligalacturonasa se utilizó la cromatografía de intercambio iónico. Se utilizaron dos resinas iónicas, la Streamline™ SP, resina con grupos catiónicos fuertes y la Streamline™ Q XL, resina con grupos aniónicos fuertes (ambas de la marca Amersham Bioscience®).



El filtrado enzimático crudo se diluyó 1:1 con agua destilada, se ajustó el pH a 6 con NaOH diluida y se adicionó resina Streamline™ SP al 1% y permanece toda la noche con agitación constante en refrigeración. El filtrado enzimático se separó de la resina Streamline™ SP por decantación y centrifugación. A este filtrado tratado se le adicionó la resina Streamline™ Q XL al 1% y permaneció toda la noche en agitación constante en refrigeración. Se decantó el sobrenadante y se recupera la resina en el menor volumen posible. La resina se empacó en una columna y la proteína retenida se eluyó con solución de NaCl 1M. La proteína recuperada se dializó contra buffer acetatos a pH 6.

### **8. Determinación de la actividad enzimática a diferente pH y temperatura**

La actividad de la preparación enzimática purificada fue determinada a partir de mediciones a diferentes temperaturas y pH. Las temperaturas probadas fueron 40°C, 50°C, 60°C, fijando el pH del sistema de preparación a 5. Para determinar la actividad ante diferentes pH, se fijó la temperatura del sistema a 50°C y se midió la actividad a valores de pH de 3, 4, 5, 6 en un medio de solución amortiguadora de acetatos 100mM ajustada al pH correspondiente de cada determinación, así mismo se determinó la estabilidad de la enzima exopectinólítica a pH 8, en medio de solución amortiguadora de fosfatos 100mM.

La actividad endopoligalacturonasa, fue evaluada variando el pH del sistema de reacción a 3, 4.2, 5, 6, en medio de solución amortiguadora acetatos-salina ajustada al pH correspondiente. La temperatura en esta determinación permaneció constante, a 30°C. No fue posible evaluar la actividad endopoligalacturónica a diferentes temperaturas ya que la temperatura altera significativamente la viscosidad de la solución de pectina.

### **9. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)**

La electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Los geles contenían acrilamida al 10% p/v y bis-acrilamida al 2.7% p/v (Bio-Rad Laboratories). Se adicionó a las muestras amortiguador de muestra formado por SDS al 4% p/v (Bio-Rad Laboratories®), solución amortiguadora Tris-HCl 125 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol al 0.005% p/v. La electroforesis corrió a una corriente constante de 40 mA por un tiempo de 1 a 1.5 horas a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm Mighty Small SE-245 (Hoefer Sci Ins USA®). Después de ese tiempo los geles fueron sumergidos en solución de tinción, que contenía azul

de Coomassie R-250 (Bio-Rad Laboratories®) al 0.125% p/v, metanol al 50% v/v y ácido acético al 10% v/v durante 1 hora para después ser destañados con una solución de ácido acético al 10% v/v.

### **10. Determinación de actividad enzimática "in situ" sobre gel de SDS-PAGE (zimograma)**

Se corrieron geles SDS-PAGE en las condiciones ya descritas, con la diferencia de no sumergirlas en solución de tinción, sino en solución amortiguadora renaturalizante (Tris 100mM pH 6.8) y se mantuvieron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y agitación de 20 rpm durante 1 a 1.5 horas. Posteriormente, el gel se incubó en una solución de sustrato pectina al 1% p/v a un pH=5, disuelta en solución amortiguadora de acetatos 100 mM durante toda la noche a temperatura ambiente. Pasado este tiempo el gel se tñó con el colorante específico para pectina, Rojo rutenio (Sigma®) al 0.05% p/v. El gel se destañó con lavados con agua destilada. Esto permite observar bandas de actividad enzimática. Cada vez que se corre un gel para determinar proteína, se corre uno análogo para determinar actividad enzimática, los geles pueden ser superpuestos revelando qué proteínas corresponden a las enzimas hidrolíticas del zimograma.

### **11. Obtención de anticuerpos**

Los antígenos empleados en la inmunización fueron:

- Suspensión de esporas intactas no germinadas, dicha suspensión contenía  $5 \times 10^8$ .
- Micelio proveniente del crecimiento de esporas de la cepa FP-500 en pectina como fuente de carbono, por 24 horas. Una vez cosechado el micelio, éste fue lavado exhaustivamente y liofilizado. Se utilizaron 25 mg de micelio liofilizado para la inoculación.
- Filtrado enzimático producto de fermentaciones en medio de pectina y en medio de glucosa de la cepa FP-500. Fueron inoculados 200µL de cada filtrado enzimático en cada inoculación.

Para la producción de los anticuerpos se utilizaron conejos machos Nueva Zelanda blancos. La vía de administración de los antígenos fue subcutánea. Se inocularon con 1 mL de adyuvante de Freund completo en la primera inmunización y 1 mL de adyuvante incompleto de Freund en las siguientes tres inmunizaciones. Los adyuvantes fueron administrados junto con los antígenos para disminuir la alta difusibilidad y formar una emulsión con los antígenos solubles, lo anterior para aumentar el tiempo de disponibilidad del antígeno en la zona inoculada.

Después de siete días de la cuarta administración, al cabo de siete días se obtuvo la sangre de cada conejo, de la cual se separó por centrifugación el paquete celular, para obtener el suero que contiene los anticuerpos. A partir del suero se precipitaron los anticuerpos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El paquete resultante después de centrifugar a 10,000 rpm, se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) y se dializa exhaustivamente para eliminar el exceso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para posteriormente liofilizarlos para su conservación.

### **12. Prueba de especificidad de anticuerpos**

#### ***12.1 Doble inmunodifusión radial u Ouchterlony***

La prueba de anticuerpo vs. antígeno se llevó a cabo por el método de inmunoprecipitación por doble difusión, o también llamado Ouchterlony, una prueba semicualitativa. Consistió en preparar una placa de agar al 0.9% p/v disuelto en solución amortiguadora fosfatos salina (PBS), la altura de la agarosa es de aproximadamente 4 mm. La placa se orada con 5 cavidades de un mismo diámetro y misma profundidad (aproximadamente 20 $\mu$ L), una al centro y 4 más distribuidas de forma concéntrica. En la cavidad central se situó el anticuerpo, concentración fija de 1mg/mL (disuelto en PBS), y en las cavidades periféricas el antígeno en diferentes concentraciones (disuelto en PBS). Ocurre la reacción cuando las concentraciones equivalentes de ambos se encuentran al difundir a través del agar, como producto de la reacción se formará una banda de precipitación. Si no se apreciara la reacción a simple vista puede revelarse con Azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad Laboratories®) al 0.125% p/v, metanol al 50% v/v y ácido acético al 10% v/v durante 1 hora para después ser destefidos con una solución de ácido acético al 10% v/v.

##### *12.1.1 Ruptura de esporas*

Esta técnica se llevó a cabo para probar la especificidad de los anticuerpos contra esporas hacia la pared celular de las esporas y no como un antígeno para producir anticuerpos. A partir de una suspensión celular de esporas lavadas, se agregó un volumen similar de pequeñas esferas de vidrio, por un minuto se dejan chocar unas con otras mediante un Vortex y posteriormente se dejaron reposar otro minuto, y así se continuó hasta completar 8 minutos de agitación. Finalmente se rectificó en el microscopio que la ruptura se haya llevado a cabo.

### ***12.2 Inmunoblot***

Los antígenos fueron fijados en una membrana de nitrocelulosa, las membranas se bloquearon con solución bloqueadora (solución amortiguadora Tris/HCl salina con Tween 20 0.5 v/v y 0.3% de gelatina w/v), posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo a la concentración que requirió el experimento disuelto en solución amortiguadora Tris/HCl salina con Tween 20 0.5 v/v y 0.1% de gelatina w/v. Al cabo de una noche de incubación, las membranas se lavan exhaustivamente y se incuban con el segundo anticuerpo, el IgG (anti IgG de conejo) acoplado con la enzima peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich®) por dos horas, para llevar a cabo la reacción de identificación se utilizó como sustrato de la peroxidasa  $H_2O_2$ , para detectar la reacción se utiliza 4-cloro 1-Naftol (Sigma-Aldrich®),  $CoCl_2$ , todo disuelto en solución amortiguadora de fosfatos salina.

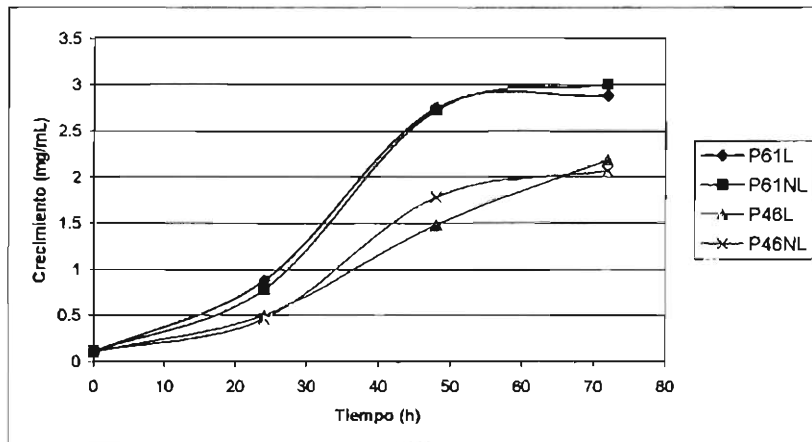
## IV. Resultados y Discusión

### 1. Determinación del tipo de inóculo y fuente de carbono

Dado que el grado de esterificación de la pectina puede influir en la producción de las enzimas pectinolíticas, se evaluó el efecto de esta característica utilizando pectinas con grado de esterificación diferente, usando pectina al 46% y 61% de esterificación. Adicionalmente se evaluó el efecto del lavado de las esporas ya que al cosecharlas de las placas arrastran residuos del medio que pudieran contener nutrientes y/o algunas enzimas adsorbidas que pudieran interferir en el desarrollo del hongo en las etapas iniciales de la fermentación y limitar la síntesis de las enzimas. Para eliminar estos residuos, las esporas se lavan con solución isotónica de NaCl por centrifugación.

A continuación se presentan los resultados de los parámetros estudiados durante la fermentación:

En la figura 6 podemos apreciar el crecimiento en los dos tipos de pectina y el efecto de lavado sobre las esporas.



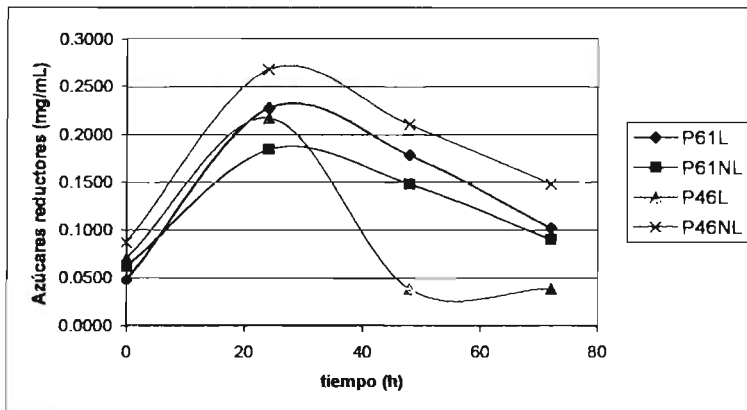
**Figura 6.** Comparación de desarrollo celular entre dos tipos de pectina y efecto de lavado sobre las esporas. P61L: pectina con 61% de esterificación, esporas lavadas. P61NL: pectina con 61% de esterificación, esporas no lavadas. P46L: pectina con 46% de esterificación, esporas lavadas. P46NL: pectina con 46% de esterificación, esporas no lavadas.

## Determinación de tipo de inóculo y fuente de carbono

Podemos apreciar que el crecimiento celular en la pectina con 61% de esterificación es mayor, aproximadamente por 1 mg/mL a las 72 horas con respecto al crecimiento en pectina con 46% de esterificación. Un mejor desarrollo celular es benéfico para la fermentación a fin de recuperar más enzimas extracelulares.

Al evaluar la conveniencia de llevar a cabo un lavado exhaustivo a las esporas cosechadas, a fin de que no interviniera en su crecimiento el medio en el cual se habían desarrollado inicialmente, se aprecia que en ninguna condición de grado de esterificación de pectina se observan diferencias entre llevar a cabo el lavado o no, el crecimiento sigue el mismo comportamiento básicamente y en ambos tipos de pectina se llega a una concentración de micelio muy similar.

A fin de determinar el perfil de azúcares reductores, cada 24 horas de fermentación se analizaron los azúcares reductores del medio.



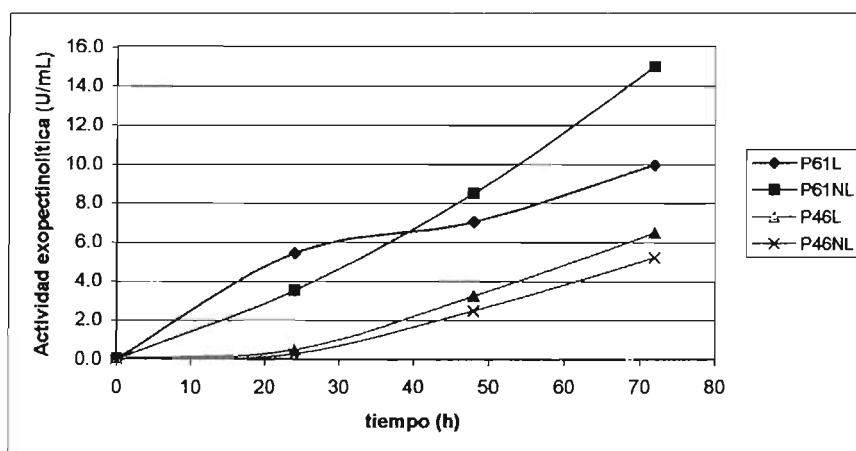
**Figura 7.** Comparación del perfil de azúcares reductores entre dos tipos de pectina y el efecto de lavado sobre las esporas. P61L: pectina con 61% de esterificación, esporas lavadas. P61NL: pectina con 61% de esterificación, esporas no lavadas. P46L: pectina con 46% de esterificación, esporas lavadas. P46NL: pectina con 46% de esterificación, esporas no lavadas.

En la Figura 7 se puede apreciar que el perfil de reductores más alto alcanzado es el de la fermentación en el medio con pectina con 46% de esterificación con esporas no lavadas. Así mismo el comportamiento del perfil de azúcares reductores es similar usando ambos inóculos, excepto en la fermentación con pectina con 46% de esterificación y esporas lavadas.

## Determinación de tipo de inóculo y fuente de carbono

Durante las primeras etapas de la fermentación, apreciamos que la síntesis de enzimas pectinolíticas y la actividad de éstas generan azúcares reductores, ya que apreciamos una generación máxima de azúcares reductores, lo que nos está hablando de un balance entre la producción de enzimas pectinolíticas y el consumo de productos de degradación. Se aprecia un consumo que se va incrementando hacia las últimas horas de la fermentación, a medida que el crecimiento va aumentando y la demanda de nutrientes se intensifica. Este comportamiento se aprecia similar en las fermentaciones con pectina con 61% de esterificación y con pectina 46% de esterificación esporas no lavadas. Para la fermentación en pectina con 46% de esterificación y esporas lavadas, el consumo es mayor hacia las 48 horas de crecimiento, llegando casi al mínimo de grupos reductores en el medio, lo cual se complementa si apreciamos la curva de crecimiento celular, donde el comportamiento sigue un patrón lineal y no estacionario como el resto de las condiciones evaluadas, es decir la demanda de nutrientes es proporcional al crecimiento celular.

La influencia del tipo de pectina y las condiciones del inóculo en la producción de enzimas exopoligalacturonasa y endopoligalacturonasa se observa en las figuras 8 y 9. La actividad se determinó cada 24 horas.



**Figura 8.** Comparación de la actividad de la enzima exopoligalacturonasa entre dos tipos de pectina y el efecto de lavado sobre las esporas. P61L: pectina con 61% de esterificación, esporas lavadas. P61NL: pectina con 61% de esterificación, esporas no lavadas. P46L: pectina con 46% de esterificación, esporas lavadas. P46NL: pectina con 46% de esterificación, esporas no lavadas.

## Determinación de tipo de inóculo y fuente de carbono

---

La producción es más acelerada y más abundante en pectina con 61% de esterificación, alcanzando su máximo en ambas condiciones a las 72 horas de fermentación. Los perfiles enzimáticos en ambas condiciones de inóculo (esporas lavadas y no lavadas) en las fermentaciones con este tipo de pectina poseen diferencias, en las etapas iniciales de la fermentación la producción es más acelerada en la fermentación con esporas lavadas, sin embargo al final de la fermentación la producción es mayor con esporas no lavadas.

En las fermentaciones en pectina con 46% se aprecia un perfil de producción muy parecido, teniendo ligeramente una mayor producción la fermentación con esporas lavadas, aunque los niveles de producción son muy parecidos.

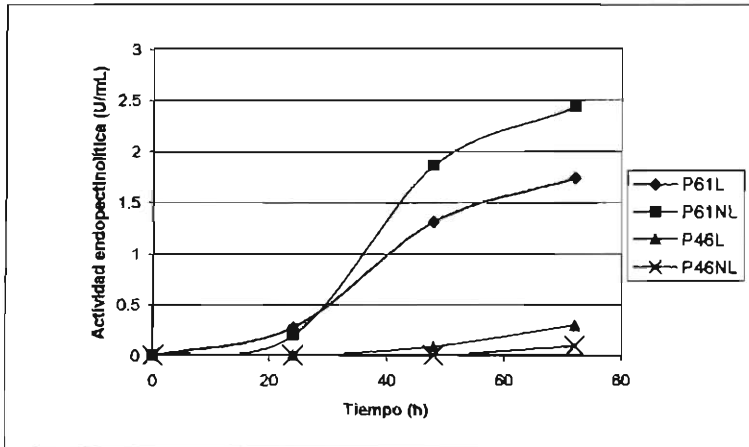
Al comparar el perfil de producción de enzima exopectinolítica en pectina con 61% de esterificación con el perfil enzimático producido en pectina con 46% de esterificación, apreciamos que la producción en pectina con 46% de esterificación es notablemente menor que la producción en pectina con 61% de esterificación. Es decir la producción de ésta enzima se favorece entre mayor sea el grado de esterificación.

Si correlacionamos el crecimiento celular en las fermentaciones con los perfiles de enzima exopectinolítica, encontramos que el mayor crecimiento se detectó en pectina con 61% de esterificación y esporas no lavadas, condición en la que encontramos la mayor producción enzimática.

En cuanto a la actividad de la enzima endopoligalacturonasa los resultados se presentan en la Figura 9.



## Determinación de tipo de inóculo y fuente de carbono



**Figura 9.** Comparación de la actividad de la enzima endopoligalacturonasa entre dos tipos de pectina y el efecto de lavado sobre las esporas. P61L: pectina con 61% de esterificación, esporas lavadas. P61NL: pectina con 61% de esterificación, esporas no lavadas. P46L: pectina con 46% de esterificación, esporas lavadas. P46NL: pectina con 46% de esterificación, esporas no lavadas.

Se puede apreciar que el perfil de producción en pectina con 61% de esterificación sigue un comportamiento similar. En la fermentación con esporas lavadas en pectina con 61% de esterificación la producción es más acelerada hacia las primeras 24 horas. Sin embargo, la producción de endopoligalacturonasa en la fermentación con esporas no lavadas es mayor y más acelerada después de las 24 horas. Se alcanza el máximo de producción con las esporas no lavadas en pectina con 61% de esterificación con respecto a las demás condiciones evaluadas.

No se favorece la producción de la endopoligalacturonasa en la pectina con 46% de esterificación tal como se aprecia en la Figura 9. El perfil enzimático es ligeramente mayor en la fermentación con esporas lavadas que con esporas no lavadas.

En base a las condiciones evaluadas en cuanto al crecimiento celular y el perfil enzimático se favorecen éstos parámetros empleando la pectina de frutos cítricos Sigma® con 85% de ácido galactruónico y 61% de esterificación como fuente de carbono (al 1%) y esporas no lavadas pero filtradas a través de algodón estéril, ya que probablemente, con el lavado se eliminan enzimas que se encuentran acopladas a la pared celular del hongo que favorecen la generación de inductores de la síntesis de enzimas pectinolíticas (Aguilar y Huitrón, 1993).

### 2. Fermentación en diferentes fuentes de carbono

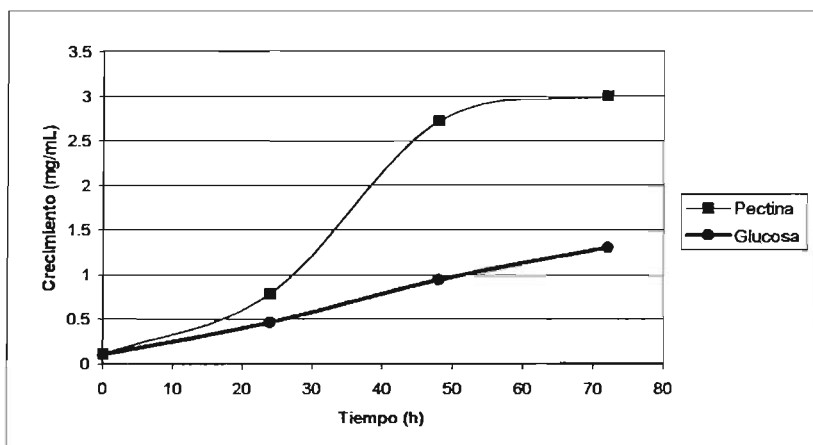
En este experimento se evaluó el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de pectinasas. Las fuentes de carbono utilizadas fueron pectina, glucosa y residuo de uva, todas ellas al 1% P/V. Para cada medio de cultivo se utilizó como inóculo esporas no lavadas y para el medio de pectina se empleó la pectina con 61% de esterificación, de acuerdo a los resultados obtenidos previamente.

Se evaluó el efecto sobre la producción de enzimas pectinolíticas de la glucosa como fuente de carbono a fin de determinar si la cepa FP 500 presentaba enzimas exopectinolíticas o endopectinolíticas constitutivas y la proporción de éstas, ya que la producción constitutiva de pectinasas ha sido reportada por varios autores (Panda *et al*, 2004; Parenicová *et al*, 1998; Parenicová *et al*, 2000). Para este ensayo el medio de fermentación fue suplementado con extracto de levadura al 0.1%, debido a que en experimentos previos se observó que el crecimiento celular en glucosa al 1% era muy pobre y el aspecto visual de la fermentación indicaba cierto estrés celular al tornarse en una coloración verde, la adición de extracto de levadura promovió mejor el crecimiento celular. También se probó el uso de residuo de uva como fuente de carbono para la producción de enzimas pectinolíticas.

El pH a lo largo de las fermentaciones tendió a bajar, partiendo de un pH aproximado de 4.5 para las fermentaciones en glucosa y residuo de uva, y para las fermentaciones en pectina de 3.5, hasta un pH de 2.5 en pectina y glucosa, y de 3.0 en el residuo de uva.

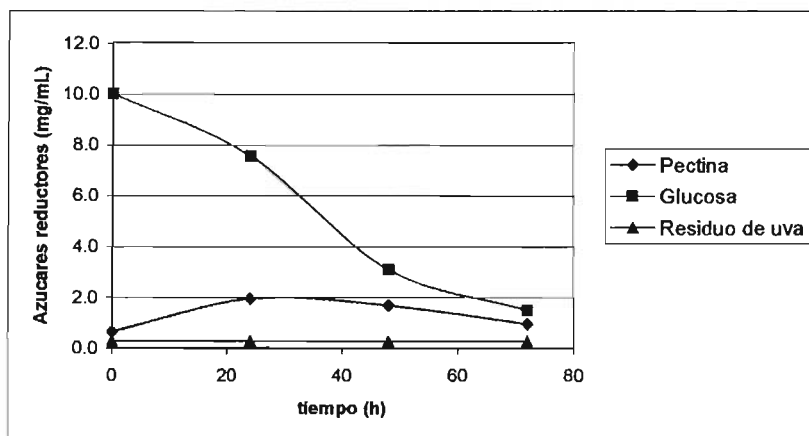
Al inspeccionar visualmente las fermentaciones se observó que el tipo de micelio obtenido en el medio de pectina fue de diminutas esférulas o pelets suspendidos en el medio, blancos. El micelio encontrado en la fermentación con glucosa y extracto de levadura fue de esférulas o pelets perfectamente esféricos blancos pequeños. No fue posible determinar la forma del micelio de la fermentación en residuo de uva ya que éste se adhiere a las partículas insolubles del residuo de uva.

## Fermentación en diferentes fuentes de carbono



**Figura 10.** Comparación del crecimiento celular entre dos fuentes de carbono.

De acuerdo a la figura 10, podemos observar que las curvas de crecimiento describen un comportamiento diferente para la fermentación en glucosa y para la fermentación en pectina. El crecimiento en glucosa es lineal, a diferencia de lo que ocurre en pectina. Así mismo, el crecimiento es más del doble en pectina que lo obtenido en glucosa. A pesar de la adición de extracto de levadura el crecimiento en glucosa es deficiente, lo cual llama la atención pues la glucosa es una de las moléculas más fácilmente asimilables por los microorganismos.



**Figura 11.** Comparación del perfil de azúcares reductores en diferentes fuentes de carbono.

## Fermentación en diferentes fuentes de carbono

---

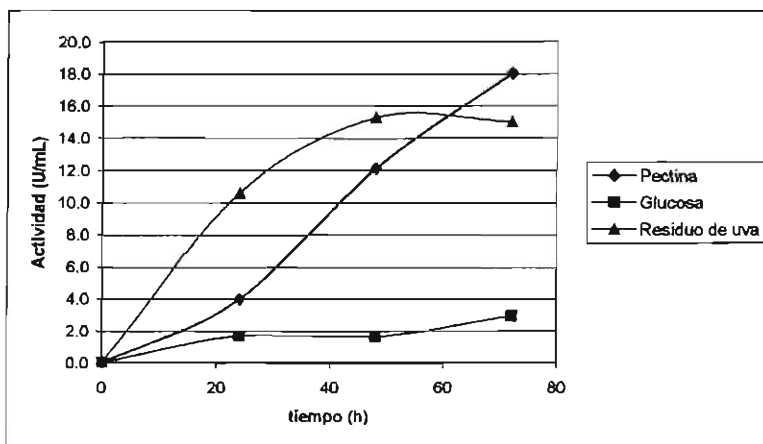
En la figura 11 se aprecian los perfiles de azúcares reductores en cada fermentación. En la fermentación con pectina observamos que la actividad de enzimas pectinolíticas genera azúcares reductores, algunos de ellos son asimilados y otros simplemente se van acumulando, este comportamiento es más evidente a las 24 horas de crecimiento donde se alcanza la máxima concentración de azúcares reductores en el medio ya que la acumulación de azúcares libres o reductores se ve beneficiada vs. consumo. Relacionando la curva de crecimiento celular con la de azúcares libres, observamos que unas horas antes de las 48 horas comienza la etapa de desaceleración, razón por la cual el consumo descende con respecto a la fase de crecimiento exponencial donde el consumo preponderaba sobre la acumulación. Después de la etapa de desaceleración del crecimiento podemos apreciar un balance entre consumo y acumulación de azúcares reductores, ya que la actividad pectinolítica es mayor (como se aprecia en la Figura 12), por lo tanto la tasa de hidrólisis aumenta, sin embargo como el hongo sigue un crecimiento constante, podemos decir que el hongo alcanza un consumo de azúcares reductores constante.

En el caso del perfil de azúcares reductores en la fermentación con glucosa al 1%, observamos un consumo franco de éstos, aunque el consumo es de poco más del 80% el crecimiento es limitado y no parece corresponder al nivel de consumo encontrado.

En el caso del residuo de uva, el nivel de azúcares reductores permanece constante durante toda la fermentación. Cabe mencionar que el residuo de uva fue exhaustivamente lavado con agua destilada, eliminando los azúcares reductores disponibles que pudieran ser utilizados como fuente de carbono fácilmente asimilable que pudiera disminuir la producción de enzimas pectinolíticas. El estado constante del perfil de azúcares reductores o libres puede deberse a que la velocidad de degradación de la pectina del residuo de uva es igual a la velocidad de asimilación de los productos de hidrólisis o bien a que los sustratos son liberados lentamente de las partículas sólidas del residuo de uva. Se cuenta con evidencia de crecimiento celular ya que se produjeron enzimas exopectinolíticas y endopectinolíticas (Figuras 12 y 13). A diferencia de las fermentaciones en glucosa y pectina que eran sistemas simples ya que solo existía una fuente de carbono, respectivamente, el residuo de uva representa una fuente de carbono compleja, ya que se trata de un residuo vegetal con distintos componentes como celulosa, hemicelulosa, lignina, etcétera, que pueden servir como fuente de alimento para el hongo y al mismo tiempo producir enzimas pectinolíticas que hidrolicen uno de los sustratos presentes en el medio, tal y como ocurre en la naturaleza.

## Fermentación en diferentes fuentes de carbono

A continuación se presenta el seguimiento de la actividad exopeptinólítica existente en el filtrado libre de células en las tres fuentes de carbono. (Figura 12)



**Figura 12.** Comparación de la actividad de la enzima exopoligalacturonasa entre tres diferentes fuentes de carbono.

Como se puede observar en la figura 12 la pectina es el sustrato en el que se produce una mayor actividad enzimática a las 72 horas. Sin embargo, en residuo de uva se obtiene mejor actividad a tiempos cortos (24 horas y 48 horas). Así mismo, se aprecia que en el filtrado con glucosa, se logra detectar cierta actividad enzimática, aunque no comparable con la actividad en residuo de uva o pectina.

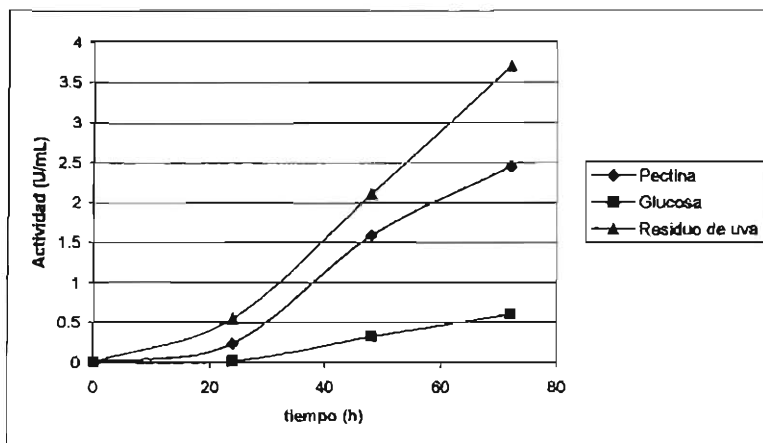
A pesar que con la pectina se obtiene una mayor actividad a tiempos largos de la fermentación es muy importante considerar que el residuo de uva es capaz de soportar la producción en menor tiempo que con la pectina. El alto nivel producción de pectinasas a tiempos cortos, con respecto a la producción en pectina, es debida muy probablemente a la baja concentración de reductores, la cual no ejerce represión catabólica por fuente de carbono.

El medio con glucosa registró niveles bajos de actividad aunque a las 72 horas de la fermentación se alcanza un valor apreciable. Este comportamiento vale la pena tratarlo de explicar ya que se ha reportado que las esporas no germinadas de *Aspergillus sp.* presentan exopeptinasas constitutivas asociadas a la célula y algunos hongos producen exopoligalacturonasas extracelulares constitutivas

## Fermentación en diferentes fuentes de carbono

(Aguilar y Hultrón, 1993), sugiriendo su participación como generadores de inductores para la producción del sistema pectinolítico completo.

La actividad endopectinolítica existente en el filtrado crudo libre de células en las tres fuentes de carbono.



**Figura 13.** Comparación de la actividad de la enzima endopoligalacturonasa entre tres diferentes fuentes de carbono.

La producción de la enzima endopoligalacturonasa en pectina se ve favorecida, sin embargo la producción es más abundante en el residuo de uva. El perfil de producción en ambos sustratos es similar, no se alcanza a apreciar un nivel de producción estacionario hacia el final de la fermentación en ninguno de los dos sustratos.

El poder inductor de la pectina presente en el residuo de uva sobre la producción de la enzima endopoligalacturonasa fue mayor que el poder inductor de la pectina. A partir del estudio de este parámetro podemos apreciar que el tipo de pectina que se encuentra en el residuo de uva es el más adecuado para la producción de la enzima endopoligalacturonasa. En base a lo anterior la preferencia por el sustrato de residuo de uva se puede deber a un grado de esterificación mayor que el de la pectina empleada (61%).

En el caso de la actividad producida en glucosa, se aprecia que a las 72 horas se alcanzan hasta 0.5 U/mL, esta actividad es interesante en cuanto a que el sustrato y la represión catabólica de *Aspergillus* no fomentarían una producción de enzimas pectinolíticas, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, existen enzimas acopladas a las esporas que generan inductores para la síntesis de pectinasas, cuando el medio así lo requiere. De acuerdo a los resultados arrojados tanto para la enzima exopoligalacturonasa como para la endopoligalacturonasa, la cepa FP 500 presenta cierta actividad principalmente a las 72 horas cuando crece en medio de glucosa ya que las esporas han germinado y liberan al medio dichas enzimas. Sin embargo, por la baja actividad se puede pensar que no son producidas *de novo* o bien que son producidas en forma constitutiva a niveles basales. La complejidad de la pectina hace que se desarrolle una maquinaria multienzimática compleja, dentro de esas enzimas algunas serán constitutivas y otras inducibles, por lo tanto es probable que la cepa 500 cuente con este tipo de sistema debido a su comprobada eficiencia en la producción de enzimas pectinolíticas. Múltiples formas de enzimas pectinolíticas han sido reportadas en *Aspergillus* (Zetalaki, 1976).

### 3. Fraccionamiento

Uno de los objetivos de esta investigación fue proponer un protocolo de fraccionamiento o semipurificación de la enzima endopoligalacturonasa, para lo cual se desarrolló este experimento.

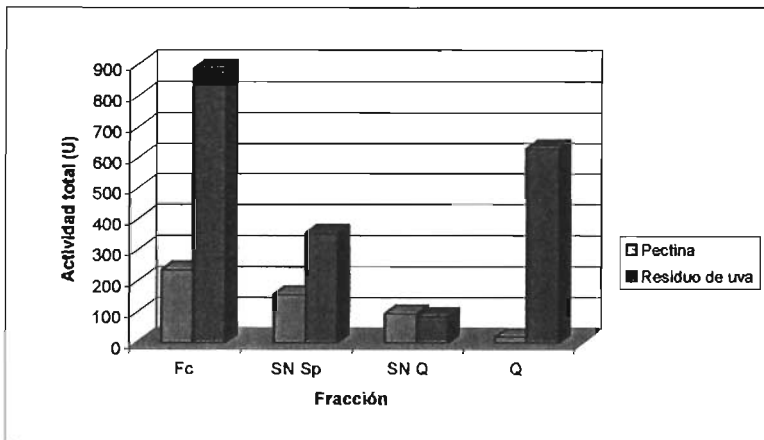
El filtrado obtenido a las 72 horas de fermentación con pectina con 61% de esterificación y esporas no lavadas se sometió al protocolo de fraccionamiento por intercambio iónico, con el propósito de recuperar la fracción que contenía la enzima endopoligalacturonasa. También se utilizó el filtrado enzimático de 72 horas de fermentación producido a partir de residuo de uva 1% como fuente de carbono (donde se produjo la mejor actividad endopectinolítica). A continuación se presentan los resultados del fraccionamiento (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados de la semipurificación o fraccionamiento.

Fuente de carbono	Fracción	Actividad total (U)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg <sub>prot.</sub> )
<b>Pectina</b>	Fc	234.4	32.45	7.22
	SN Sp	155.85	26.35	5.91
	SN Q	95.36	22.74	4.19
	Eluido Q	19.38	0.5428	35.7
<b>Residuo de uva</b>	Fc	889.2	51.45	17.28
	SN Sp	353.66	31.95	11.07
	SN Q	87.124	23.11	3.77
	Eluido Q	626.81	5.1	122.9

La nomenclatura utilizada corresponde a Fc, como el filtrado crudo a las 72 horas sin diluir; SN Sp, sobrenadante de la resina Sp™ (catiónica); SN Q™, sobrenadante de la resina Q™ (aniónica); Q, fracción eluida con NaCl 1M a través de la columna con resina Q™.

La siguiente figura (Figura 14) fue construida en base a la actividad total enzimática, es decir la actividad de la enzima endopoligalacturonasa en todo el volumen de filtrado obtenido de cada fracción.



**Figura 14.** Actividad de la enzima endopoligalacturonasa total de cada fracción producida en dos diferentes fuentes de carbono.

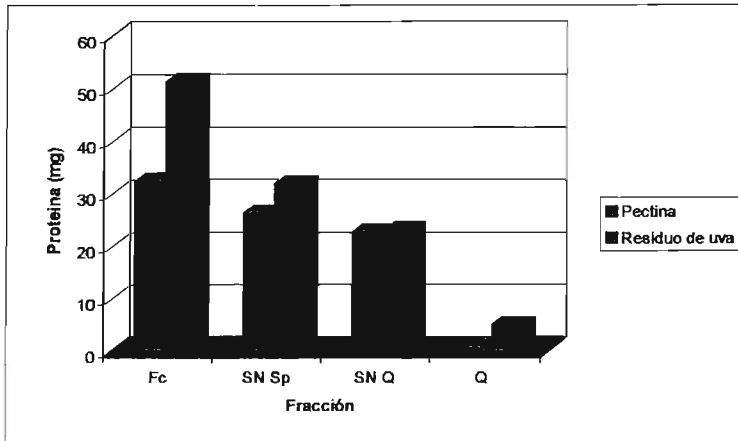


En la figura 14 se muestra la distribución de la enzima endopoligalacturonasa a través de la ejecución del protocolo de fraccionamiento, en la secuencia de tratamientos del filtrado. En principio partimos de la actividad inicial, es decir la del filtrado crudo. Al llevar a cabo el tratamiento con la resina catiónica se aprecia que cierta fracción del total de la enzima endopoligalacturonasa interactúa con la resina, ya que la actividad que se aprecia en el sobrenadante es menor a la encontrada en el filtrado original, posteriormente al tratar el filtrado con la resina aniónica, el sobrenadante presenta cierta actividad, es decir la enzima que no pudo ser adsorbida por la resina, que puede deberse a que la cantidad de resina adicionada no es suficiente para la cantidad de enzima presente en el filtrado. Finalmente observamos que la fracción eluída de la resina Q presenta la mayor actividad enzimática de todas las fracciones, para ambos casos, las enzimas producidas a partir de pectina y residuo de uva, lo anterior indica que la resina aniónica es la adecuada para adsorber más eficientemente la enzima de interés.

El enriquecimiento de la enzima endopoligalacturonasa proveniente de la fermentación en residuo de uva fue más eficiente al final del proceso que la enzima producida a partir de la fermentación en pectina. Inclusive como se aprecia en el experimento anterior, la actividad enzimática registrada en la fermentación en residuo de uva es mayor a la encontrada en pectina.

El analizar la actividad total de las fracciones da una idea más clara del desempeño del proceso de fraccionamiento o enriquecimiento de la enzima endopoligalacturonasa. En esta figura es más evidente la diferencia de recuperación de la fracción de la endopoligalacturonasa en residuo de uva vs. pectina.

A continuación se presenta la representación gráfica (figura 15) de la cantidad de proteína encontrada en cada fracción.



**Figura 15.** Proteína total de cada fracción producida en dos diferentes fuentes de carbono.

En la figura 15 podemos seguir la secuencia de fraccionamiento, el 100% de proteína esta contenida en el filtrado crudo, los tratamientos iónicos (catiónicos y aniónicos) reflejan una disminución en la cantidad de proteína inicial, es decir las resinas adsorbieron ciertas proteínas de acuerdo a su afinidad iónica.

Se puede observar que el filtrado enzimático de ambas fermentaciones es un medio complejo rico en proteínas y enzimas, entre las cuales se encuentra la endopoligalacturonasa, por lo que el protocolo propuesto es una buena herramienta para un primer fraccionamiento del filtrado.

El rendimiento de la actividad obtenida del fraccionamiento del filtrado crudo de pectina como fuente de carbono fue del 8.3%, mientras que el rendimiento del fraccionamiento del filtrado crudo de residuo de uva como fuente de carbono fue de 70.5%.

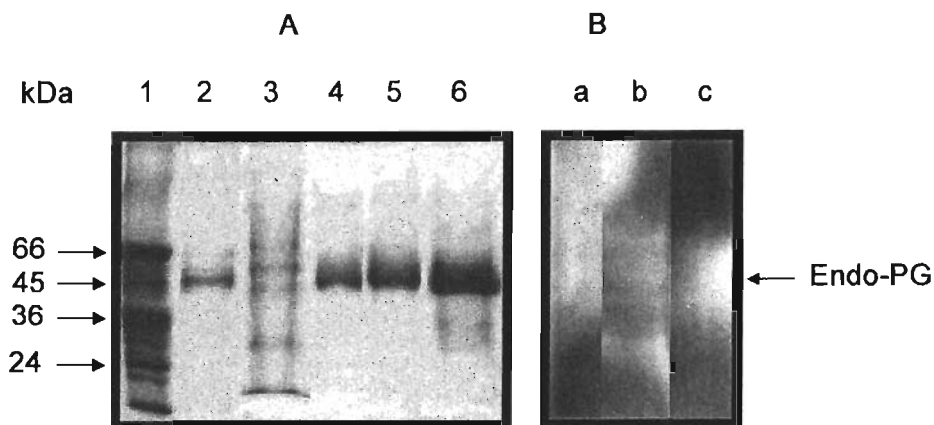
La semipurificación o fraccionamiento del filtrado crudo se realizó con los filtrados de las fermentaciones con pectina y con el residuo de uva. Como se puede apreciar en los resultados, el rendimiento de purificación del filtrado de pectina es bajo, ocurrió cierto enriquecimiento de la endopoligalacturonasa después del tratamiento con resinas iónicas aunque este no es tan eficiente como el de la fermentación con residuo de uva, lo anterior se puede explicar debido a la carga negativa intrínseca de la pectina que interacciona principalmente con la resina catiónica, reduciendo

los espacios disponibles para que las enzimas del medio con carga positiva puedan unirse a la resina SP, lo anterior puede dar lugar a rendimientos inconsistentes y probablemente explique los bajos rendimientos obtenidos en filtrado producido en pectina con respecto a los rendimientos encontrados en el filtrado proveniente del residuo de uva. Por otro lado, la concentración de pectina en el residuo de uva es presumiblemente muy baja y no presenta problemas con ninguna de las resinas, especialmente con la intercambiadora de cationes (SP) lo que redundaría en un mejor rendimiento. Por esta razón, resultó más adecuado usar una fuente de carbono sin problema de carga eléctrica y donde la actividad enzimática endopoligalacturónica fuera elevada por su contenido de pectina, el residuo de uva en este sentido fue la mejor elección, como se refleja en el rendimiento de la semipurificación, del 780.5%. El protocolo de purificación propuesto comparado con otros protocolos de purificación que implican diferentes métodos de purificación, es eficiente (aun para la fermentación con pectina) ya que se logra enriquecer la enzima de interés.

### ***3.1 Perfil electroforético y zimograma.***

A través de ésta técnica de separación de proteínas se pudo determinar cualitativamente el grado de pureza o enriquecimiento que alcanzó el filtrado enzimático al ser fraccionado con el protocolo de fraccionamiento propuesto.

En la figura 16 se muestra la electroforesis del filtrado de residuo de uva, ya que fue la separación más productiva, así como el zimograma que corresponde a la electroforesis pero incubada con pectina al 1% y revelado con rojo rutenio es el que se presenta a continuación.



**Figura 16. A.** Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE del filtrado fraccionado mediante intercambio iónico, 1: marcadores de peso molecular, 2: Fc, 3: SN Sp, 4: eluido Q (75 $\mu$ g), 5: eluido Q (100 $\mu$ g), 6: eluido Q (150 $\mu$ g). **B.** Zimograma del filtrado fraccionado mediante intercambio iónico a: Fc, b: SN Sp, c: eluido Q (150 $\mu$ g).

En la Figura **16A** podemos observar la secuencia de fraccionamiento del filtrado enzimático de la fermentación con residuo de uva. En el primer carril se corrieron marcadores de masa molecular. En el segundo carril se muestra el filtrado enzimático tal cual se obtuvo de la fermentación con residuo de uva al 1% W/V de 72 horas de esporas filtradas. El siguiente carril (carril 3) muestra las proteínas retenidas por la resina catiónica (resina Sp<sup>™</sup>). En los tres carriles contiguos (4, 5 y 6) se aprecia una banda a la misma altura pero con diferente grosor o intensidad, esta banda corresponde a la proteína retenida por la resina aniónica (resina Q XL<sup>™</sup>), a diferentes concentraciones (75  $\mu$ g, 100  $\mu$ g y 150  $\mu$ g). Se aprecia claramente el enriquecimiento de la banda que presumiblemente corresponde a la enzima endopoligalacturonasa. La comparación de la banda de los carriles 4, 5 y 6 con el carril 1 de marcadores de masa molecular reflejan que la masa de la enzima es de 48 a 50 kDa.

En la figura **16B** se muestra el zimograma donde se aprecian zonas traslúcidas que corresponden a pectina que ha sido hidrolizada, los productos de degradación no pueden ser teñidos por el rojo rutenio ya que este solo detecta la molécula de pectina. En el carril "a" podemos observar la actividad enzimática del filtrado crudo, se aprecia una amplia zona traslúcida, de acuerdo con las enzimas separadas apreciadas en la electroforesis desnaturalizante. En el carril "b" se aprecia la

actividad pectinolítica de las enzimas separadas en la fracción de la resina catiónica. En el carril "c" se aprecia exclusivamente una zona de actividad que corresponde a la enzima endopoligalacturonasa.

En la electroforesis desnaturizante en el carril 2 (filtrado crudo) se aprecian algunas bandas muy tenues, comparando el mismo carril en el zimograma podemos apreciar que existe una zona amplia de degradación de pectina, lo cual nos dice que la concentración de éstas proteínas es baja y es difícil apreciarlas en la electroforesis desnaturizante, sin embargo el poder pectinolítico del filtrado crudo se demuestra por la degradación de la pectina en el zimograma.

El análisis del sistema pectinolítico de la cepa 500 mediante geles de poliacrilamida SDS y zimogramas mostró una multiplicidad de bandas, aunque en la electroforesis presentada no se alcanzan a apreciar por su baja concentración. El perfil enzimático del filtrado crudo se puede complementar con las enzimas enriquecidas durante el intercambio con la resina catiónica. Las bandas tienen un peso molecular entre 25 a 70 kDa.

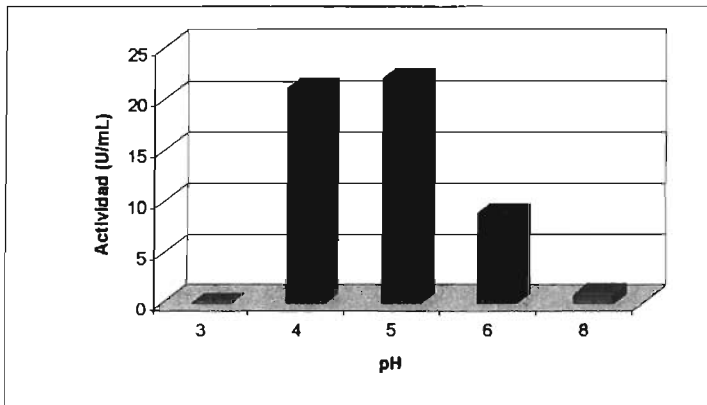
Todas las bandas presentaron actividad pectinolítica a pH 5, como se aprecia en el zimograma, que por el pH de actividad se cree que todas las bandas separadas corresponden a hidrolasas. Lo que da una idea del complejo sistema de multiplicidad enzimática de la cepa 500, como se ha llegado a describir para *Aspergillus niger*, hasta 7 poligalacturonasas distintas (Parenicová, 1998; De Vries y Visser, 2001).

Tanto en la electroforesis desnaturizante como en el zimograma se puede comprobar que el fraccionamiento del filtrado crudo fue adecuado y eficiente, ya que se presenta una sola banda con actividad pectinolítica.

### ***3.2 Determinación de la actividad de la enzima a diferentes pH y temperatura***

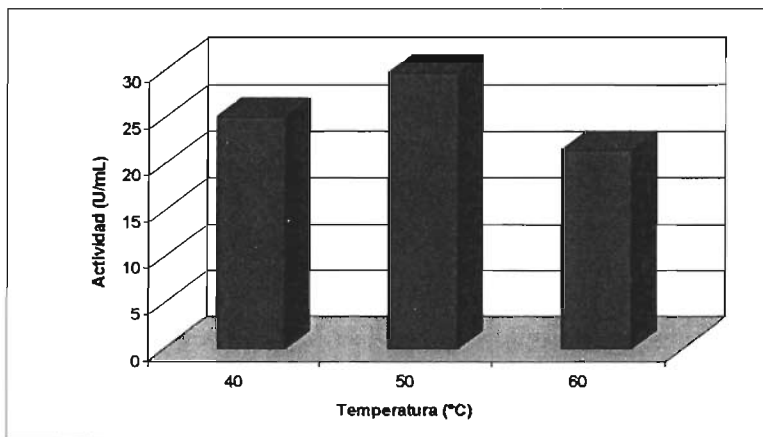
La caracterización del filtrado enzimático fraccionado se llevó a cabo teniendo como base la electroforesis desnaturizante y el zimograma, donde se aprecia actividad pectinolítica en la banda del filtrado fraccionado. Para evaluar el poder hidrolítico de esta fracción enzimática se evaluó la actividad exopectinolítica a diferentes valores de pH y temperatura.

La cuantificación de actividad variando el pH tuvo como variable fija la temperatura, todos los ensayos para evaluar la actividad a diferentes valores de pH fueron hechos a una temperatura constante de 50°C. Para la valoración de la actividad a diferentes temperaturas, la variable fija para el ensayo fue el pH de 5.



**Figura 17.** Actividad exopectinolítica en diferentes valores de pH de la enzima obtenida a partir del filtrado enzimático fraccionado.

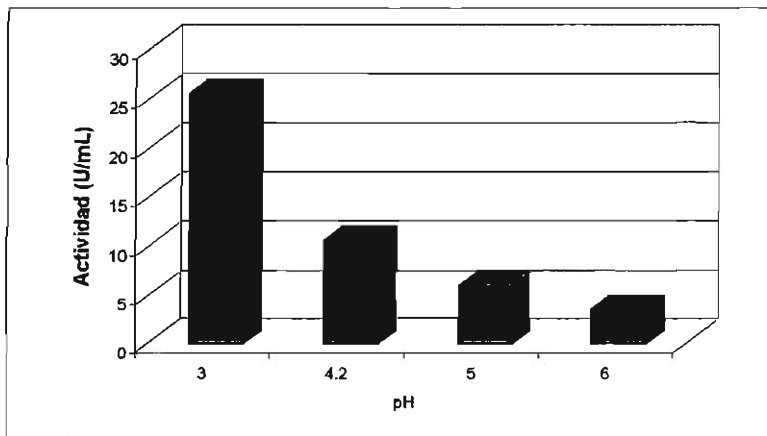
Se puede observar que el pH óptimo de la enzima exopoligalacturonasa es de 5, también se observa una actividad elevada a pH de 4.



**Figura 18.** Actividad exopectinolítica en diferentes valores de temperatura de la enzima obtenida a partir del filtrado enzimático fraccionado.

La temperatura óptima de la enzima exopoligalacturonasa obtenida de la fracción eluída de la resina Q es de 50°C, sin embargo también se observa una actividad elevada a 40°C.

Se evaluó así mismo la actividad endopectinólítica del filtrado fraccionado. En este caso solo se evaluó el efecto de diferentes valores de pH sobre la actividad, ya que el ensayo para la cuantificación de esta enzima requiere de cierta viscosidad de la pectina, al variar la temperatura esta viscosidad cambia. Por lo tanto la temperatura del ensayo fue de 30°C.



**Figura 19.** Actividad endopectinólítica en diferentes valores de pH de la enzima obtenida a partir del filtrado enzimático fraccionado.

El pH óptimo de actividad de la enzima endopoligalacturonasa obtenida del fraccionamiento del filtrado crudo es de 3.

En base a los resultados obtenidos en este experimento, se puede apreciar que el protocolo de fraccionamiento propuesto no solo recupera la enzima endopoligalacturonasa sino también la exopoligalacturonasa, al registrarse esta actividad en esta fracción. A partir de lo anterior, se puede decir que la carga iónica de ambas enzimas es muy parecida, así como su peso molecular, ya que en la electroforesis desnaturante no se alcanza a apreciar otra banda en el filtrado fraccionado.

Ambas proteínas obtenidas de la fracción eluída presentan una cinética y actividad similar a las reportadas (Parenicová, 1999; Iguchi, 1997).

## 4. Inmunoquímica

### 4.1 Obtención de anticuerpos policlonales de conejos.

En la Tabla 6, se presenta la cantidad de anticuerpo purificado por precipitación con sales, dializado y liofilizado para su conservación.

**Tabla 6.** Cantidad de anticuerpos purificados liofilizados.

Anticuerpo	Cantidad liofilizada (mg)
Ab anti espora cepa 500	416.2
Ab anti filtrado enzimático glucosa	210.7
Ab anti filtrado enzimático pectina	175.2
Ab anti micelio cepa 500	322.5

Los anticuerpos fueron resuspendidos en solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) a pH de 7.2 para tener una concentración de 10mg/mL, en el caso de los anticuerpos contra espora y micelio, para los anticuerpos anti filtrado enzimático la concentración final fue de 2mg/mL.

Por un lado, se produjeron anticuerpos contra esporas y micelio, dichas estructuras celulares fueron cosechadas con solución salina isotónica estéril y lavadas por centrifugación y resuspensión del botón siete veces. Para el caso del filtrado enzimático, las enzimas extracelulares juegan un rol muy importante como antígenos, sin embargo no se generan anticuerpos específicos de un solo tipo de enzima. Estos últimos anticuerpos fueron diseñados para evaluar si existen ciertas enzimas presentes en la superficie de la espora o del micelio, e inclusive la relación entre las enzimas producidas en glucosa y en pectina como fuentes de carbono.

### 4.2 Ensayo de doble inmunodifusión radial u Ouchterlony

Como un primer acercamiento para probar la especificidad y potencia de los anticuerpos purificados obtenidos, se optó usar la técnica de Ouchterlony o doble inmunodifusión radial en placas de agar, donde ambos sistemas, el antígeno y el anticuerpo, deberán reaccionar al toparse con su concentración equivalente, el producto de la reacción se traduce en una banda de precipitación.



Los antígenos probados en el orden de aparición de los cuatro sistemas son los siguientes:

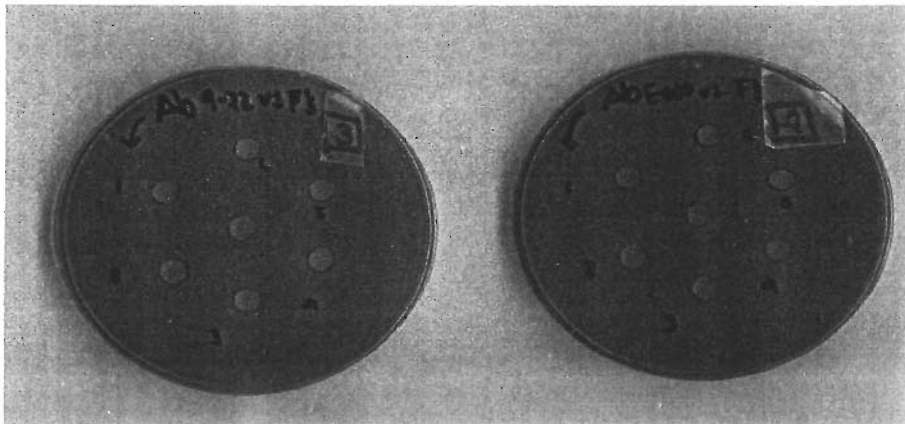
**Tabla 7.** Antígenos y concentraciones probadas

No. asignado en los sistemas Ouchterlony	Antígeno	Concentración
1	Filtrado enzimático crudo cepa 500 en pectina 1%	1:1
2	Filtrado enzimático crudo cepa 500 en glucosa 1% + YE 0.05%	1:1
3	Filtrado enzimático crudo cepa 500 en rayadura de limón al 1%	1:1
4	Filtrado enzimático crudo cepa 500 en pectina 1%	1:5
5	Filtrado enzimático crudo cepa 500 en glucosa 1% + YE 0.05%	1:5
6	Filtrado enzimático crudo cepa 500 en cáscara de limón al 1%	1:5

\* YE es extracto de levadura

\*\* En cada oradación se aplican 20µL de muestra.

Los resultados obtenidos son los siguientes:



**A**

**B**

**Figura 20.** Ouchterlony o sistema de doble inmunodifusión radial en caja

El sistema de doble inmunodifusión (Figura 20A) corresponde al anticuerpo contra filtrado enzimático de la cepa 500 y diferentes concentraciones de antígenos de filtrado enzimático crudo de fermentaciones en diferentes fuentes de carbono de la cepa 500 (Ab-F<sub>500</sub> a reaccionar con el F'S<sub>500</sub>). El Ouchterlony (Figura 20B) corresponde al sistema que conforman el anticuerpo contra espora cepa 500 concentración de 1mg/mL y diferentes concentraciones de antígenos de filtrado enzimático crudo de fermentaciones en diferentes fuentes de carbono de la cepa 500 (Ab-E<sub>500</sub> a reaccionar con el F'S<sub>500</sub>).

Como en ningún sistema fue posible observar a simple vista la reacción, se reveló con Azul Brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad Laboratories®) al 0.125% p/v, metanol al 50% v/v y ácido acético al 10% v/v durante 1 hora para después ser destefidos con una solución de ácido acético al 10% v/v. En ningún caso se detectaron bandas de precipitación, por lo que no podemos tomar el Ouchterlony como un acercamiento para identificar reactividad de los anticuerpos. No se encontraron resultados positivos por esta técnica.

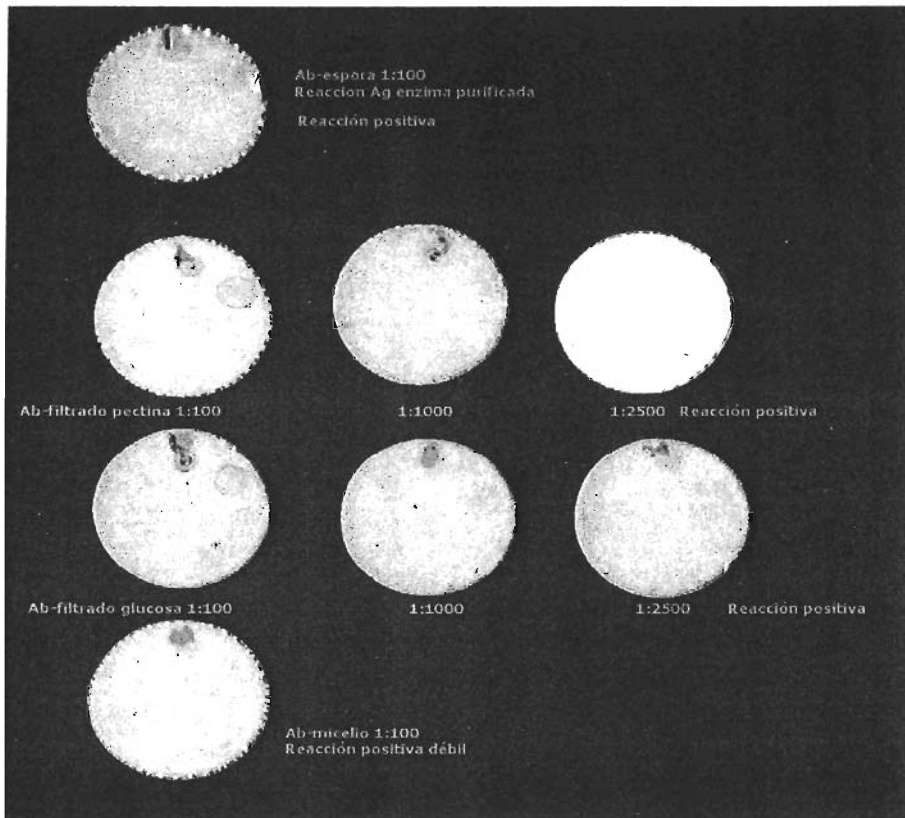
### **4.3 Inmunoblot**

Se utilizó una segunda técnica para probar la reactividad de los anticuerpos obtenidos, el Inmunoblot. El antígeno utilizado fue la fracción de la resina Q obtenida en el fraccionamiento de la fermentación del residuo de uva.

En el Inmno blot la primera reacción que ocurre es la reacción entre el antígeno adsorbido en la membrana de nitrocelulosa, que en este caso es la enzima fraccionada, y el anticuerpo a probar en el medio, para poder detectar la reacción antígeno-anticuerpo debe emplearse un segundo anticuerpo que reaccione con el primer anticuerpo, el sistema de detección fue con enzima peroxidasa de rábano acoplada al segundo anticuerpo. A continuación se presentan solo los sistemas en los que se detecto reacción entre la enzima peroxidasa y el sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se aprecia una mancha color café gracias al 4-Cl, 1-Naftol. El detectar la reacción implica que el anticuerpo acoplado a la enzima peroxidasa reaccionó con la fracción cristalizable del anticuerpo probado, es decir el anticuerpo que reaccionó con el filtrado obtenido del fraccionamiento.

**Tabla 8.** Resultados cualitativos del Inmunoblot.

Anticuerpo	Antígeno	Intensidad
Ab-espora FP 500	Endo-PG fraccionada	++
Ab-filtrado enzimático (pectina)	Endo-PG fraccionada	++++
Ab-filtrado enzimático (glucosa)	Endo-PG fraccionada	+++
Ab-micelio FP 500	Endo-PG fraccionada	+



**Figura 21.** Inmunoblot de sistemas que reaccionaron.

Se observa reacción positiva entre el anticuerpo contra esporas y la enzima endopoligalacturonasa. Los anticuerpos contra filtrados enzimáticos y la enzima endopoligalacturonasa presentan una reacción más intensa que la reacción Ab-espora y enzima endopoligalacturonasa. La reacción anticuerpo contra micelio y endopoligalacturonasa presenta una intensidad baja.

Los resultados del Inmunoblot son más confiables, ya que el ensayo es más específico y se pueden probar distintas diluciones de antígeno en sistemas aislados como se diseñó el experimento. Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios, por un lado ocurre una reacción intensa entre el anticuerpo contra el filtrado crudo de pectina y la fracción enriquecida de enzima endopoligalacturonasa, lo que implica cierta especificidad ante dichas enzimas. Por otro lado, la reacción de mediana intensidad entre el anticuerpo del filtrado enzimático proveniente de glucosa y la fracción eluída es muy importante ya que se puede inferir con este resultado y los obtenidos durante la caracterización de la fermentación, que efectivamente el multisistema enzimático de la cepa 500 posee enzimas pectinolíticas constitutivas presentes aun en un medio tan simple como el de glucosa. Otra conclusión que soporta esta idea es la reacción de cierta intensidad que presenta el anticuerpo de espora cepa 500 con la fracción enriquecida de enzima endopoligalacturonasa, donde dicha actividad nos puede decir que esas enzimas pueden estar presentes en la superficie celular durante el proceso de germinación, es decir son constitutivas ya que están presentes en la espora sin haber sido tratada o inducida por pectina o alguna otra fuente de carbono.

## V. Conclusiones

---

Se ha caracterizado el sistema de producción de enzimas degradadoras de pectina (hidrolítico) de *Aspergillus sp.* cepa FP 500. La máxima producción y secreción de pectinasas tiene lugar en medios suplementados con pectina o con sustratos con un alto contenido de esta (como el residuo de uva), ejerciendo, ambos, un efecto inductor. Sin ejercer un efecto inductor, en los medios suplementados con glucosa se encontró baja actividad enzimática.

La producción y secreción de endopoligalacturonasas y exopoligalacturonasas para la cepa 500 fue caracterizada en tres fuentes de carbono. La producción de dichas enzimas esta inducida por la pectina y se cree que existe una enzima constitutiva en base a los resultados obtenidos en glucosa.

La semipurificación y caracterización bioquímica de la fracción eluída enriquecida de enzimas endo y exo poligalacturonasa arrojó un perfil común para estas enzimas, aunque la enzima endopoligalacturonasa presentó su actividad máxima a un pH de 3.

Se ha probado que los anticuerpos que se obtuvieron reconocen estructuras de *Aspergillus sp.*, así como los filtrados enzimáticos.

Con este trabajo se han obtenido importantes herramientas para poder localizar las enzimas extracelulares de *Aspergillus sp.* en las esporas no germinadas y en el micelio a fin de poder dar otra pieza al rompecabezas de inducción, represión y enzimas constitutivas que envuelve a un sistema enzimático tan complejo.

## VI. Bibliografía

---

Aguilar G., Huitron, C., (1986) Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus sp.* Enzyme Microb. Technol., 8; 541-545.

Aguilar G., Huitron, C., (1987) Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose addition. Enzyme Microb. Technol., 9; 690-696.

Aguilar G., Huitron, C., (1990). Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus sp.* CH-Y1043. on different carbon sources. Biotechnol. Lett., 12; 655-660.

Aguilar G., Huitron, C., (1993). Conidial and mycelial-bound exo-pectinase of *Aspergillus sp.* FEMS Microbiology Letters, 108; 127-132.

Aguilar G., Trejo, B., García, J., Huitron, C., (1991). Influence of pH on endo- and exo- pectinase production of *Aspergillus sp.* CH-Y1043. Can. J. Microbiol., 37; 912-917.

Alkorta, I., Garcisu, C., Llama, M., Serra, J. (1997). Industrial applications of pectic enzymes: a review. Process Biochemistry, 33, 21-28.

Azuma, I., Kimura, H., Yamamura, Y. (1968). Purification and characterization of an immunological active glycoprotein from *Aspergillus fumigatus*. J. Bacteriol., 96, 272-273.

Baduí, S. (1988). Diccionario de Tecnología de Alimentos. Editorial Alambra Mexicana, México, 192.

Baker, D., Shiau, A. K y Agard, D.A. (1993). The role of pro regions in protein folding. Current Opinion in Cell Biology 5, 966-970.

Benen, J., Perenicová, L., Kusters-van, M., Kester, H., Visser, J. (1996). Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*. Pectins and Pectinases. Elsevier Sciences, The Netherlands, 14, 331-346.

Bolwell, G. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. Current Opinion in Plant Biology, 2, 287-294.

Bussink, H., B. Brouwer, L. H. de Graaff, C. Kester y J. Visser (1991). The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur. J. Biochem.* 208, 83-90.

Cherry, J., Fidantsef, A. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Current Opinion in Biotechnology.* 14, 438-443.

Côte, F., Hahn, M. (1994). Oligosaccharins: Structure and signal transduction. *Plant Molecular Biology*, 12, 1379-1411.

Côte, F., Hahn, M., Bergman, W. (1998). Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions: Generation, perception, and signal transduction. *Subcellular Biochemistry, Plant -microbe interactions.* Plenum Press, E.U.A, 385-431.

Daas, H., Arisz, W., Schols, A., DeRuiter, G., Voragen, J. (1998). Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 257, 195-202.

Doesburg, J., de Vos, L. (1959). *Memorias de Congreso. Proc. Vtb. Intern Fruchtafkongress, Viena,* 32-38.

Gams, W., Christensen, M., Onions, S., Pitt, I. Samson, A. (1985). Intrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Aspergillus and Penicillium systematics.* Plenum Press, E.U.A, 55-62.

Ghildyal, P., Ramakrishna, V., Devi, N., Lonsane, P., Asthana, N. (1981). Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. *Journal of Food Science Technology*, 18, 248-251.

Goodwin, T., Mercer, E. The plant cell wall. *Introduction to Plant Biochemistry.* Oxford, Pergamon Press, 55-91.

Grasdalen, H., Bakoy, E., Larsen, B. (1988). Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectin by <sup>1</sup>H-N.M.R. spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 184, 183-191.

Hadfield, K., Bennett, A. (1998). Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiol*, 117; 337-343.

Harmsen, J, Kusters-van Someren y Visser, J. (1990). Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene (*pel A*): identifications of a pectin lyase gene family in *A. niger*. *Curr. Genet.* 18: 161-166.

Hearn, V. (1994). Cell wall immunochemistry and infection. The Genus *Aspergillus* edited by Keith A. Powell. *EUA*, 341-350.

Hoondal, G., Tiwari, R., Dahiya, N., Beg, Q. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 408-418.

Igushi, K., Hirano, H., Kishida, M., Kawasaki, H., Sakai, T. (1997). Cloning of a protopectinase gene of *Thrichosporon penicillatum* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 143, 1657-1664.

John, J., Wilson, E., Hearn, V. (1984). Analysis of *Aspergillus fumigatus* germ tube surface structures by an immunofluorescent labeling technique. *Mykosen*, 27, 485-497.

Kashiap, R., Vohra, K., Cropra, S., Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77, 215-227.

Kawano, Y., dos Santos A., Said, S., Fonseca, V. (1999). Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 133-140.

Kennedy, J., Hayasaka, Y., Vidal S., Waters E., Jones, G. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agr. Food Chem*, 49; 5548-5355.

Kilara, A., Benchura, A. (1990). Enzymes. *Food Additives*. Editorial Dekker, E.U.A, 425-476.

Knox, J. (1997). The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology*, 171, 79-120.

Kofod, V., Kauppinen, S., Christgan, S., Adersen, L., Heldt.Hansen, H., Dorreich, K., Dalboge, H. (1994). Cloning and characterization of two structurally and functionally divergent rhamnogalacturonases from *Aspergillus aculeatus*. *J. Biol. Chem*, 269, 29182-29189.



Kojima, Y., Sakamoto, T., Kishida, M., Sakai, T., Kawasaki, H. (1999). Acidic condition-inducible polygalacturonase of *Aspergillus kawachii*. J. Mol Catal B Enzym, 6, 351-357.

Kotzekidou, P. (1991). Production of polygalacturonase by *Byssoschlys fulva*. Journal of Industrial Microbiology, 7, 53-56.

Lang C., Looman A. (1995). Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 44; 147-156.

Leuchtenberger, A., Mayer, G. (1992). Changed pectinase synthesis by aggregated mycelium of some *Aspergillus niger* mutants. Enzyme Microb. Technol, 14, 18-22.

Levitz, M., Diamond, D. (1985). Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* conidia to killing by neutrophils *in vitro*. J. Infect. Dis., 152, 33-42.

Low, S., Merida, R. (1996). The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. Physiol. Plant, 96, 533-542.

Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L., Randall, J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Matoh, T., Takasaki, M., Takabe, K., Kobayashi, M. (1998). Immunochemistry of rhamnoglacturonan II in cell walls of higher plants. Plant Cell Physiology, 39, 483-491.

May C.D. (1992). Thickening and gelling agents for food. Ed. Blackie Academic and Professional, E.U.A, 124-137.

McCann M., Bush, M., Milioni, D., Sado, P., Stacey N., Catchpole, G., Defemez, M., Carpita, N., Hofte, H, Ulvskov, P., Wilson, R., Roberts, K. (2001). Approches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. Phytochemistry, 57, 811-821.

McCann, M., Shi, J., Roberts, K., Carpita, C. (1994). Changes in pectin structure and localization during growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. Plant Journal, 5, 773-785.

Micheli, A. (1729). Nova plantarum genera. Illus. Plrentiae, 1-234.

Miller, L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.

Mort, J., Qiu, F., Maness, O. (1993). Determination of the pattern of methyl esterification in pectins. Distribution of contiguous non-esterified residues. *Carbohydrate Research*, 247, 21-35.

Mutter, M., Beldman, G., Schols, H., Voragen G. (1994). Rhamnogalacturonan  $\alpha$ -L-rhamnopyranosylhydrolase. A novel enzyme specific for terminal nonreducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiology*, 106, 241-250.

Nunan, K., Sims, I., Bacic, A., Robinson, S., Fincher, G. (1998). Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*, 118; 783-792.

Panda, T., Sushma, R., Nair, M. (2004). Regulation of synthesis of the pectolytic enzymes of *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 466-473.

Perenicová, L.; Benen, J., Kester, H., Visser, J. (1998). *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gen family from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 251, 72-80.

Perenicová, L. (1999). Pectinases of *Aspergillus niger*. A molecular and biochemical characterization. Tesis Doctoral, Wageningen University.

Perenicová, L., Kester, H., Benen, J., Visser J. (2000). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS Letters*. 467, 333-336.

Prade, R., Zhan, D., Ayoubi, P. y Mort, A. (1999). Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 16, 361-391.

Puente, P., Ovejero, M., Fernandez, N., Leal, F. (1991). Análisis of *Aspergillus nidulans* conidial antigens and their prevalence in other *Aspergillus* species. *Infect. Immun.* 59, 4478-4485.

Rexová-Benková, L. (1973). The size of the substrate-binding site of an *Aspergillus niger* extracellular endopolygalacturonase. *Eur. J. Biochem.* 39, 109-115.

Ridley, B., O'Neil, M., Mohnen, D. (2001). Pectins: Structure, biosíntesis, and oligogalacturine-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929-967.

Rodríguez, B. (1998). Identificación de algunos inductores de las pectinasas extracelulares producidas por *Aspergillus sp.* FP 180. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química-UNAM.

Rujiter, GJG, Visser, J. (1997). Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS, Microbiology Letters*, 151, 103-114.

Sakai, R., Sakamoto, T., Hallaert, J., Bañadme, J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213-294.

Saulnier, L., Thibault, F. (1987). Extraction and characterization of pectic substances from pulp of grape berries. *Carbohydr. Poly.* 7, 329-343.

Saval, S. (1985). Biotecnología de enzimas. UNAM-OEA-CONACyT, México, 203-215.

Soriano, M. (2004). Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus sp.* BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología-Universitat de Barcelona.

Turquois, T., Rinaudo, M., Taravel, R. y Heyraud, A. (1999). Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids*, 13, 255-262.

Van der Veen, P. (1991). PhD. Thesis, Research Institute for Plant Protection, Wageningen, Holanda.

Vicre, M., Jauneau, A., Knox, J., Driouich, A. (1998). Immunolocalization of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactan epitopes in the cell wall and Golgi sacks of developing flaks root tissue. *Protoplasma*, 203, 26-34.

Vidal, S., Williams, P, O'Neill, M.A., Pellerin P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I. tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45; 315-323.

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

Vries, R. (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 10-20.

Willats, W., Gilmarin, M., Mikkelsen, D., Knox, J. (1999). Cell wall antibodies without immunization: generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naïve phage display library. *Plant Journal*, 16, 57-65.

Willats, W., Knox, P. (1999). Immunoprofiling of pectic polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 268, 143-146.

Willats, W., Limberg, G., Buchholt, H., Alebeek, G., Benen, J., Christensen, T., Visser, J., Voragen, A., Mikkelsen, J. y Knox, P. (2000). Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research*, 327, 309-320.

Willats, W., Steele-King, C., McCartney, L., Orfila, C., Marcus, S., Knox, P. (2000). Making and using antibody probes to study plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 27-36.

Withaker, J. R. (1984). Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices (review). *Enzyme Microb. Technol.* 6, 341-349.

Whitaker, J. (1991). Microbial pectolytic enzymes. *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Elsevier Applied Science, Inglaterra, 133-175.

Zetelaki, K. (1976). Optimal carbon source concentration for the pectolytic enzyme formation of *Aspergilli*. *Proc. Biochem*, 1, 11-17.