



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

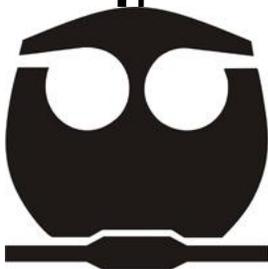
**Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre el  
crecimiento y la producción de enzimas por *Aspergillus  
flavus*, en sustratos complejos**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**GONZÁLEZ SOTO YESSICA ISABEL**



**MÉXICO, D. F.**

**AÑO 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: JOSE ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO

**VOCAL:** Profesor: JOSE GUILLERMO DE JESUS AGUILAR OSORIO

**SECRETARIO:** Profesor: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

**1er. SUPLENTE:** Profesor: MARTHA GILES GOMEZ

**2° SUPLENTE:** Profesor: MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: GRUPO DE FISIOLOGÍA DE HONGOS FILAMENTOSOS, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA: JOSE GUILLERMO DE JESUS AGUILAR OSORIO**

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE: GONZÁLEZ SOTO YESSICA ISABEL**

(nombre y firma )

El presente trabajo se desarrolló con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Proyecto No. IN209007, en el periodo 2009-2010 de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **Agradecimientos**

Al finalizar este arduo trabajo deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas sin las cuales, este trabajo no habría visto la luz, aunque no creo que con palabras sea capaz de expresar todo mi agradecimiento, espero que estas personas comprendan todo lo que han significado para mí durante todo este tiempo.

Al Dr. Guillermo Aguilar por su gran dedicación, su gran pasión por la investigación que han sido un ejemplo para mí, gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar con usted, por toda la confianza puesta en mí y por su apoyo siempre que lo he necesitado, por su gran calidad humana y sus grandes consejos, por fortalecer e iluminar mi mente, mi más sincero agradecimiento sin usted esta tesis no sería una realidad.

Quiero agradecer a mis papás, mi hermano y mi familia próxima. Sobre todo a mis padres porque desde pequeña me han apoyado en todas mis decisiones y han confiado en mí, por enseñarme el valor del esfuerzo, la dedicación y lo importante que es que cada persona trace su propio camino y siga su sueños. Por su eterno amor y cariño, que me han hecho la persona que soy

Cuándo nací conocí un color distinto a partir de tu mirada conocí la luz y el sol y la noche en la madrugada, en la oscuridad de la noche tú eras la estrella que me guiaba, eras la luna que me acompaña en todo momento estabas. Gracias a ti sigo viendo la vida de otro color. Por ti sigo teniendo ganas de luchar. Por ti y por la familia que me rodea, vale la pena vivir. Por ti sé lo que es el amor, querer y que te quieran. Por ti se vivir, gracias mamá por todo lo que me has enseñado y por ser la gran mujer que siempre has sido para mí y para mi hermano, por enseñarme a luchar a pelear contra la adversidad, a levantarme después de algún tropiezo, por tu ternura y amor. También gracias a esas grandes mujeres que han estado a mi lado y que en algún momento fueron como mis madres. Gracias abue, tía Gloria, Isabel y Abdulia.

Siempre has sido un gran hombre para mi, siempre me has cuidado y me has protegido, Me apoyas, me escuchas me comprendes y me alientas, gracias papá por todo lo que me has dado, por tu amor y paciencia.

Muchas gracias hermano porque desde que llegaste has puesto a prueba mis sentimientos, mi razón y mi paciencia, por compartir tantas cosas y las que seguiremos compartiendo, estoy orgullosa de ti y admiro tu espíritu libre, también gracias a Amaury por su sinceridad y tan divertidos momentos.

No me puedo olvidar de mis grandes amigas a las que veo poco, pero que siempre me perdonan y con las que he pasado, paso y espero seguir pasando muy buenos momentos. A Beatriz por su apoyo y ánimo, a Briseida por ser tan original y divertida, a Carol por ser tan especial y dulce, y a Paola por toda su paciencia, apoyo, por ser mi compañera de carrera y amiga con la que he compartido tantas cosas en la vida.

Gracias es la mejor palabra que puedo utilizar para expresar cuanto aprecio la mano que se me ha tendido, los gestos de solidaridad, la amistad sin condiciones que me han ofrecido. Con gracias hago saber lo especiales que son, lo importante que han sido en momentos difíciles y como me han ayudado enfrentar los problemas, muchas gracias a mis amigos; a Dennis por su entrega, lucha y superación día a día, a Ernesto por su consejos, apoyo, reflexiones, y eterna amistad, a Eduardo por sus palabras precisas y sinceras, Luis gracias por dejar una huella en mi vida y abrir mis ojos en momentos de oscuridad, y a Sergio por su sinceridad, energía y entrega. Gracias por recordarme que hay valiosas personas en el mundo y gracias por estar en el mío, por dejarme entrar en sus vidas y compartir conmigo un poquito de cada uno de ustedes

Estos años no hubiesen sido los mismos sin la presencia de mis compañeros de laboratorio, así que me gustaría expresarle mi agradecimiento, a Brenda por su ayuda para no perder el ánimo, por escucharme, su sinceridad y gran corazón, a Kiev por su confianza, comprensión y franca amistad y a Paulina por su sonrisa, buen humor y gran amistad, gracias por su ayuda y todos esos agradables momentos. Agradezco a Carlos Gómez por estar siempre disponible, por discutir de química y la vida, y por los valiosos comentarios e ideas que me han ayudado en el desarrollo de esta tesis.

Y por ultimo agradecer a esta hermosa Universidad por permitirme crecer en todos los aspectos de mi vida y mi persona, porque aquí he vivido la mejor etapa de mi vida.

Gracias a las personas que están aquí conmigo, a las que están lejos y a las que ya no están. Gracias a todos ellos por sus sonrisas y por su eterno amor.

*Jessica Isabel González Soto*

## Contenido

I.	Resumen .....	8
II.	Introducción.....	9
III.	Antecedentes .....	10
III.1	Pared celular de las plantas.....	10
	Celulosa.....	13
	Hemicelulosa .....	15
	Pectina.....	18
III.2	Biodegradación de la pared celular de las plantas .....	23
	Degradación de celulosa .....	25
	Degradación de xilano .....	26
	Degradación de pectina .....	27
	Enzimas accesorias .....	29
III.3	Residuos agrícolas .....	30
III.4	Berenjena .....	32
	Morfología .....	33
	Composición química de la berenjena .....	34
	Usos.....	36
III.5	Generalidades de los hongos filamentosos .....	37
	Conidio y micelio .....	38
III.6	Género <i>Aspergillus</i> .....	39
III.7	Aplicaciones industriales de las enzimas .....	43
	Enzimas celulolíticas.....	44
	Enzimas xilanolíticas.....	44
	Enzimas pectinolíticas.....	45
IV.	Justificación.....	47
V.	Objetivos .....	48
	Objetivo General.....	48
	Objetivos Específicos.....	48
VI.	Material y Métodos .....	49
1.	Microorganismo .....	49

2. Inóculo .....	49
3. Medios .....	49
4. Condiciones de cultivo .....	50
a) Condición 1.....	50
b) Condición 2.....	50
c) Condición 3.....	52
5. Métodos.....	53
5.1 Extracción enzimática.....	53
5.2 Determinación de azúcares reductores .....	53
5.3 Determinación de actividades enzimáticas.....	54
a) Actividad xilanolítica.....	54
b) Actividad pectinolítica .....	54
c) Actividad celulolítica.....	55
5.4 Determinación de proteína .....	55
5.4 Electroforesis.....	56
5.6 Zimogramas (Actividad <i>in situ</i> ).....	56
VII. Resultados y Discusión.....	58
Medio líquido .....	58
Material vegetal biológicamente activo .....	66
Medio sólido (Colonia completa).....	70
Medio sólido (Micelio vegetativo).....	83
Análisis de geles SDS-PAGE .....	89
IX. Conclusiones.....	97
X. Bibliografía .....	99

## I. Resumen

En éste trabajo se identificaron las enzimas producidas por *Aspergillus flavus* y la relación entre la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento y la secreción de enzimas, en diversas condiciones empleando como fuente de carbono sustratos complejos como el salvado de trigo y berenjena. Éste hongo es uno de los más abundantes y con mayor distribución mundial, tiene la capacidad de desarrollarse en muchos sustratos como plantas, árboles, animales y muchos tipos de granos. Se empleó un modelo biológico activo, la berenjena, para estudiar la degradación del material vegetal por el hongo como sucedería normalmente en la naturaleza.

También se evaluó la producción de enzimas en medio líquido y sólido, en donde se encontró la producción de xilanasas, pectinasas y celulasas, cuyos niveles varían de acuerdo al sistema de cultivo utilizado. En el caso del medio líquido se evaluó efecto del aire en la producción enzimática, realizando experimentos en condiciones estáticas y con agitación constante.

Para el medio sólido se desarrolló un sistema de crecimiento utilizando membranas de policarbonato, con el cual se evaluó el crecimiento, el consumo de sustrato y la producción de enzimas, este sistema también permitió el estudio de la morfología y su efecto sobre la producción enzimática. En estos sistemas, tanto con una membrana de policarbonato (micelio esporulado) y con dos membranas de policarbonato (micelio vegetativo) la expresión de los sistemas enzimáticos varió dependiendo el sustrato en el que se desarrollo.

## II. Introducción

El género *Aspergillus* está conformado por alrededor de 175 especies, y es el más abundante en el mundo. *Aspergillus flavus* es un hongo con gran distribución en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, tiene una gran importancia en la agricultura debido a que produce un micotoxina muy potente (aflatoxina B<sub>1</sub>) lo que representa un gran peligro a la salud. Este hongo es un saprofito importante que crece sobre una gran variedad de sustratos simples y complejos (celulosa, quitina, pectina, xilano) y secreta una gran variedad de enzimas para su desarrollo; como proteasas, lipasas, amilasas, hidrolasa, etc., lo que lo hace atractivo en la producción industrial.

El interés sobre el estudio de la aplicación de enzimas en la industria se ha incrementado de manera importante, debido a que han mostrado ser una herramienta con una elevada eficiencia catalítica, que no daña el medio ambiente y que tiene una alta rentabilidad económica utilizando sustratos de bajo costo, como los desechos agrícolas.

Las células microbianas son la fuente usual de enzimas para uso industrial, exceptuando algunas provenientes de animales y plantas. Las enzimas microbianas disponen de una gran variedad de actividades catalíticas, usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, baratas, de forma regular, con una calidad uniforme además de que los procesos de producción son fáciles y seguros.

### III. Antecedentes

#### III.I Pared celular de las plantas

La pared celular de la planta cumple en primer lugar la función esencial de mantener la forma de la célula y dotar al tejido de resistencia mecánica; sin ella los vegetales no podrían mantener su tamaño y forma, además tiene otras funciones fisiológicas ya que actúa como barrera eficaz de protección frente a organismos patógenos y depredadores, participa en el control de la expansión celular y del transporte intracelular, sirve como almacenamiento de reservas y constituye una fuente de señales celulares que desencadenan diversos procesos como la protección ante un patógeno. (Vorwerk, Somerville, & Somerville, 2004)

Para que los agentes patógenos puedan invadir satisfactoriamente a los tejidos de las plantas necesitan sintetizar un gran número de diferentes enzimas que hidrolizan la celulosa y la hemicelulosa. (Khandeparker & Numan, 2008; Vorwerk, Somerville, & Somerville, 2004)

La pared celular de plantas se compone de 3 capas: lámina media, pared primaria y pared secundaria. Figura 1.

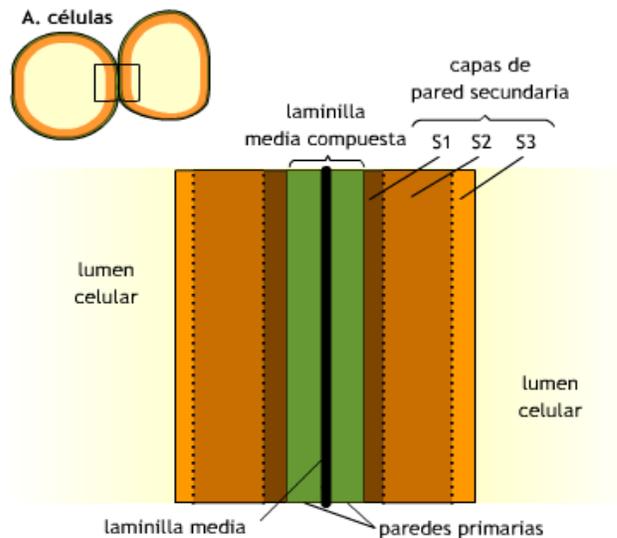


Figura 1. Pared celular de las plantas [www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-2pared1.htm](http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-2pared1.htm)

La pared primaria está presente en todas las células vegetales, usualmente mide entre 100 y 200 nm. de espesor y es producto de la acumulación de 3 ó 4 capas sucesivas de microfibrillas de celulosa. La pared primaria se crea en las células una vez que está terminando su división, generándose el fragmoplasto, una pared celular que dividirá a las dos células hijas. La pared primaria está adaptada al crecimiento celular, las microfibrillas se deslizan entre ellas produciéndose una separación longitudinal mientras el protoplasto hace presión sobre ellas. La composición de la pared celular varía de una especie a otra (Minic & Jouanin, 2006; Sandrim, Rizzatti, & Terenzi, 2004).

La pared secundaria, es la capa más adyacente a la membrana plasmática, se forma en algunas células una vez que se ha detenido el crecimiento celular y se relaciona con la especialización de cada tipo celular. A diferencia de la pared primaria, contiene una alta proporción de celulosa y lignina (Minic & Jouanin, 2006)

La lámina media es el lugar en la que se unen una célula con otra, es rica en pectina y otras sustancias adhesivas, lo que permite la unión de las células.

En el interior de las capas coexisten dos fases: una microfibrilar y altamente cristalina, compuesta de celulosa, y una matriz amorfa compuesta fundamentalmente de pectinas y hemicelulosas. La matriz contiene también cantidades significativas de glicoproteínas. Todos estos componentes interaccionan entre sí mediante varios tipos de enlaces, covalentes, iónicos, y puentes de hidrogeno, formando un complejo estructural rígido. Además hay interacción entre los diferentes polímeros, hemicelulosa-lignina, celulosa-lignina y pectina-hemicelulosa, etc. (Subramaniyan & Prema, 1999). Figura 2.

La celulosa es el principal constituyente de la pared celular, se trata de un polímero lineal de residuos de glucosa (alrededor de 8000 a 12000 unidades), unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. Se presenta como estructuras ordenadas, en forma de fibras, cuya principal función es el asegurar la rigidez de la pared celular de

plantas. En la pared celular primaria las microfibrillas de celulosa tienen un diámetro aproximado de 3 nm y generalmente consiste en 36 cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano. (Lerouxel, Cavalier, Liepman, & Keegstra, 2006)

La hemicelulosa es el polisacárido más heterogéneo y es la segunda estructura más abundante en la pared celular, cumple con la función de aglutinar las fibras cristalinas de celulosa, dando consistencia a la pared (Paz-Lago & Hernández, 2000). El principal polímero de hemicelulosa en cereales es el xilano, que es un polisacárido constituido por unidades de D-xilosa, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. El segundo polímero más importante encontrado en la hemicelulosa es el glucomanano, que consiste en unidades de D-manosa y D-glucosa, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 y sustituidas con residuos de D-galactosa. Otro componente de la hemicelulosa es el xiloglucano, constituido por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 y sustituidas por unidades de D-xilosa. (Lerouxel, Cavalier, Liepman, & Keegstra, 2006)

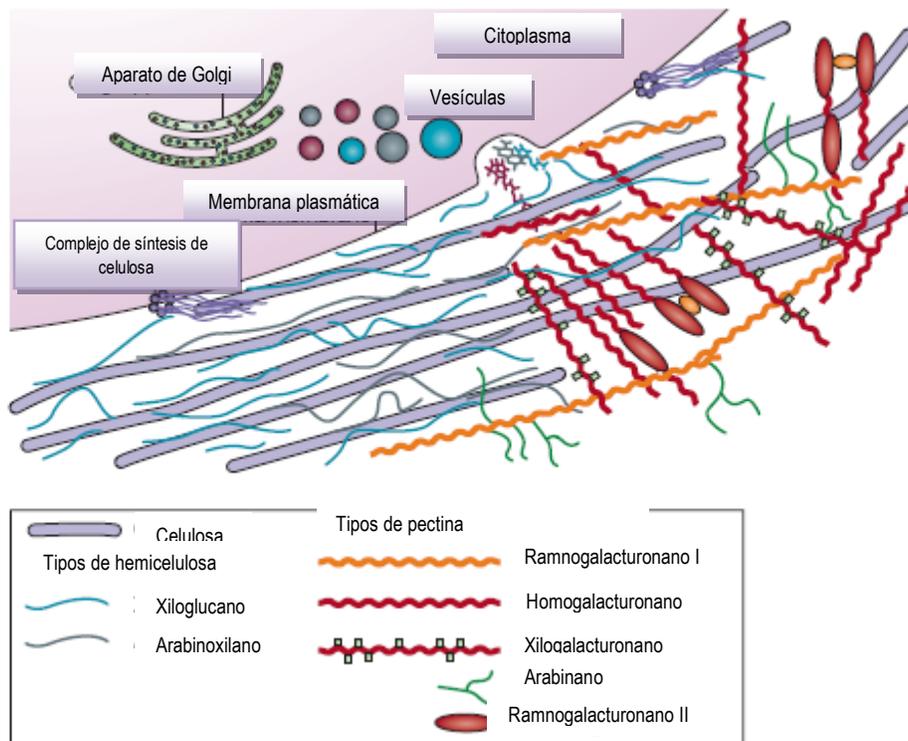


Figura 2. Pared celular de las plantas. (Cosgrove, 2005)

La pectina es un polisacárido que se encuentra en el lámina media de la pared celular de las plantas y contribuye en la forma estructura de las plantas así como en la protección de enfermedades. Su componente principal es una cadena lineal constituida de unidades de ácido- $\alpha$ -D-galacturónico unidos por enlaces glicosídicos (1-4). (Bonnin, Clavurier, Daniel, Kauppinen, Mikkelsen, & Thibault, 2008) Figura 2.

### **Celulosa**

La celulosa es un polisacárido de cadena lineal compuesto de monómeros de D-glucosa con unidades  $\beta$ -1,4. Es el polisacárido más abundante y su función es principal es asegurar la rigidez de la pared celular vegetal. La configuración  $\beta$  le permite formar cadenas largas y lineales, (Ovando-Chacón & Waliszewski, 2005) llamadas microfibrillas, a través de uniones tipo puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waal's, formando estructuras cristalinas, (Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006) con cadenas orientadas paralela y anti paralelamente resistentes a la hidrólisis. (Minic & Jouanin, 2006) Figura 3.

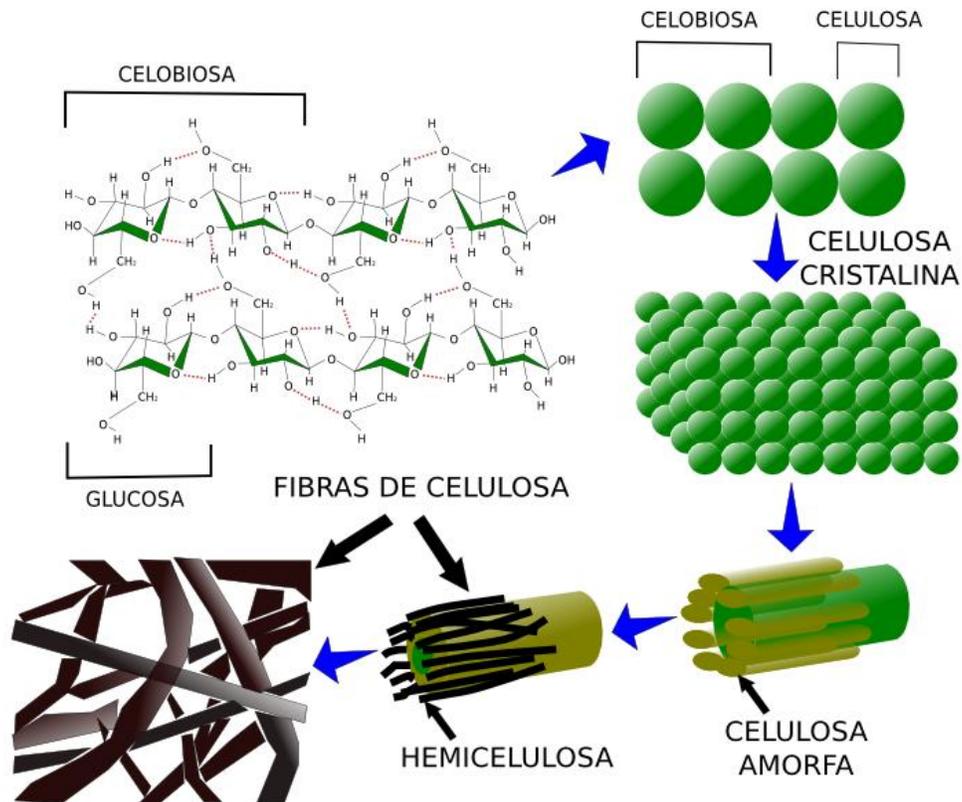


Figura 3. . Estructura de la celulosa

<http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/imagenes/matriz-celulosa.png>

La abundancia de grupos hidroxilo en la celulosa contribuye en la insolubilidad de la celulosa en agua. El grado de polimerización (DP) de la celulosa varía según la especie

Muchas son las utilidades industriales que se le pueden dar a la celulosa, como en la industria de alimentos y la farmacéutica, se pueden generar diferentes compuestos con diversas propiedades funcionales por ejemplo, la carboximetil celulosa se utiliza como espesante, la celulosa microcristalina que es usada como anticompactante y en la elaboración de tabletas en la industria farmacéutica.

## Hemicelulosa

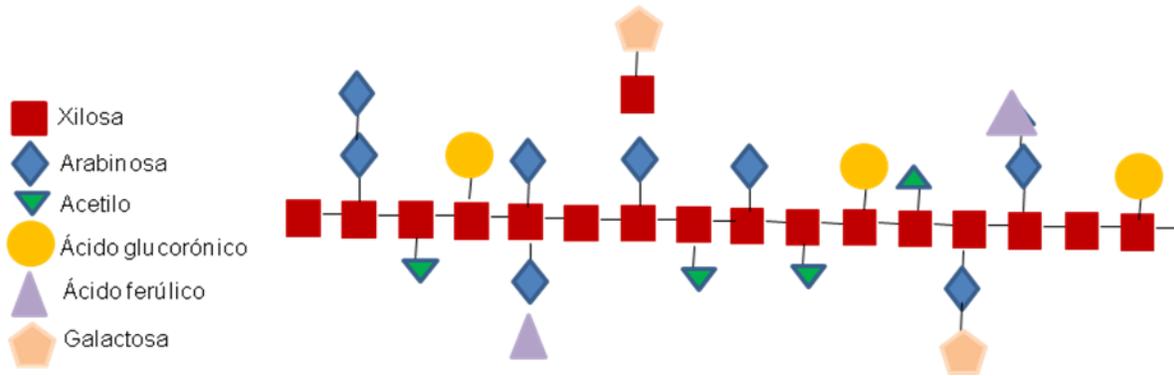
El grupo de las hemicelulosas constituye el segundo grupo de polisacáridos más abundante en las plantas compone más del 30-35% del peso seco de la pared celular de la planta (Minic & Jouanin, 2006). Son polisacáridos heterogéneos, su composición química consta de pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa), ácidos urónicos (galacturónico y glucorónico) y algunos desoxiazúcares, que se agregan como una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas (Beg, Kapoor, Mahajan, & Hoondal, 2001).

La hemicelulosa es sintetizada en el aparato de Golgi y es excretada dentro de la pared celular. (Minic & Jouanin, 2006). La estructura y organización variable de la hemicelulosa hacen un polímero de alto peso molecular, insoluble y asociado a lignina y celulosa. (Shallom & Shoham, 2003)

La hemicelulosa se encuentran en la pared celular, desde la lámina media hasta la lámina S<sub>3</sub>; siendo más abundantes en S<sub>1</sub> y S<sub>3</sub> y en menor proporción en la lámina S<sub>2</sub> (Figura 1)

El principal polímero de hemicelulosa en cereales es el xilano, que es un polisacárido constituido por unidades de D-xilosa, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, que pueden estar sustituido por residuos de L-arabinosa, D-galactosa, acetilos, ácido glucorónico, ferúlico y *p*-cumarílico (Sandrim, Rizzatti, & Terenzi, 2004). Es un polímero estructural muy abundante, llegando a representar un 30-35% del peso seco. (Beg, Kapoor, Mahajan, & Hoondal, 2001) Figura 4.

En las plantas el xilano se encuentra entre las microfibras de celulosa y la lignina, y está unido a través de enlaces covalentes y puentes de hidrogeno en varios puntos con la lignina (Figura 5), dándole a la planta integridad y ayuda en la protección contra la degradación e invasión. (Beg, Kapoor, Mahajan, & Hoondal, 2001). El xilano constituye la tercera parte de todo el carbón orgánico renovable sobre la tierra. (Paz-Lago & Hernández, 2000; Ratanachomsri, y otros, 2006)

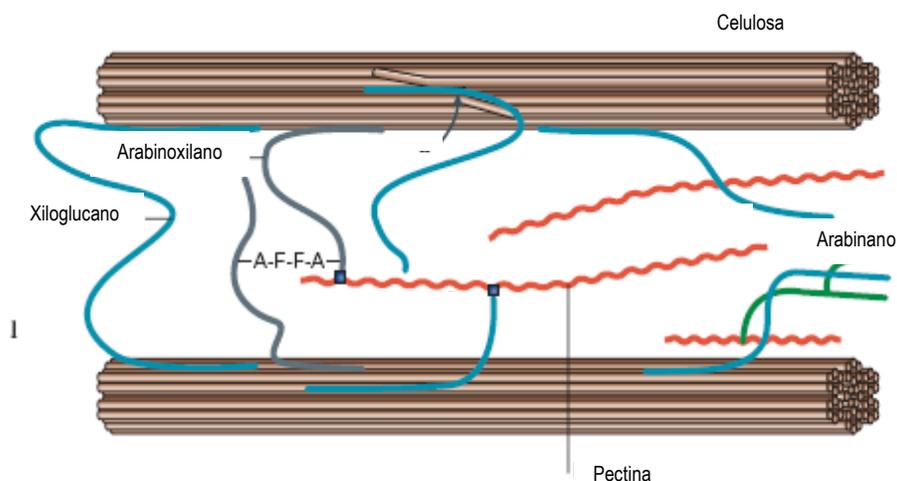


**Figura 4.**Representación esquemática del xilano. (De Vries & Visser, 2001)

El segundo polímero más importante encontrado en la hemicelulosa es el glucomanano, que consiste en unidades de D-manosa y D-glucosa, unidas por enlaces  $\beta(1-4)$  y sustituidas con residuos de D-galactosa. La proporción es de 1:3 (glucosa-manosa) y la secuencia de glucosa y manosa es arbitraria, además los residuos de manosa pueden estar acetilados.

Los hexosanós están formados por glucosa y manosa formando glucomananos y cuando están presentes la galactosa, glucosa y manosa, forman los galactoglucomananos.

Los mananos y galactomananos presentes en las paredes celulares juegan un papel de reserva energética y absorción de agua. Consiste en una cadena de manosa unidas por enlaces  $\beta(1-4)$  y cuando aparece un residuo de galactosa este se une a la manosa mediante enlace  $\beta(1-6)$ , los mananos pueden formar estructuras cristalinas de gran dureza.



**Figura 5. Interacción de la hemicelulosa con la celulosa y pectina. (Cosgrove, 2005)**

El glucoromanano está presente en pequeñas cantidades en muchas especies, es una cadena principal de manosas unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$  y residuos de ácido glucorónico unidos por enlaces  $\beta(1-2)$  y, posiblemente en secuencias alternadas. Las cadenas laterales incluyen xilosa y arabinosa.

Los xiloglucanos están presentes en gran número de semillas, la cadena principal está formada por glucosa unidas por enlaces  $\beta(1-4)$  a la mayoría de las cuales se unen residuos de xilosa por enlaces  $\alpha(1-6)$ , algunos residuos de xilosa están a su vez sustituidos por fucosa  $\alpha(1-2)$ , por galactosa  $\beta(1-2)$  y ocasionalmente por arabinosa.

De los pentosanos que están constituidos por arabinosa y xilosa, los más importantes presentes en la madera son los arabinoxilanos. La arabinosa en el arabinoxilano está conectada a la cadena de xilano vía enlace  $\alpha-1,2$  ó  $\alpha-1,3$  ya sea como un solo residuo o en una cadena corta, con una incidencia de aproximadamente un 12% en los residuos de xilosa. Estas cadenas laterales también pueden contener xilosa unida a la arabinosa por enlace  $\beta-1,2$  y galactosa que también puede estar unida a la arabinosa pero por enlace  $\beta-1,5$  o por  $\beta-1,4$  a la xilosa.

En el glucuronoxilano el ácido glucorónico y su 4-O metil éster están unidos al xilano por enlace  $\alpha$ -1,2. Este tipo xilano está altamente acetilado y esta acetilación es más frecuente en el C-3 que en el C-2. La presencia de estos grupos acetil son los responsables de la solubilización parcial del xilano en el agua, y pueden ser removidos cuando el xilano está expuesto a una extracción con álcali.

La hemicelulosa es usada en la fabricación de papel aumentando el rendimiento de la pulpa celulósica, aumenta la resistencia de las fibras debido a que actúa formando enlaces entre ella. La hidrólisis de la hemicelulosa puede producir mezclas de azúcares que pueden ser utilizados en la alimentación animal.

Los principales productos del xilano, de importancia, son el furfural y el xilitol. Los productos de hidrólisis del xilano (xilosa y oligosacáridos) tienen posibles aplicaciones en la industria de alimentos como espesante o como sustituto bajo en calorías y como aditivos anticongelantes, en la industria farmacéutica el xilano es usado como agente directo para tabletas y en combinación con otros componentes, además puede ser usado en tabletas de liberación prolongada. El furfural constituye la materia prima básica para la industria tales como: fármacos, biocidas y resinas furánicas.

## **Pectina**

La biosíntesis de la pectina puede hacerse a través de un derivado vía inositol; el L-bornesitol, el cual sufre una oxidación formando un intermediario llamado  $\alpha$ -D-ácido metilesterglucorónico, seguido de una epimerización generando el azúcar que servirá como parte conformadora de la sustancia péctica, el ácido galacturónico, la L-ramnosa u otros azúcares neutros, los cuales son transportados al aparato de Golgi. Estos polímeros son posteriormente empacados en vesículas y exportado, para fusionarse a la pared celular, siendo un proceso controlado por la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  presente. (Minic & Jouanin, 2006)

Las pectinas tienen un papel esencial en la estabilidad de la pared al actuar como material aglutinador de las fibras de celulosa. Entre frutas y verduras, las sustancias pécticas constituyen un factor determinante de la textura y firmeza, y por tanto la calidad del producto. El ablandamiento característico de las frutas al alcanzar la madurez se debe al aumento de las enzimas pectinolíticas.

La pectina es uno de los polisacáridos más abundantes de la naturaleza, ya que es parte constituyente de la pared celular, alrededor del 35% de peso seco, junto con otros polisacáridos a los cuales se encuentra asociada como son: la celulosa, la hemicelulosa (xilosa, galactomanos, galactomananos, xiloglucanos) y lignina. Se encuentra localizada en la lámina media de los tejidos vegetales. (Bonnin, Clavurier, Daniel, Kauppinen, Mikkelsen, & Thibault, 2008)

La función principal es el de ser material de adhesión entre las células, lo cual proporciona rigidez al tejido vegetal, de ahí, proviene su nombre, ya que pectina, proviene del griego “pektos” que quiere decir rígido.

La pectina está en mayor cantidad en los frutos inmaduros y especialmente en algunos tejidos suaves, como lo son la cáscara de los cítricos, las manzanas, las peras, los tomates, etc.

Se pueden encontrar en la naturaleza distintas sustancias pécticas:

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 y es insoluble en agua.

b) Ácido pectínico: se puede encontrar como pectina de alta esterificación (50%-85% de esterificación) o de baja esterificación (menos del 50% de homogalacturonatos esterificados) y son más solubles 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 ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

La proporción de protopectina, 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 es esencialmente un polímero del ácido D-galacturónico, con un contenido de grupos metoxilo variables con los que conforman ésteres metílicos. Los monómeros del ácido galacturónico están unidos entre sí por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -D-(1-4), y es ocasionalmente interrumpida por monómeros de L-ramnosa, y en forma menor por otros azúcares neutros tales como la fucosa, ácido glucorónico, xilosa, L-arabinosa y D-galactosa. (Solis, y otros, 2008)

La pectina contiene dos tipos de esqueleto covalentemente unidos. Por un lado una cadena de ácido galacturónico, denominada homogalacturonano (HG) que forma una hélice lineal que contiene unidades de ácido D- galacturónico unidas por enlaces  $\alpha$ (1-4). Algunos grupos carboxilo 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  $\alpha$ (1-4) unidos a monómeros de L-ramnosa por enlaces  $\alpha$ (1 -2). (Minic & Jouanin, 2006) Figura 6.

Al esqueleto homogalacturonano (HG) se le ha nombrado región lisa, por su casi nula ramificación, y al esqueleto ramnogalacturonano se le ha nombrado región peluda, por su alta sustitución. (Bonnin, Clavurier, Daniel, Kauppinen, Mikkelsen, & Thibault, 2008)

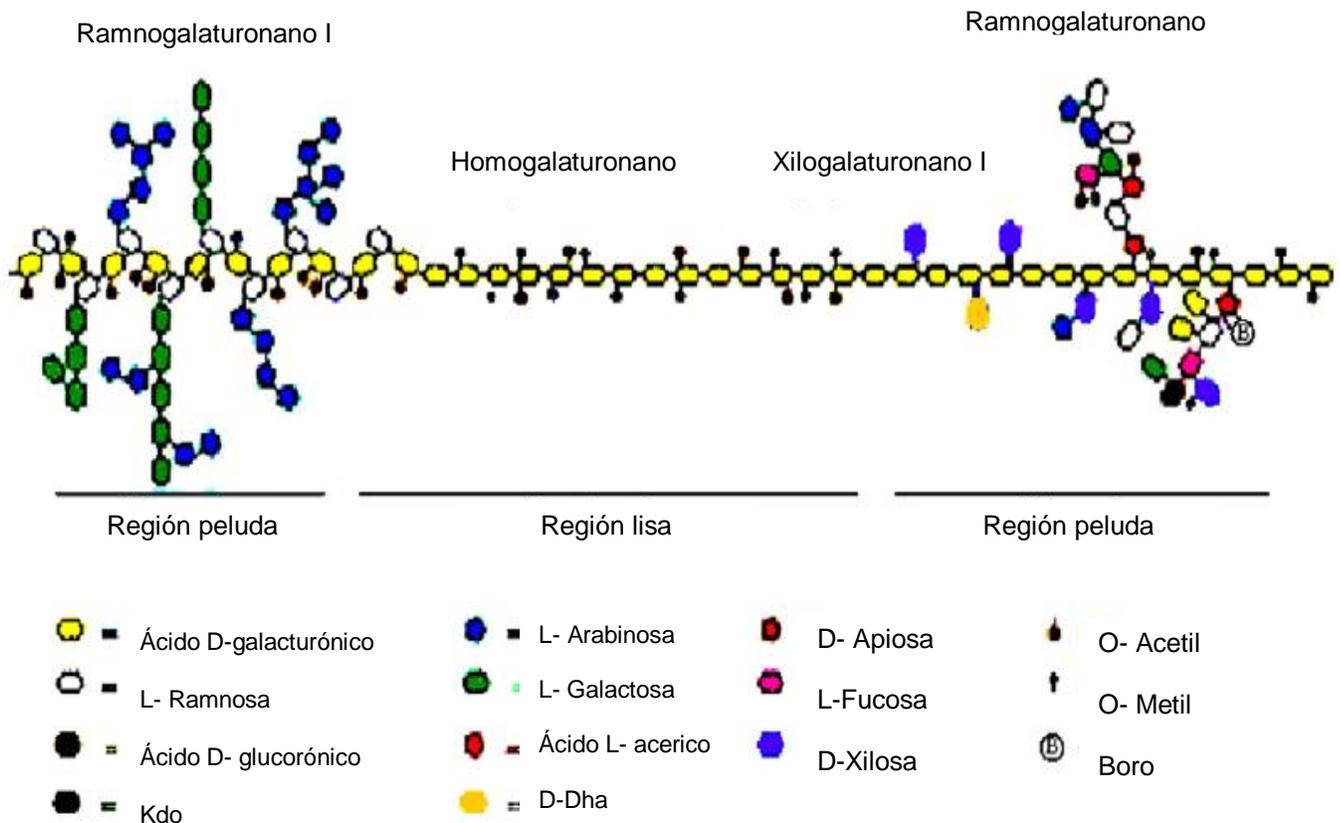


Figura 6. Estructura de la pectina (Vorwerk, Somerville, & Somerville, 2004)

### Ornamentación del Homogalacturonano

- Ésteres metílicos: Se trata de metanol esterificado con los grupos carboxilos de homogalacturonano. (Vorwerk, Somerville, & Somerville, 2004)
- Ésteres no metílicos: son ésteres que provienen de alcoholes diferentes el metanol. (Vorwerk, Somerville, & Somerville, 2004)
- 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  $\beta(1-3)$ .
- 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”. (Minic & Jouanin, 2006)

#### Ornamentación del Ramnogalacturonano I

- Acetato y metil ésteres: puede ocurrir la esterificación con 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 grado de polimerización (DP) y el grado de metilesterificación (DE) determina las condiciones de uso. De acuerdo al DE de los residuos de ácido galacturónico, la pectina se clasifica de bajo (25-50%) y alto (50-80%) metoxilo. La pectina de bajo metoxilo (LM) se obtiene a partir de la de alto metoxilo (HM). El grado de metilación determina las propiedades para formar geles de la pectina. La pectina de bajo metoxilo forma geles en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en un amplio rango de pH de 1.0-7.0. La pectina de alto metoxilo requiere de la presencia de sacarosa a una concentración mayor a 55 % en peso y un rango de pH estrecho (alrededor de 3.0) para la formación de geles. Alrededor del 80% de la producción de pectina alto metoxilo en el mundo se utiliza para la manufactura de mermeladas y jaleas, otras aplicaciones son en bebidas concentradas de frutas y jugos de fruta. La pectina de HM previene la formación de grumos de caseína en lácteos acidificados

La pectina es utilizada en la industria de alimentos como aditivo, ya que sus propiedades como hidrocoloide y como fluido no newtoniano, pseudoplástico, ofrece una gama muy extensa para elaborar varios tipos de alimentos. Las pectinas de alto metoxilo, son utilizadas por sus propiedades gelantes para la preparación de conservas como mermeladas, ates y jaleas, geles en frío para la

fabricación de flanes y pudines. Las pectinas de bajo metoxilo son utilizadas para la elaboración de yogurt con frutas y para beber, y leches malteadas, por sus propiedades estabilizantes se usan para la elaboración de aderezos y mayonesas. (Bonnin, Clavurier, Daniel, Kauppinen, Mikkelsen, & Thibault, 2008)

La pectina presenta efectos beneficios en el metabolismo humano, ayudando a mantener bajos niveles de colesterol en sangre, reduciendo además los lípidos en sangre, ayuda a bajar los niveles de glucosa en sangre y es usada en ciertos alimentos para bajar de peso. Es utilizada en las formulaciones de pasta de dientes, productos de cuidado de la piel, manufactura de cigarros, alimentos para animales, estimular el nivel de prolactina en sangre, en insecticidas y viricidas, como material para encapsulados, en anti-inflamatorios, formulaciones para el tratamiento de diarrea y disentería, ya que los productos de degradación de la pectina son antibacterianos.

Quizá uno de los usos más importantes de la pectina después de la aplicación en la industria de alimentos, es como sustrato para la producción de enzimas pectinolíticas empleando desechos agroindustriales.

### **III.2 Biodegradación de la pared celular de las plantas**

La degradación de los polisacáridos de la pared celular de las plantas se lleva a cabo por diversos microorganismos, ya que la estructura y composición de los polímeros que integran la pared celular de las plantas es muy heterogénea, se requiere una gran variedad de enzimas para su degradación.

Las enzimas son biocatalizadores complejos de naturaleza proteínica de gran especificidad y eficiencia, aceleran la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son responsables de las transformaciones metabólicas de los seres vivos.

En la antigüedad, algunas civilizaciones como la egipcia, la babilónica y la árabe utilizaron a las enzimas en forma empírica en algunos procesos, tales como la manufactura del queso, pan y producción de cerveza. El empleo de las enzimas en la industria no es nuevo, ya que han estado implicadas en muchos de los procesos tradicionales, a veces con cientos de años de uso continuo.

Entre las enzimas de interés se encuentran las proteasas, lipasas, amilasas, así como también las enzimas que degradan polisacáridos de la pared celular de plantas como: celulasas, pectinasas, xilanasas, entre otras. Las polisacáridasas pueden ser producidas por bacterias levaduras hongos, protozoarios, insectos, nematodos y plantas, pero para propósitos industriales los hongos son preferidos porque en un 90% las enzimas pueden ser excretadas al medio de cultivo. Los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Trichoderma* son las principales fuentes para la producción de sistemas enzimáticos que degradan los polisacáridos de la pared celular de plantas. El uso de las enzimas ha aumentado en la industria farmacéutica, textil, del papel, alimenticia (Graminha, Gonzalez, Pirota, Balsalobre, Da Silva, & Gomes, 2008)

Además estas enzimas degradadoras de pared celular juegan un papel importante en la naturaleza manteniendo el ciclo de carbono, y en muchos aspectos de la patogenicidad del invasor, incluyendo penetración, maceración y adquisición de nutrientes.

## Degradación de celulosa

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que hidroliza diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. (Ovando-Chacón & Waliszewski, 2005; Enari, 1989)

Hay tres grandes tipos de actividades celulolíticas que producen los hongos:

1. Endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4), hidrolizan los enlaces internos de la celulosa y produce residuos, que pueden ser degradados por la celobiohidrolasa que genera celobiosa, que después es degradada por  $\beta$ -glucosidasa a glucosa. Rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres (Domingues, Queiroz, Cabral, & Fonseca, 2000; Kee-Hong, Brown, Harris, Langston, & Cherry, 2007)
2. Celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91), remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. (Ovando-Chacón & Waliszewski, 2005; Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006)
3.  $\beta$ - Glucosidasa (E.C. 3.2.2.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa. (Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006)

La biodegradación de la celulosa por las celulasas es llevada a cabo por muchos microorganismos, la celulosa representa la mayor fuente de carbono y es muy importante en el tratamiento de los residuos agrícolas. Muchas celulasas comerciales son producidas por especies de *Trichoderma* y *Aspergillus*. (Ovando-Chacón & Waliszewski, 2005; Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006)

## Degradación de xilano

La variable estructura y organización de la hemicelulosa requiere de la acción de muchas enzimas para su degradación. (Shallom & Shoham, 2003). El xilano es el principal componente de la hemicelulosa y para su completa degradación se necesita un complejo enzimático que participa sinérgicamente. (Sandrim, Rizzatti, & Terenzi, 2004)

Las más conocidas son:

- Endo- $\beta$ -D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8), rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula, hidrolizando las uniones  $\beta(1-4)$  y generando xilooligómeros que son usados por bacterias y hongos como fuente principal de carbono, es el componente mayoritario del complejo sistema enzimático. (Paz-Lago & Hernández, 2000; Ratanachomsri, y otros, 2006; Shallom & Shoham, 2003)
- La arabinofuranosidasa (E.C. 3.2.1.55) hidroliza las cadenas laterales de arabinosa. (Shallom & Shoham, 2003; Ratanachomsri, y otros, 2006)
- La acetil xilan esterasas (E.C. 3.1.1.72) liberan grupos acetatos. (Paz-Lago & Hernández, 2000; Ratanachomsri, y otros, 2006)
- La glucoronidasa (E.C. 3.2.1.139) remueve las cadenas laterales de ácido glucorónico a partir de unidades de xilosa. (Ratanachomsri, y otros, 2006)
- Las  $\beta$ -xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4-aryl-xilopiranosido produciendo xilosa (Shallom & Shoham, 2003; Subramaniyan & Prema, 2002).

La producción de xilanasas tiene un alto costo, por lo que se ha estudiado el uso de diferentes residuos lignocelulolíticos como trigo, maíz y otros residuos agrícolas como fuentes de carbono de bajo costo, estos sustratos han sido usados en fermentaciones en estado sólido (Betini, Mchelin, Peixoto-Nogueira, Jorge, Terenzi, & Polizeli, 2009). En la naturaleza las xilanasas son producidas por muchos microorganismos, como algas marinas, protozoarios, crustáceos, insectos, hongos filamentosos, bacterias y levaduras. (Ahlawat, Battan, Sudha Dhiman, Sharma, & Mandhan, 2007; Ratanachomsri, y otros, 2006)

Las enzimas xilanolíticas producidas por hongos han tenido mucha atención en los últimos años y existe un gran número reportado de xilanasas producidas por diferentes especies de *Aspergillus*. (de Carvalho Peixoto-Nogueira, Michelin, Almeida Betini, Atílo, Terenzi, & Teixeira de Moraes Polizeli, 2008; Betini, Mchelin, Peixoto-Nogueira, Jorge, Terenzi, & Polizeli, 2009))

### **Degradación de pectina**

La degradación de las pectinas involucra una compleja combinación de enzimas pectinolíticas dentro de las cuales se distinguen dos grupos: las pectinesterasas, las cuales remueven los grupos metoxilo, y las despolimerasas (hidrolasas y liasas) que degradan la cadena principal. (Bonnin, Clavurier, Daniel, Kauppinen, Mikkelsen, & Thibault, 2008; Solis, y otros, 2008). También se clasifican de acuerdo con el sustrato (pectina o ácido péctico), del tipo de reacción (hidrólisis o transesterificación) y del mecanismo (endo o exo). (Robles Ruíz, 2000)

Pectina esterasa (PE) también llamada pectinmetilesterasa, es una enzima hidrolítica que actúa sobre los enlaces éster metílicos de la pectina, liberando metanol y por lo tanto desesterificando a la pectina. La acción de cationes monovalentes y divalentes favorece su actividad, los aniones y las altas concentraciones de sales no favorecen su actividad.

Poligalacturonasas, son un conjunto de enzimas hidrolíticas que catalizan la despolimerización de la pectina.

Las exo-poligalacturonasas (exo-PG) actúan sobre los polímeros de pectina y los ácidos poligalacturónicos mediante un mecanismo de hidrólisis, atacan al sustrato por su extremo no reductor, dando como productos finales ácidos galacturónicos, su pH óptimo es de 4.6 a 6.0, requiere de iones  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , la presencia de agentes quelantes como EDTA disminuyen su actividad, así como los aniones  $\text{Na}^+$ .

Las endo-poligalacturonasas (endo-PG) actúan mediante hidrólisis rompiendo los enlaces internos de la cadena de pectina y produciendo una serie de oligogalacturonatos, el sustrato ideal de estas enzimas es el ácido poligalacturónico principalmente, ya que su actividad decrece cuando se aumenta el grado de esterificación del sustrato, el pH óptimo de estas enzimas es de 3.6 a 5.5 y no requiere de iones metálicos para incrementar su actividad.

Oligogalacturonasas son enzimas que degradan oligómeros de pectina por su extremo no reductor, su actividad decrece conforme aumenta el grado de polimerización.

La endo-pectato liasa (endo-PAL) es una enzima capaz de degradar el ácido péctico como sustrato, su actividad decrece conforme aumenta el grado de esterificación, su pH óptimo de actividad es de 8.0 a 9.5 y requiere de iones  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad.

La exo-pectato liasa (exo-PAL) degrada a los ácidos pécticos, ataca al sustrato por el extremo no reductor de la cadena y sus únicos productos de degradación es el ácido digalacturónico insaturado, esta enzima ha sido aislada de pocas fuentes de producción por lo cual es considerada como rara.

La pectin-liasa (PL), E.C. 4.2.2.10, es una enzima que degrada pectina muy esterificada y su actividad decrece conforme va disminuyendo el grado de

esterificaciones, atacando los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4, su pH óptimo de actividad se encuentra entre 6.0 a 8.7 y su especificidad es muy alta en polímeros de metil galacturonatos, la actividad de la enzima producida en pH alcalino demuestra la habilidad para infectar tejidos vegetales de algunos hongos. Esta enzima no requiere de iones  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad, y es inhibida por polioles como el inositol, manitol y glicerol, y por ácidos carboxílicos como acetato, propionato, n-butirato y el isobutirato. (Solis, y otros, 2008)

La ramnogalacturonidasa ataca enlaces glicosídicos de ramnosa y ácido galacturónico en regiones ramificadas de la pectina, los productos de reacción de estas enzimas son oligómeros alternando unidades de ramnosa y ácido galacturónico.

### **Enzimas accesorias**

Las enzimas accesorias actúan en los sustituyentes de las cadenas laterales de los polisacáridos de la pared celular. Algunas de estas enzimas actúan en los enlaces entre el residuo de la cadena principal y el sustituyente, mientras que otras enzimas rompen los enlaces internos o terminales de las cadenas laterales

- $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y arabinofuranohidrolasas. Remueven los residuos de arabinosa.
- Endo y exoarabinasas. Las endoarabinasas (E.C. 3.2.1.99) hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,5 del arabinano, que está presente en las cadenas laterales de la pectina. Además algunas arabinofuranosidasas son capaces de hidrolizar arabinano polimérico.
- $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasas. Remueven los residuos de D-galactosa de los polisacáridos de la pared celular de plantas. Las  $\beta$ -galactosidasas (E.C. 3.2.1.22) liberan los residuos de galactosa del galactano de las cadenas laterales de la pectina y del xiloglucano. Las  $\alpha$ -galactosidasas (E.C.

3.2.2.23) están involucradas en la degradación de galactoglucomanano, removiendo la galactosa de los residuos de manosa de la cadena principal

- $\alpha$ -glucuronidasas. Los residuos de ácido glucorónico y su 4-metil éter puede ser removido de la cadena de xilano por  $\alpha$ -glucuronidasas (E.C. 3.2.1.131). La enzima es activa principalmente en pequeños xilooligómeros.
- Feruloil y p-coumaroil esterasas. Liberan los grupos fenólicos presentes en la estructura del xilano.

### III.3 Residuos agrícolas

El trigo es la planta más ampliamente cultivada del mundo, el grano es ovalado con extremos redondeados. La planta mide entre 30 y 180 cm, su tallo es recto y cilíndrico. El grano maduro del trigo está formado por: carbohidratos, (fibra, almidón, maltosa, sacarosa, glucosa, pentosanos, galactosa, rafinosa), compuestos nitrogenados (principalmente proteínas: albúmina, globulina, y gluteína), lípidos (ácidos grasos como el mirístico, palmítico, esteárico, palmitooleico, oleico, linoléico), minerales (potasio, fósforo, azufre, cloro) y agua junto con pequeñas cantidades de vitaminas.

La fibra es un carbohidrato del tipo polisacárido que no se digiere por carencia de enzimas en el cuerpo humano, está comprendida por celulosa, polisacáridos no celulosos (sustancias pécticas, hemicelulosas) y también lignina, un polímero aromático no hidrocarbonatado.

El salvado, Figura 7, es el resultado de una parte de la molienda de los granos de cereales, proviene de las cinco capas más externas del grano, formadas por una primera capa exterior envuelta o cutícula, la segunda o epicarpio, la tercera o endocarpio, la cuarta capa denominada testa y la quinta, denominada aleurona. En la Tabla 1, se presenta la composición del salvado de trigo.

Las actividades agrícolas y agroindustriales producen cientos de toneladas de desechos, que pueden ser residuos de fibra, de alta y baja digestibilidad, y salvado. (Graminha, Gonzalez, Pirota, Balsalobre, Da Silva, & Gomes, 2008).



**Figura 7. Salvado de trigo**

Los residuos vegetales constituyen el mayor recurso renovable en la naturaleza, donde la celulosa es el principal componente de las plantas, seguido por la hemicelulosa. La utilización de los residuos agrícolas como fuentes de carbono en la industria es una nueva alternativa para solucionar los problemas de contaminación y la acumulación de estos productos (Oliveira, Porto, & Tambourgi, 2006), además de utilizarlos como fuentes de carbono alternativas que reducirían el costo de los productos finales. (de Carvalho Peixo-Nogueira, Michelin, Almeida Betini, Atílo, Terenzi, & Teixeira de Moraes Polizeli, 2008).

Se ha estimado que a nivel mundial se producen anualmente aproximadamente  $4 \times 10^9$  toneladas de biomasa vegetal, parte de esta biomasa no se acumula gracias a que es degradada por hongos y ciertas bacterias, estos microorganismos juegan un papel importante en el ciclo del carbono dentro de los ecosistemas.

La disposición final de los residuos orgánicos sólidos es un problema que afecta al medio ambiente en todas las regiones del mundo. Actualmente se trata de reducir

la cantidad de este tipo de residuos aplicando métodos biotecnológicos que tienden a reducir su volumen y a favorecer su reutilización.

Por lo general los cultivos de microorganismos en medio sólido se realizan utilizando sustratos agrícolas, como salvado de trigo, bagazo de caña, harina de yuca y algunas cáscaras, a estos sustratos se les agrega una solución de sales y una suspensión de esporas de hongos como inoculante.

**Tabla 1. Composición del Salvado de trigo**

Elemento	Cantidad	Elemento	Cantidad
Energía	216 kcal	Hierro	10.57 mg
Carbohidratos	64.51 g	Zinc	7.27 mg
Fibra total	42.8 g	Vitamina E	2.32 mg
Proteína	15.55 g	Sodio	2.00 mg
Grasa	4.25 g	Vitamina B6 (Piridoxina)	1.30 mg
Manganeso	11.5 g	Cobre	0.99 mg
Potasio	1.18 g	Vitamina B2 (Riboflavina)	0.58 mg
Fósforo	1.01 g	Vitamina B1 (Tiamina)	0.52 mg
Magnesio	0.61 g	Ácido fólico	79 µg
Calcio	73 mg		

### III.4 Berenjena

La berenjena, *Solanum melongena* L. es una especie de la familia *Solanaceae*, de la subfamilia *Solanoideae*, de la tribu *Solaneae*, género *Solanum* y subgénero *Leptostemonum*. Incluye 450 especies distribuidas en 22 sectores. Los cultivos primitivos de berenjena se localizan en países de Asia, como Indonesia, Filipinas,

Tailandia y Malasia. (Collonnier, y otros, 2001). Pertenece a una familia muy cercana a los tomates y a las papas, y es un diploide con 12 cromosomas ( $2n=24$ ). (Van Eck & Snyder, 2004)

Es originaria de las zonas tropicales y subtropicales asiáticas. Se cultivó desde la antigüedad en la India, Birmania y China. Hacia el año 1200 ya se cultivaba en Egipto, desde donde fue introducida en la Edad Media a través de la Península Ibérica y Turquía, para posteriormente extenderse por el Mediterráneo y resto de Europa. Fue en el siglo XVII cuando se introdujo en la alimentación, tras ser utilizada en medicina para combatir inflamaciones cutáneas y quemaduras. (Van Eck & Snyder, 2004)

Es un vegetal con una gran importancia económica en Asia y África y algunas zonas subtropicales como la India, Bangladesh, Pakistán, China, Japón, Filipinas, Francia, Italia o América Central, y crece en algunas regiones como el Mediterráneo y el sur de Estados Unidos. (Chen & Li; Collonnier, y otros, 2001; Frary, Doganlar, & Daunay, 2007)

### **Morfología**

La berenjena es una planta herbácea, sus tallos son fuertes, de crecimiento determinado, erguido y erecto, pudiendo alcanzar hasta 2-3 metros de altura. Las hojas son largas, grandes, y presentan espinas y envés cubiertos de una vellosidad grisácea, causante en ocasiones de alergias. Las hojas están insertadas de forma alterna en el tallo. El número de pétalos, sépalos y estambres oscila entre 6 y 9. Los pétalos son de color violáceo. (Frary, Doganlar, & Daunay, 2007)

El fruto es una baya alargada o globosa (Figura 8), de color negro, morado, blanco o verde. Presenta pequeñas semillas de color amarillo con un poder germinativo que oscila entre 4 y 6 años. Crece en climas templados ya que las temperaturas

bajas dañan el fruto (Robles Ruíz, 2000). Tiene una gran variedad de características fisiológicas importantes como su resistencia a muchos patógenos como bacterias, hongos, nematodos e insectos. (Collonnier, y otros, 200, Singh, y otros, 2008) .



**Figura 8. Fruto de la Berenjena**

### **Composición química de la berenjena**

Se ha reportado que la berenjena tiene una elevada cantidad de agua, carbohidratos y un bajo contenido de grasas y proteínas, contiene poca fibra, excepto en la piel y las semillas (Collonnier, y otros, 2001; Robles Ruíz, 2000). Se tiene reportado que la berenjena tiene una gran cantidad de antocianinas, fenoles, glicoalcaloides y amidas. (Chen & Li, Rodriguez, López, & Chaves, 1999). En la tabla 2 se presenta la composición de la berenjena morada.

La berenjena posee una gran cantidad de compuestos fenólicos entre ellos encontramos: N-cafeoilputresina, ácido 3-cafeoilquinico, amida dihidroxicinamoil, N,N-dicafeolespermidina, ácido 5-cis-cafeoilquinico, ácido cafeíco conjugado,

ácido 4-cafeoilquinico, ácido 5-cafeoilquinico, ácido 3-acetil-4-cafeoilquinico, ácido 3-5-dicafeoilquinico y ácido 4-5-dicafeoilquinico. (Singh, y otros, 2008; Whitaker & Stommel, 2003)

Entre los flavonoides glicosilados que se encuentran en la berenjena están la quercetina-3-glucosa, quercetina-3-ramnosa y miricetina-3-galactosa. (Singh, y otros, 2008)

La berenjena posee una gran cantidad de polifenol oxidasa (E.C. 1.14.18.1, PPO), que es la que genera manchas cafés en la fruta, (Pérez-Gilabert & García Carmona, 2000), que afectan la aceptación del consumidor, las características organolépticas, bioquímicas y nutricionales. (Concellón, Añón, & Chaves, 2004, Flick, Burnette, Aung, Ory, & St. Angelo, 1976). También presenta actividad catalasa (E.C. 1.11.1.8), alcohol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.1) y peroxidasa (E.C. 1.11.1.7). (Flick, Burnette, Aung, Ory, & St. Angelo, 1976)

El color de la berenjena proviene de las antocianinas, principalmente de la nasunina (delfinidina-3-[-4-(p-coumaroil)-L-ramnosil-(1-6)glucopiranodiso[-5-glucopiranosido]), que tiene actividad antioxidante y efectos anti carcinógenos, la otra antocianina presente en la berenjena es la delfinidina-3-[-4-(trans-p-coumaroil)-L-ramnosil-(1-6)glucopiranodiso[-5-glucopiranosido]. (Azuma, y otros, 2008; Ichiyanagi, Kashwada, Shida, Ikeshiro, Kaneyuki, & Konishi, 2005). Las antocianinas también tienen efecto protector del hígado y de la sangre, antimutagénico y antiinflamatorio. (Todaro, Cimino, Rapisarda, Catalano, Barbagallo, & Spagna, 2008).

**Tabla 2. Composición de la berenjena**

<b>Elemento</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Elemento</b>	<b>Cantidad</b>
Energía	18 Kcal	Ácido oxálico	18.0 mg
Carbohidratos disponibles	3.1 g	Magnesio	16.0 mg
Fibra total	2.5 g	Vitamina C(ácido ascórbico)	12.0 mg
Fibra insoluble en agua	0.6 g	Esteroides	7.8 mg
Polisacáridos no celulolíticos insolubles en agua	0.6 g	Calcio	7.0 mg
Fructosa	1.3 g	Hierro	0.9 mg
Glucosa	1.3 g	Niacina	0.9 mg
Proteína total	0.5 g	Carotenoides totales	0.74 mg
Ácidos orgánicos	0.4 g	Sodio	0.3 mg
Grasas totales	0.2 g	Vitamina E( $\alpha$ -tocoferol)	0.1 mg
Almidón	0.2 g	Riboflavina	0.11 mg
Sacarosa	0.3 g	Vitamina K	6.0 $\mu$ g
Potasio	217.0 mg	Selenio	0.4 $\mu$ g
Cloro	52.0 mg	Vitamina A (retinol)	0.3 $\mu$ g
Fósforo	22.0 mg		

(Flick, Ory, & Angelo, 1997; Chen & Li)

### **Usos**

La berenjena es usada en la cocina de muchos países y tiene una significativa importancia económica en muchas partes tropicales y subtropicales donde se cultivan. (Singh, y otros, 2008). México produce alrededor de 65,000 toneladas de berenjenas al año, siendo el principal productor China con 13,430,099 toneladas al año. (Chen & Li)

Los beneficios del consumo de berenjenas que recientemente se han estudiado están enfocados en la disminución del colesterol y lípidos de baja densidad en la sangre, así como la actividad antioxidante que posee debido a la presencia de diferentes polifenoles. (Guimaraes, y otros, 2000; Singh, y otros, 2008) .



**Figura 9. Fruto de la Berenjena cortado en rodajas**

### **III.5 Generalidades de los hongos filamentosos**

El reino *Fungi* incluye un repertorio heterogéneo de organismos heterótrofos que pueden ser saprófitos o parásitos, y hasta simbioses en una asociación comensal con otros organismos. (Smith, 1994)

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariontes, heterótrofos, morfológicamente complejos, aerobios y en general no motiles. La mayoría crece entre los 0 y 55°C, con una temperatura óptima entre los 20 y 30°C. (Bonifaz Trujillo, 2009)

Poseen dos tipos de células fúngicas: las somáticas; que incluyen núcleos pequeños y cuyo proceso de división es la mitosis, y las reproductoras que poseen núcleos más grandes y su división celular es por meiosis. Los hongos se reproducen en forma asexual por mitosis, o sexual por medio de la conjugación de dos células diferenciadas o no, mediante plasmogamia (unión de dos protoplasmas), cariogamia (fusión de dos núcleos) o meiosis. (Bonifaz Trujillo, 2009)

Pueden presentar diferentes formas a lo largo de su ciclo de vida, desde una estructura básica vegetativa, llamada conidia, hasta un filamento tubular, es decir la germinación de una espora reproductiva. La hifa crece se ramifica formando masas de hifas llamada; micelio. Dependiendo de las condiciones de crecimiento, algunas especies de hongos filamentosos pueden crecer como células independientes o como micelio. (Bonifaz Trujillo, 2009)

Los hongos filamentosos son explotados para aplicaciones biotecnológicas, principalmente en la producción de alimentos, bebidas, ácidos orgánicos, enzimas, polisacáridos y antibióticos.

### **Conidio y micelio**

Los hongos se reproducen por esporas, que pueden ser sexuales o asexuales (conidios). La reproducción sexual se conoce como teleomórfica, en ella hay intercambio de material genético y la posibilidad de que surjan nuevas propiedades. La reproducción asexual es llamada anamórfica, su objetivo es la proliferación y mantenimiento de la especie. (Bonifaz Trujillo, 2009)

La espora o conidio es una estructura altamente especializada para la reproducción, supervivencia y distribución de los hongos filamentosos. Se caracteriza por su 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 son capaces de proveer nuevas recombinaciones genéticas. La respiración aeróbica es un requisito para la mayor parte de las esporas al iniciar su germinación, mientras que otras demandan dióxido de carbono, además de que requieren un nivel de humedad y temperatura favorables para iniciar con el proceso de germinación.

La unidad funcional del micelio es una hifa. La hifa se describe como una célula cilíndrica que incrementa su longitud por crecimiento de uno de sus extremos. Presenta un área de superficie donde las sustancias son intercambiadas con el medio ambiente, las sustancias necesarias para la biosíntesis y desarrollo del hongo son absorbidos del medio. Al conjunto de hifas se le conoce como micelio, y es la estructura somática de los hongos, es decir, cuando se encuentran en estado vegetativo. El micelio es una estructura que en términos de requerimientos nutricionales es muy demandante conforme crece. (Smith, 1994)

### **III.6 Género *Aspergillus***

El nombre del género *Aspergillus* data del siglo XVIII, Micheli lo describió como “cabeza rugosa” al observar las esporas unidas a los conidióforos. La familia *Aspergillaceae* está compuesta por 80 especies aproximadamente, todas incluidas dentro de la división *Ascomycetes*, ya que algunos presentan estados teleomórficos. No todos los hongos del género *Aspergillus* son capaces de reproducirse sexualmente. (Bonifaz Trujillo, 2009)

Las especies de *Aspergillus* pertenecen a los primeros hongos que fueron cultivados en medios artificiales y estudiados por sus propiedades bioquímicas, se presentan en mayor distribución geográficas, y son de los hongos más omnívoros que existen, capaces de asimilar como alimento una enorme variedad de sustancias debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas. Actualmente *Aspergillus* es utilizado en diversos procesos

industriales para elaborar diferentes productos que abarcan desde ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos y alimentos fermentados de varias clases. (Smith, 1994)

Las especies de *Aspergillus* difieren entre sí en sus requerimientos de aw. La mayoría son mesófilos, siendo su rango de temperatura de 10-40°C, creciendo con facilidad a temperaturas entre 15-30°C.

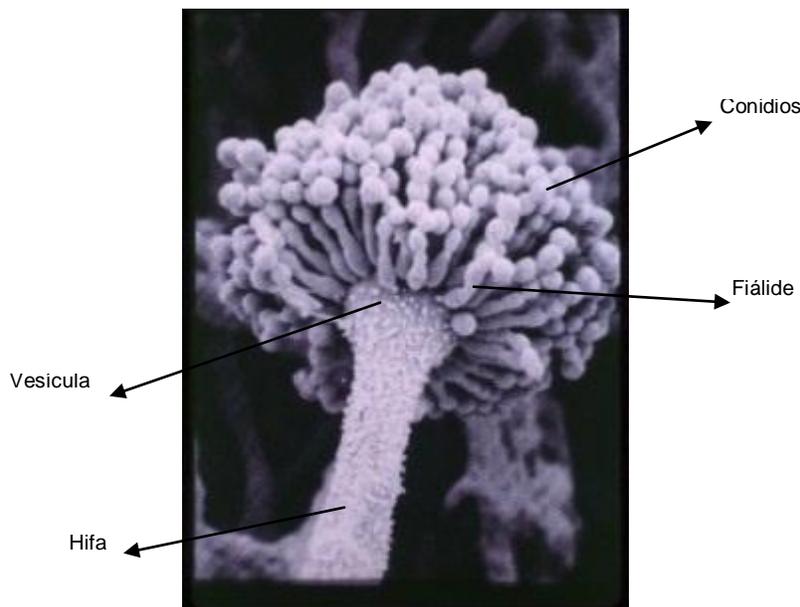


Figura 10. Representación gráfica de *Aspergillus* sp.

<http://www.ehso.com/ehshome/aflatoxin.php>

A pesar de las técnicas nuevas tanto moleculares como bioquímicas, las estructuras morfológicas siguen siendo una importante característica para la clasificación de *Aspergillus*, que se identifica por una estructura morfológica típica (Figura 10): un conidióforo, que es una hifa especializada que soporta a los conidios, surge de la especialización de una estructura micelial llamada célula pie, e incluye un tallo y una cabeza conidial. Los conidióforos no son septados, se ensanchan hacia la punta y terminan en una estructura globosa, de incolora a amarillenta, llamadas vesícula. (Smith, 1994) Las vesículas tienen una superficie total de alrededor de 10 a 15 mm de largo. Los conidios son producidos

sucesivamente desde las puntas de las fiálides, formando así cadenas no ramificadas y cada una contiene más de 100 conidios. Los conidios son más o menos globosos y tienen 4-5 mm de diámetro pero ocasionalmente son más pequeños.

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

*Aspergillus* es un organismo ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de enzimas (Domingues, Queiroz, Cabral, & Fonseca, 2000), presenta algunas ventajas para la producción industrial de éstas: tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo, lo que posibilita su producción a gran escala, sus productos son generalmente considerados como GRAS (Generally Regarded As Safe), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales. (Villena & Gutiérrez-Correa, 2003) (Weenink, Punt, van den Hondel, & Ram, 2005)

Los hongos requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas extracelulares, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de las hifas. Sin embargo, algunos sistemas de producción como la fermentación sumergida no consideran estos importantes aspectos de su fisiología. (Villena & Gutiérrez-Correa, 2003)

*Aspergillus flavus* es un hongo que tiene una distribución mundial es frecuentemente aislado del suelo, especialmente de áreas tropicales y subtropicales, de forrajes y vegetación en descomposición, de semillas y granos almacenados y de varios tipos de productos comestibles (Mellon, Cotty, & Dowd, 2007). En el suelo, su distribución parece no estar limitada por pH ni por la profundidad. Se ha encontrado en trigo, avena, cebada, maíz (Figura 11), arroz, algodón, caña de azúcar, café, tomate, cebolla, rábano, chicharos y cacahuete entre otras. También se ha aislado de helechos. En muchos casos es frecuente encontrar este hongo en las semillas o los productos de las plantas justo después

de la cosecha y durante su almacenamiento, por lo tanto se lo encuentra también en la harina de granos y cereales o en otros productos vegetales procesados.



**Figura 11. *Aspergillus flavus* infectando un grano de maíz. (Mellon, Cotty, & Dowd, 2007)**

Presenta conidióforos cortos de 20-30  $\mu\text{m}$  que terminan en una vesícula ligeramente alargada, de donde nace una sola serie de esterigmas o fiálides que miden de 80 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro cada una, con tendencia disponerse hacia arriba en un ángulo aproximado de  $180^\circ$ , de los esterigmas nacen microconidios redondos de aproximadamente 2.5 – 3  $\mu\text{m}$ . (Bonifaz Trujillo, 2009)

Este hongo es un saprofito común del suelo, contribuye a los procesos de descomposición de la materia orgánica, especialmente en sitios de alta humedad, pues superan los niveles tolerados por otros grupos de hongos. Algunos son patógenos de insectos y en menor proporción patógenos de animales y del hombre, generan serias intoxicaciones debido a la producción de varias micotoxinas (metabolitos secundarios altamente carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos), se sabe que el grado de patogenicidad y agresividad con que estos hongos infectan a las plantas depende de la capacidad para producir enzimas que degradan la pared celular y en gran medida de las que degradan la pectina.

Generalmente se acepta que la producción de enfermedades en plantas por hongos fitopatógenos se debe a la acción individual o combinada de cuatro mecanismos de patogénesis.

El primero de ellos es la síntesis y liberación de enzimas degradativas de la pared celular, tales como poligalacturonasas, pectato-liasas, hemicelulasas y celulasas, que en ocasiones son liberadas de forma secuencial. Estas enzimas ocasionan la degradación de sustancias pécticas que unen las paredes celulares en los tejidos parenquimáticos causando ensanchamiento y degradación de la pared celular seguido de la muerte de las células.

Un segundo mecanismo consiste en la producción de toxinas por parte del hongo, productos no enzimáticos de bajo peso molecular que interfieren en el metabolismo de la planta o que afectan a la estructura del protoplasma.

El tercer mecanismo de patogénesis consiste en la producción y liberación de compuestos hormonales, antihormonales y de otro tipo que producen una interferencia en el control normal del crecimiento y desarrollo. Así se ha observado que en muchos de los síntomas que resultan de la patogénesis provocado por hongos (enanismo, elongación, proliferación celular, etc) son parecidos a los que se asocian con desarreglos hormonales. El último de los mecanismos es la interferencia mecánica.

### **III.7 Aplicaciones industriales de las enzimas**

La degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular de los vegetales juega un papel importante en la extracción de los compuestos presentes en los vegetales y frutas, ya que al degradar los polisacáridos presentes en el tejido, se incrementa la formación de los poros y el tamaño del poro del sustrato lo que permite una mejor difusión del solvente a través del tejido de las frutas o

vegetales dando como resultado una mayor y rápida recuperación de los compuestos extraídos. (Ovando-Chacón & Waliszewski, 2005)

En muchos de los procesos de elaboración de bebidas y jugos de vegetales se utilizan enzimas como celulasas, pectinasas, amilasas y proteasas, que catalizan la degradación de los constituyentes de las paredes celulares tales como la celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y proteína, en la elaboración de bebidas y que mejoran las características organolépticas. (Ahlawat, Battan, Sudha Dhiman, Sharma, & Mandhan, 2007)

### **Enzimas celulolíticas.**

Las celulasas producidas por los hongos filamentosos tienen un gran interés industrial, estas enzimas son empleadas en la industria de alimentos, textil y la industria del papel (Domingues, Queiroz, Cabral, & Fonseca, 2000)

En la industria textil las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de mezclilla ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido/deslavado, además de incrementar la productividad del proceso de deslavado. Y para suavizar el algodón, en los detergentes que cuidan el color de la ropa. (Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006)

Las celulasas se añaden a los detergentes quita pelusas, la enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original.

Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc.

### **Enzimas xilanolíticas**

Las enzimas que degradan los polisacáridos presentes en la pared celular, tienen muchas aplicaciones industriales. (de Vries, 2003)

Una de las aplicaciones más importantes de las xilanasas es en la industria de la pulpa y del papel en el proceso de bioblanqueo, con esto se ha logrado disminuir el costo de producción realzar la brillantez de las pulpas y disminuir la cantidad de cloro utilizado en las etapas de blanqueo, algunas de las cuales son tóxicas, mutagénicas, persistentes y bioacumulativas y que provocan numerosos daños en los sistemas biológicos. (Betini, Mchelin, Peixoto-Nogueira, Jorge, Terenzi, & Polizeli, 2009; Subramaniyan & Prema, 2002)

Las xilanasas, como las celulasas, también se usan en la industria alimentaria en la clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café, extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas, y maceración de materia vegetal. En la industria de la panificación las xilanasas, especialmente la endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, que se adiciona a la masa para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor.

Las xilanasas pueden ser usadas en la conversión de xilosa a partir del xilano presente en desperdicios de industrias agrícolas, de frutas y verduras

### **Enzimas pectinolíticas**

La ruptura de la pectina es catalizada por enzimas pectinolíticas, las cuales son muy usadas en la industria de procesamiento de frutas. (Solis, y otros, 2008)

Estas enzimas desempeñan un papel biológico muy importante, ya que están involucradas en los procesos de germinación y desarrollo de plantas, así como en la maduración de frutos y en la caída de hojas de los árboles, también juegan una importante función en el reciclaje y recambio de residuos de origen vegetal, además de estar asociadas en la patogénesis de plantas.

Entre las aplicaciones principales de las pectinasas se encuentran (Bonnin, Clavurier, Daniel, Kauppinen, Mikkelsen, & Thibault, 2008):

- Tratamiento enzimático de pulpa antes del prensado, para aumentar los volúmenes de jugo y color, la pulpa de muchos frutos contiene una gran

cantidad de pectina haciendo de ésta una masa semigélida la cual es difícil de prensar.

- En la maceración, que es un proceso en el cual un tejido organizado se transforma en una suspensión de células intactas, el producto sirve de materia prima para elaborar jugos con pulpa, néctares, comida para bebés, pudines y yogurt.
- En la clarificación de jugo de frutas y vinos, las pectinasas logran disminuir la viscosidad e inducen la floculación de las partículas suspendidas que provocan turbidez a fin de separarlas fácilmente del jugo.
- En la extracción de néctares, las pectinasas son usadas para macerar los tejidos vegetales obteniendo células separadas en suspensión, especialmente utilizados en la manufactura de productos alimenticios para bebés. Y en la producción de néctares de frutas como guayaba, papaya y plátano.
- Aumenta el rendimiento en la extracción de jugos cítricos.
- Obtención de subproductos a partir de de desechos agroindustriales.
- Las pectinas alcalinas son utilizadas en el campo textil principalmente en el procesado de fibras vegetales, como la obtención de fibras de lino.

#### **IV. Justificación**

En el grupo de trabajo estamos interesados en el estudio del comportamiento y el efecto de diferentes nutrientes en la producción enzimática por cepas del género *Aspergillus*. En este trabajo se pretende estudiar la colonización de sustratos complejos por el micelio de *Aspergillus flavus*, y el tipo de enzimas que se producen.

Estudios anteriores demostraron que dentro de una colonia de *Aspergillus* ciertas proteínas son secretadas por un número limitado de hifas en crecimiento, ya sean de la periferia o de centro de la colonia. Sin embargo, el conocimiento de las diferencias entre las hifas del borde y del centro de la colonia es muy limitado. (Levin Chucrel, 2007). En este trabajo se pretende caracterizar las diferentes enzimas producidas en distintas partes de la colonia, esto se ha llamado diferenciación zonal. Su estudio puede ayudar a establecer una relación con la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento y la esporulación del hongo.

## V. Objetivos

### Objetivo General

Identificar los sistemas enzimáticos producidos por *Aspergillus flavus* NRRL 6541 creciendo en sustratos complejos.

### Objetivos Específicos

Establecer la capacidad de crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en diferentes fuentes de carbono como salvado de trigo y berenjena (*Solanum melongena*) y determinar sus preferencias nutricionales.

Evaluar la producción de enzimas degradadoras de polisacáridos por *Aspergillus flavus* (cepa NRRL-6541) en un medio líquido complejo de diversos sustratos, en condiciones de agitación y sin agitación.

Determinar la producción de enzimas por *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en medio sólido y material vegetal biológicamente activo.

Estudiar el efecto de la diferenciación zonal de las hifas en medio sólido, y establecer una relación entre la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento y la secreción de enzimas por el hongo *Aspergillus flavus*, tanto en una colonia completa como en micelio vegetativo únicamente.

Comparar las enzimas producidas por *Aspergillus flavus* en medio líquido con las generadas en medio sólido.

## **VI. Material y Métodos**

### **1. Microorganismo**

La cepa *Aspergillus flavus* NRRL-6541 se cultivó en diferentes medios de sustratos complejos (salvado de trigo lavado y salvado de trigo no lavado y berenjena) con la finalidad de determinar que enzimas se producen y tener una base que nos permita evaluar la utilización de las diferentes fuentes de carbono y los sistemas enzimáticos involucrados en esa degradación.

### **2. Inóculo**

Como inóculo se utilizaron los conidios obtenidos de placas del medio sólido (Agar Sabouraud, SAB), éstas fueron cosechadas con solución salina (0.9% P/V) Tween 80 al 0.005 V/V estéril. La concentración de conidios se determinó usando una cámara de Neubauer.

Se inoculó la cantidad necesaria de suspensión de esporas para alcanzar una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas por mililitro de cultivo para los medios líquidos, y  $1 \times 10^5$  esporas/ $2 \mu\text{l}$  en el medio sólido y en el material vegetal.

### **3. Medios**

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las cepas fue Agar Sabourad (SAB). Los cultivos en medio sólido se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 72 hrs.

Para cultivar los microorganismos en medio líquido y sólido para llevar a cabo la producción de enzimas se utilizó el medio basal compuesto por:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  al 0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0.2% y  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  al 0.5% y como fuente de carbono se utilizaron:

- Salvado de trigo sin lavar
- Salvado de trigo lavado
- Berenjena

En el caso del medio líquido, la berenjena fue lavada con agua y jabón y cortada en pequeños trozos, para después licuarla por 1 minuto con medio basal.

Para su uso como material biológicamente activo la berenjena fue lavada con abundante agua y jabón, posteriormente se seco, y se sumergió en una solución de 2% V/V de hipoclorito de sodio por 3 minutos, después de este tiempo se sumergió y enjuagó en agua destilada estéril, todo bajo condiciones asépticas. La berenjena se corto con un cuchillo estéril en condiciones asépticas.

Para los controles de crecimiento en placa se utilizó medio basal con las siguientes fuentes de carbono:

- Xilosa 1%
- Glucosa 1%
- Ácido galacturónico 1%

#### **4. Condiciones de cultivo**

##### **a) Condición 1**

En un medio líquido con salvado de trigo lavado, salvado de trigo no lavado y berenjena, como fuente de carbono en una concentración de 3% P/V, se inoculó *Aspergillus flavus* NRRL- 4561, se incubó a 37°C con agitación constante de 200 rpm, en la agitadora oscilante (Innova 4230 New Brunswick Scientific), y sin agitación por 10 días. Se determinaron las enzimas producidas por el hongo en el filtrado libre de células a diferentes tiempos de incubación.

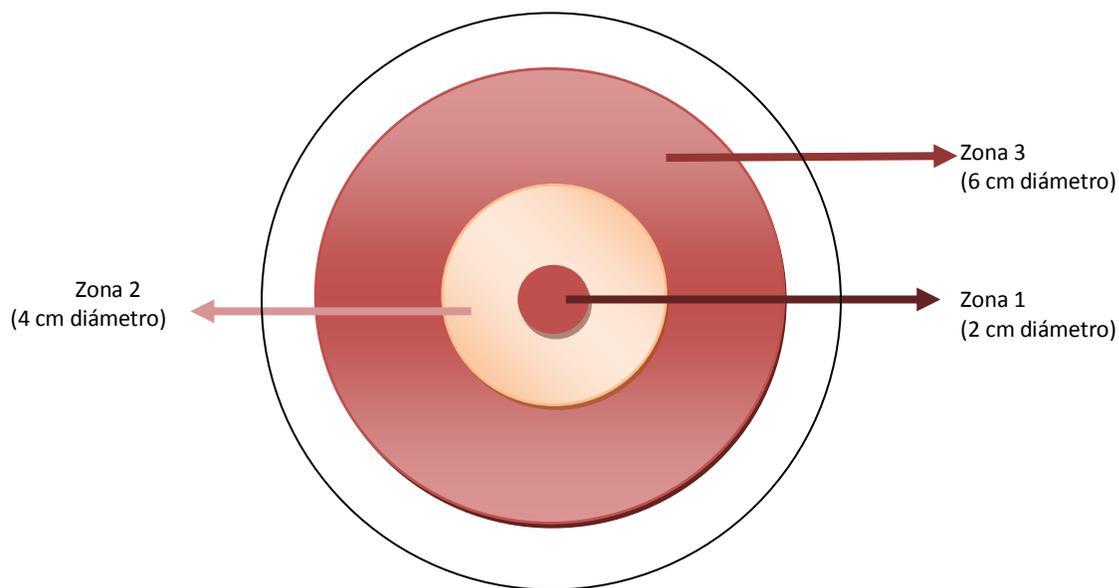
##### **b) Condición 2**

Se cultivó *Aspergillus flavus* NRRL- 4561 en el centro de una membrana porosa de policarbonato (Isopore™ Membrane filters 0.2 µm), colocada encima de un medio

de cultivo sólido con salvado de trigo lavado, salvado de trigo no lavado y berenjena como fuente de carbono, a una concentración de 3% y 1%, se incubó a 37°C por 5 días al cabo de los cuales se retiró la membrana de policarbonato (Isopore™ Membrane filters 0.2 µm) y se determinaran las enzimas producidas de la colonia completa (micelio vegetativo, micelio aéreo y esporas).

Para obtener únicamente micelio vegetativo se realizó la incubación sobre la membrana de la misma forma que en caso anterior, sólo que después del primer día se colocó otra membrana de policarbonato (Isopore™ Membrane filters 0.2 µm) sobre la que ya se encontraba en el medio, haciendo crecer el microorganismo entre las dos membranas (técnica sándwich), y se incubó 2 días más. Después de este tiempo de incubación, se retiró la membrana con el micelio desarrollado y se determinaran las enzimas producidas por el hongo de 3 áreas de desarrollo del micelio.

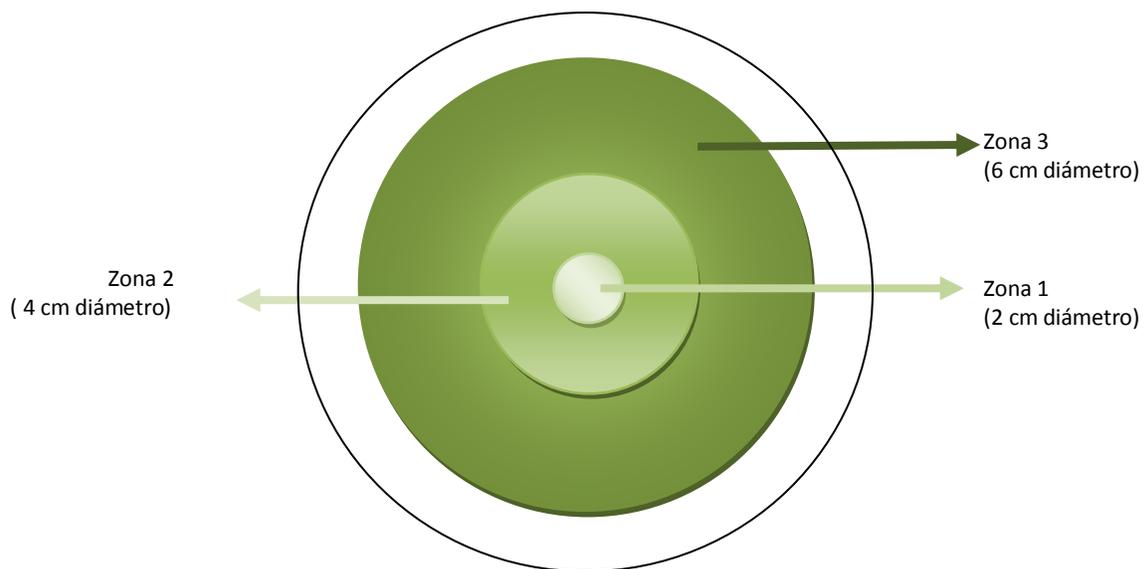
El área 1 corresponderá al centro del micelio, el área 2 será la parte media del desarrollo del hongo y el área 3 el crecimiento periférico.



### c) Condición 3

Rodajas de berenjena fueron inoculadas en el centro con *Aspergillus flavus* NRRL-4561, sin el uso de membranas de policarbonato, se incubaron a 30°C en una cámara húmeda por 17 días. Se determinaron las enzimas producidas por el hongo a diferentes tiempos de incubación y en diferentes áreas de desarrollo del micelio.

Como control se utilizaron rodajas de berenjena no inoculadas adicionadas de 2 µl de solución salina (0.9% P/V) Tween 80 al 0.005 V/V estéril, se incubaron a 30°C en una cámara húmeda por 17 días, a estas rodajas se les llamaran rodajas no inoculadas. Se determinaron las enzimas a diferentes tiempos de incubación y en diferentes áreas como se muestra a continuación.



En el caso de los medios líquidos se realizaron 3 experimentos independientes, para el medio sólido y el material biológicamente activo se llevaron a cabo 8 replicas independientes. Se calculó la desviación estándar y el promedio para cada caso.

## **5. Métodos**

### **5.1 Extracción enzimática**

Para la extracción en los medios sólido, primero se cortaron las tres zonas definidas previamente, se realizó una maceración homogénea con buffer de acetatos 100 mM pH=5.0 a temperatura ambiente; para la zona 1 se utilizaron 5 ml, para la zona 2, 7 mL y para la zona 3, 10 mL. La mezcla se centrifugó recuperando el sobrenadante, que fue utilizado para las determinaciones siguientes.

En la extracción de las rodajas de berenjena, se cortaron las tres zonas establecidas y se realizó una maceración homogénea a baja temperatura, sin usar ningún tipo buffer, la pulpa se centrifugó recuperando el sobrenadante el cual fue utilizado posteriormente.

### **5.2 Determinación de azúcares reductores**

Los azúcares reductores se determinaron en los filtrados libre de células por el método de DNS. La mezcla de reacción consistió de 0.1 mL de muestra + 0.9 mL de H<sub>2</sub>O + 2 mL de DNS, la mezcla fue puesta en ebullición por 5 min., se le añadieron 5 mL de H<sub>2</sub>O y se leyó a una  $\lambda = 575$  nm en el espectrofotómetro. La concentración de azúcares reductores fue calculada utilizando una curva estándar de glucosa.

### **5.3 Determinación de actividades enzimáticas**

#### **a) Actividad xilanolítica**

La actividad xilanolítica se determinó a través de la cuantificación de los azúcares reductores liberados del xilano por el método DNS, usando una curva de xilosa como patrón, obtenidos después de la incubación de: 0.5 mL de xilano de abedul (Sigma Chemical Co.) al 1% (w/v) + 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM a pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células, a 50°C durante 20 min. Al término del tiempo de incubación se le adicionó 1 mL de DNS y la mezcla se calentó a ebullición por 5 min., se le añadieron 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se leyó a una  $\lambda=575$  nm en el espectrofotómetro.

Una unidad (U) de actividad xilanolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1  $\mu$ mol de xilosa en 20 min. a las condiciones de ensayo.

#### **b) Actividad pectinolítica**

Se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados por la pectina por el método DNS, usando una curva de ácido galacturónico. El sistema de reacción consistió de 0.5 mL de pectina (de frutas cítricas, con un contenido de 85% de GalA y 10% de grupos metoxilo, Sigma) al 1% (w/v), con 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM a pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células a 45°C durante 20 min. Al término del tiempo de incubación se le adicionó 2 mL de DNS y la mezcla se calentó a ebullición por 5 min., se le añadieron 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se leyó a una  $\lambda=575$  nm en el espectrofotómetro.

Una unidad (U) de actividad pectinolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1  $\mu$ mol de ácido galacturónico en 20 min. a las condiciones de ensayo.

### **c) Actividad celulolítica**

Se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados por la celulosa por el método DNS, usando una curva de ácido glucosa. El sustrato fue 50 mg de papel filtro (Whatman N°1) en 0.9 mL de buffer de acetatos 100 mM a pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células a 40°C durante 3 hrs. Para detener la reacción se le añadió 2 mL de DNS y la mezcla se calentó a ebullición por 5 min., se le añadieron 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se leyó a una  $\lambda=575$  nm en el espectrofotómetro.

Una unidad (U) de actividad celulolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1  $\mu$ mol de glucosa en 3 hrs. a las condiciones de ensayo

### **5.4 Determinación de proteína**

#### Método de Bradford

Se determinó por la cuantificación de la unión de un colorante, Comassie Blue G-250, a las proteínas usando una curva de albumina sérica bovina. El sistema de reacción consistió de 150  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 50  $\mu$ L de filtrado enzimático libre de células y 1 mL de reactivo de Bradford, a temperatura ambiente y se leyó a una  $\lambda=575$  nm en el espectrofotómetro.

## 5.4 Electroforesis

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se realizó de acuerdo a Laemmli (1970). El gel separador contiene acrilamida al 12% y bis-acrilamida al 2.7% (Bio-Rad Laboratories). Las muestras utilizadas fueron concentradas y resuspendidas en el volumen mínimo posible de buffer de corrimiento (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0.1%) (Bio-Rad Laboratories) y se adicionó buffer de tratamiento desnaturizante (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, buffer Tris-HCl 125 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol 0.005%).

Se emplearon 250  $\mu$ g de proteína (determinada por el método de Bradford, utilizando albumina de suero bovino como estándar) de cada muestra para realizar la electroforesis, la cual se llevó a cabo a corriente constante 15mA, a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm migtle Small SE-245 (Hoefer Sci. Ins. USA). Después de este tiempo los geles fueron teñidos con una solución que contiene azul de Coomasie R-250 al 0.125%, metanol al 50% y ácido acético al 10%

## 5.6 Zimogramas (Actividad *in situ*)

La actividad *in situ* (zimograma) xilanolítica se determinó incubando el gel de acrilamida en las condiciones ya descritas, en buffer renaturalizante (Tris- HCl 10 mM pH= 7.5) por 1 h. A 37°C, con cambio de buffer a los 30 min., se decantó y se incubó en buffer de acetatos 100 mM pH 5.0 durante 30 min., posteriormente se añadió xilano de abedul (Sigma Chemical Co.) al 1% a pH=5.0 con buffer de acetatos y se incubó sin agitación a 37°C durante 30 min., se decantó y se eliminó el exceso del sustrato, después se añadió etanol 96° por 15 min; posteriormente se hidrató con H<sub>2</sub>O por 20 min, después el gel se tiñó con solución rojo congo al 0.1% por 30 min., se decantó y se agregó NaCl 1M durante 15 min. a temperatura ambiente.

En cuanto a la actividad pectinolítica se determinó sumergiendo el gel en una solución renaturalizante (Tris- HCl 100 mM pH= 6.8) sin agitación a 37°C durante 1 h. con cambio de buffer a los 30 min., posteriormente se sumergió en una solución de pectina al 1% (de frutas cítricas, con un contenido de 85% de GalA y 10% de grupos metoxilo, Sigma) en buffer de acetatos 100 mM pH 5.0 durante 3h., finalmente el gel se tiñó con una solución de rojo de rutenio 0.05% durante 30 min, y se lavó con agua destilada para quitar el exceso de colorante.

Cada vez que se corría un gel para determinar proteína, se corría uno análogo para determinar actividad enzimática, los geles pueden ser superpuestos revelando que proteínas corresponden a las enzimas hidrolíticas del zimograma.

## VII. Resultados y Discusión

### Medio líquido

La síntesis de enzimas extracelulares de hongos como *Aspergillus*, se ve influenciada por los componentes del medio de cultivo, especialmente por la fuente de carbono. En la producción de xilanasas algunas fuentes de carbono utilizadas son: mazorca de maíz, salvado de trigo, salvado de arroz, paja de arroz, tallo de maíz y bagazo de caña de azúcar entre otras; y en la producción de pectinasas se usan fuentes de carbono como: pectina, pulpa de remolacha de azúcar, mazorca de maíz molida, paja de trigo y cáscara de arroz.

Las ventajas que ofrecen estas fuentes de carbono, es que son materiales de desecho baratos y que se puede ayudar a combatir la contaminación ambiental debida a estos residuos.

La cepa de producción se cultivó en medios líquidos con la finalidad de conocer el perfil enzimático en diferentes sustratos complejos y evaluar su capacidad y potencial degradativo. Se evaluaron el salvado de trigo y la berenjena como fuentes de carbono ricas en polisacáridos complejos, que pueden servir como fuente de alimento para el hongo y al mismo tiempo producir enzimas que hidrolicen los sustratos presentes en el medio tal y como ocurre en la naturaleza.

En la Figura 12 se aprecian los perfiles de azúcares reductores en cada fermentación. Son iguales en el mismo sustrato es decir las condiciones de agitación no modifican el perfil pero si los diferentes sustratos.

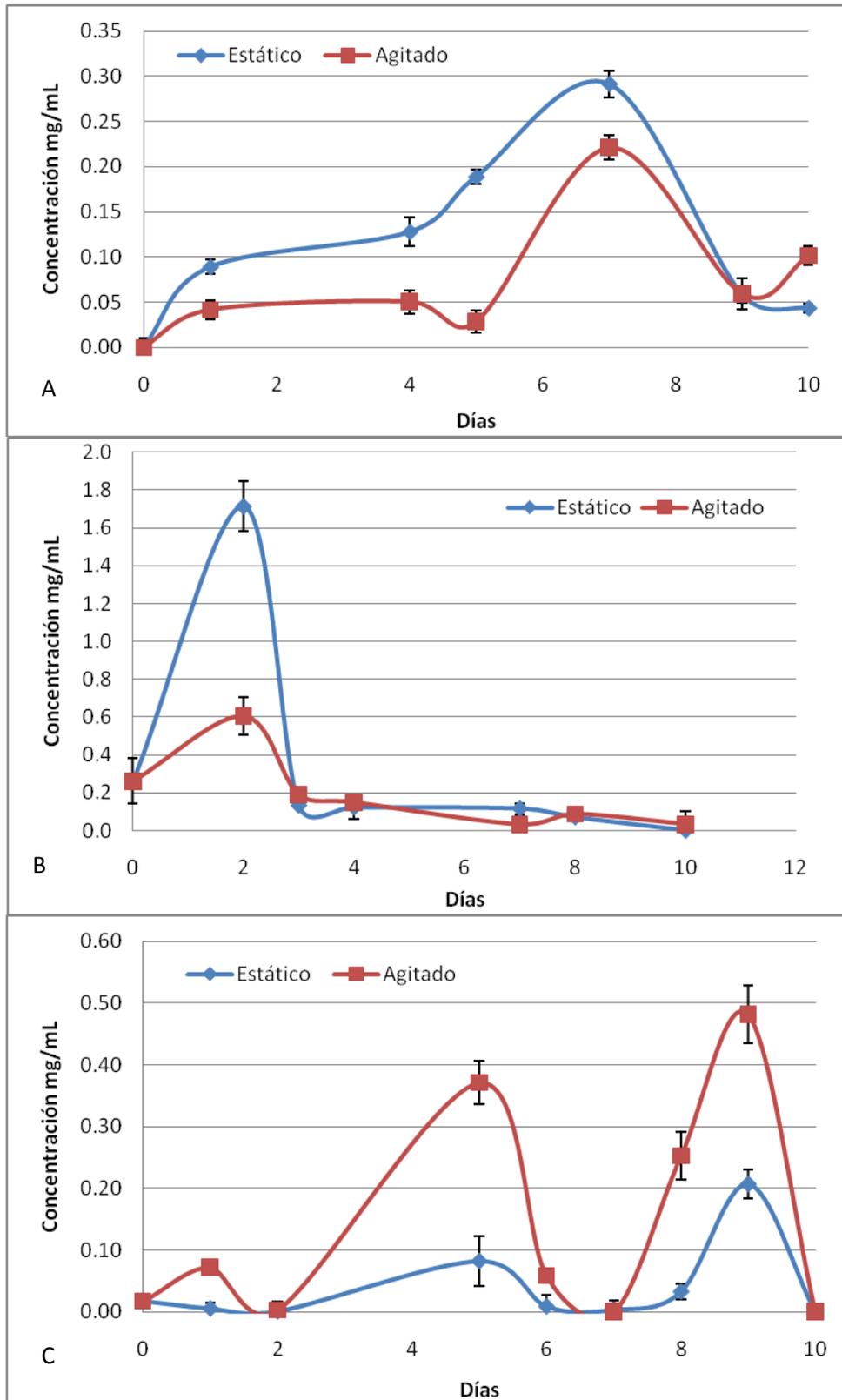


Figura 12. Comparación del perfil de azúcares reductores en medio líquido. A) Salvado de trigo Lavado 3%, B) Salvado de trigo no Lavado 3%, C) Berenjena 3%. (n= 3)

El salvado de trigo lavado fue exhaustivamente lavado con agua destilada para eliminar los azúcares reductores disponibles que pudieran ser utilizadas como fuente de carbono fácilmente asimilable, es por esto que al inicio no hay azúcares libres. Conforme avanza la fermentación se observa un aumento de azúcares reductores llegando a un máximo al séptimo día de aproximadamente 0.25 mg/mL. (Figura 12).

La máxima concentración de azúcares libres en salvado de trigo lavado, se presenta en el 8° día en medio estático y agitado, Figura 12. La máxima actividad xilanolítica en medio estático se presenta al 4° día y en medio agitado al 5° día, las dos cuando la concentración de azúcares reductores es baja, aunque hay un aumento de actividad xilanolítica cuando hay un aumento de azúcares reductores. En el caso de la actividad pectinolítica presenta una actividad muy baja cuando la concentración de azúcares libres es alta, y tiene un máximo de actividad cuando los azúcares son bajos, presentando un máximo de actividad pectinolítica al primer día de incubación en medio estático, y al 5° día en condiciones de agitación. La máxima actividad celulolítica se presenta al 4° día en medio agitado y al 5° día en medio estático, cuando la concentración de azúcares reductores es baja.

Los azúcares reductores del salvado de trigo no lavado al inicio de la fermentación es de 0.20 mg/mL aumentando significativamente en el segundo día del experimento para disminuir en los días siguientes (Figura 12). Al inicio la velocidad de consumo de azúcares es diferente a la velocidad de producción de éstos ya que el crecimiento va aumentando y la demanda de nutrientes se intensifica, conforme avanza el tiempo la velocidad de consumo es igual al de la producción. Cuando el medio se encuentra agitado la concentración de azúcares libres es mucho menor que en el medio estático a lo largo de toda la fermentación.

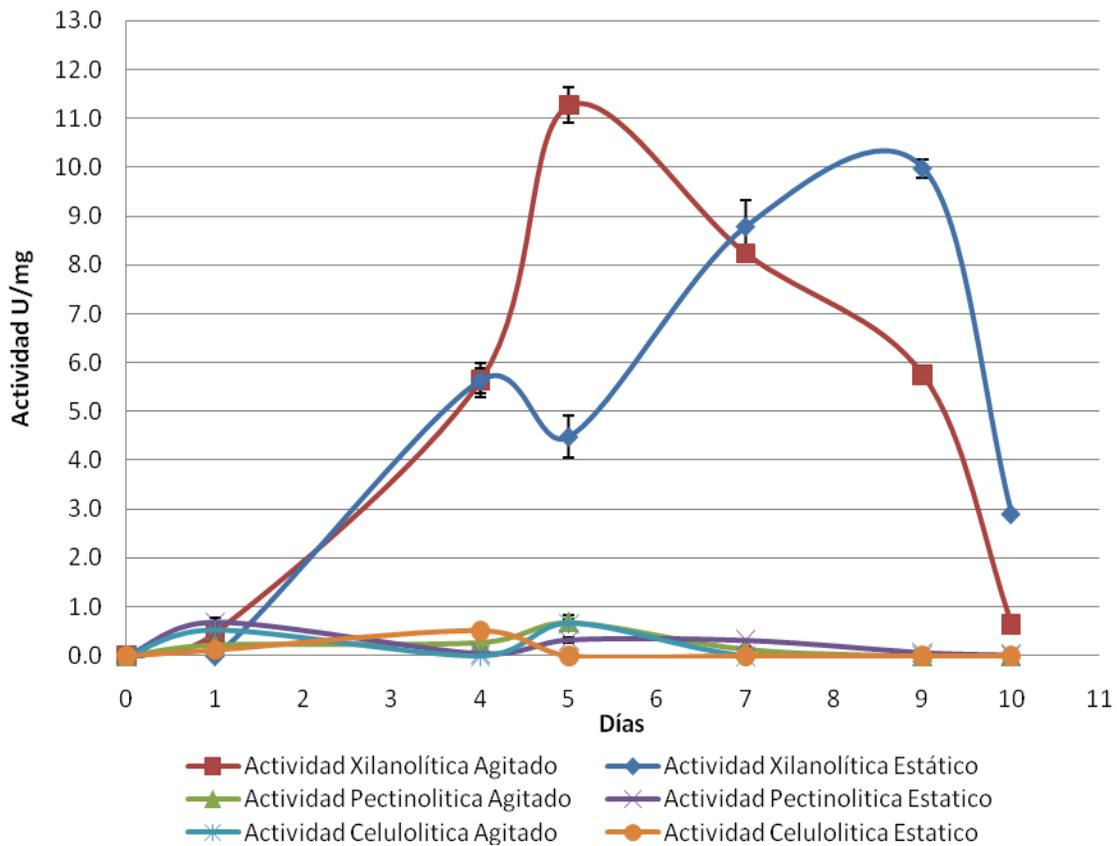
Las máximas actividades xilanolíticas, tanto en condiciones estáticas como de agitación, en salvado de trigo no lavado presentan un máximo al 4° día de incubación cuando la concentración de azúcares reductores es baja, Figura 12. En el caso de la actividad pectinolítica se tiene un máximo de actividad enzimática al

4° día en los dos casos, agitado y estático, cuando los azúcares libres son muy pocos. La máxima actividad celulolítica en condiciones estáticas y de agitación se encuentra en el tercer día de incubación y los niveles de azúcares reductores son bajos.

Con la berenjena observamos que la actividad de enzimas genera azúcares reductores, algunos de ellos son asimilados y otros se van acumulando, Figura 12. El perfil de azúcares reductores puede deberse a que la velocidad de degradación de la berenjena no es igual a la velocidad de asimilación de los productos de hidrólisis o que los sustratos son liberados lentamente de las partículas sólidas de la berenjena. Los puntos máximos de azúcares reductores se presentan al 5° y 9° día de incubación. La máxima actividad xilanolítica se presenta cuando la concentración de azúcares reductores es baja, en el caso del medio estático al 8° día y en medio agitado en el 6° día. La máxima actividad pectinolítica y celulolítica se encuentra cuando la concentración de azúcares libres en el medio es baja.

Los máximos de actividad xilanolítica, pectinolítica y celulolítica, se presentan cuando la concentración de azúcares reductores en el medio es baja.

En la Figura 13 se presenta el seguimiento de las actividades enzimáticas en berenjena, donde se observa una variación en cuanto a la magnitud y comportamiento de las actividades determinadas, (xilanolítica, pectinolítica y celulolítica) en condiciones estáticas y de agitación constante. La producción de enzimas xilanolíticas es más acelerada y más abundante en condiciones de agitación, a diferencia de la actividad celulolítica y pectinolítica cuya máxima actividad se obtiene en el medio estático. En éste caso la actividad pectinolítica y celulolítica es muy poca comparándola con la de la que se presentó en las otras fuentes de carbono estudiadas (salvado de trigo lavado y no lavado).

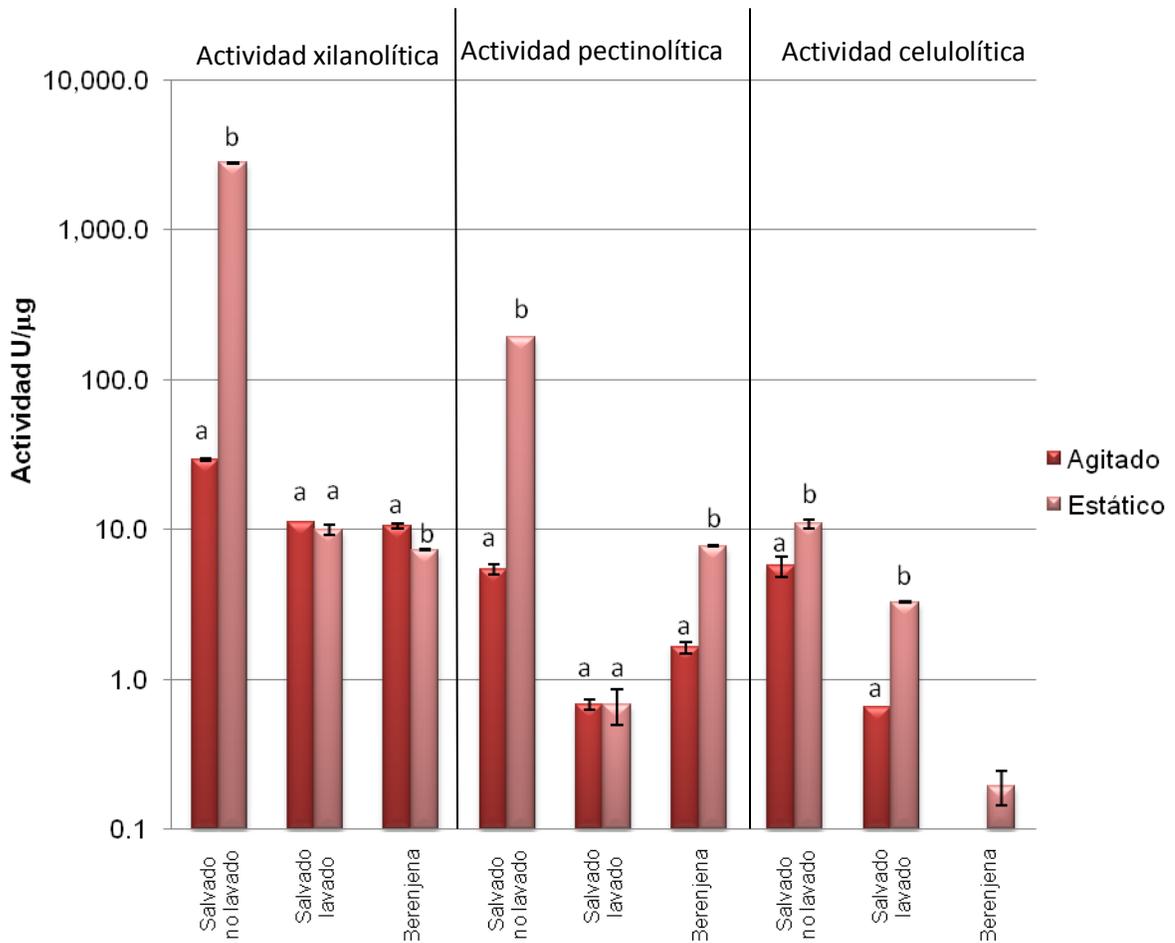


**Figura 13. Perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 6541 en berenjena 3%, cultivado a 37°C, en condiciones estáticas y de agitación constante (200 rpm) ( n=3).**

En salvado de trigo no lavado, las máximas actividades se presentan en condiciones estáticas, Figura 14, para la actividad xilanólica y pectinolítica al 4to día y la celulolítica al 2º día de fermentación, las tres a tiempos cortos de la fermentación.

Para la actividad xilanólica y pectinolítica en salvado de trigo lavado no existe una diferencia significativa entre las condiciones de agitación y estáticas, Figura 14, la actividad celulolítica se ve favorecida en el medio estático.

Usando como fuente de carbono berenjena, la máxima actividad xilanólica se encuentra en condiciones de agitación constante, y para las actividades pectinolíticas y celulolíticas, se encuentran en el medio estático. Figura 14



**Figura 44. Actividad enzimática máxima de *Aspergillus flavus* 6541 en medio líquido, incubado a 37°C. (n=3)**

Cuando los sustratos son salvado de trigo lavado y berenjena la actividad xilanolítica se ve ligeramente influenciada por la aireación del medio, ya que la mejor actividad enzimática se encuentra cuando el medio se encuentra bajo agitación constante, (Figura 14), pero cuando el sustrato es salvado de trigo no lavado se aprecia una notable influencia del aire en la producción de estas enzimas, observando una gran diferencia de secreción entre el medio agitado y estático.

Para el salvado de trigo no lavado y berenjena la actividad pectinolítica se ve afectada por el aire en el medio, favoreciendo la actividad en condiciones estáticas. En el salvado de trigo lavado no hay una diferencia significativa entre las dos condiciones estudiadas.

La actividad celulolítica presenta mayores valores en condiciones estáticas, por lo que esta actividad es afectada por la aireación del medio para los tres sustratos estudiados. Figura 14

Fue en salvado de trigo no lavado donde se presentaron las mayores actividades enzimáticas; xilanolítica (2818.74 U/ $\mu$ g), pectinolítica (192.25 U/ $\mu$ g) y celulolítica (10.91 U/ $\mu$ g), las tres en condiciones estáticas. El sustrato que menos favoreció la producción de enzimas pectinolíticas y xilanolíticas fue el salvado de trigo lavado, ya que al ser lavado la pectina se pierde más y más fácilmente que el xilano. La berenjena fue el sustrato que menos favoreció la producción de enzimas celulolíticas.

En las Figuras 15 y 16 se observa el desarrollo del hongo a lo largo de las fermentaciones en los sustratos de salvado de trigo lavado y no lavado, de los medios líquidos con berenjena no se presentan las fotografías.

En el medio estático de los tres sustratos estudiados, el desarrollo fúngico sólo se llevó a cabo en la superficie del medio observándose una gran esporulación, que en los primeros días era de color verde-amarillo y en los últimos días de color verde intenso. En el cultivo agitado el desarrollo abarcó todo el medio sin presentar esporulación.



Figura 5. Salvado de trigo Lavado. Agitado: A) Tiempo 0, B) 4 días, C) 7 días, D) 10 días. Estático: E) 1 día, F) 5 días, G) 9 días, H) 10 días.



Figura 16. Salvado de trigo No Lavado. Agitado.: A) Tiempo 0, B) 4 días, C) 7 días, D) 10 días. Estático: E) 4 días, F) 5 días, G) 9 días, H) 10 días.

## Material vegetal biológicamente activo

El género *Aspergillus* utiliza el material vegetal en descomposición como nicho ecológico primario, lo que le convierte en un género cosmopolita de distribución universal. En la naturaleza *Aspergillus flavus* es uno de los hongos más abundantes y con mayor distribución, capaz de desarrollarse en muchos sustratos como plantas, árboles, insectos, animales y muchos tipos de granos. La berenjena fue empleada como modelo biológico activo para estudiar la degradación del material vegetal por el hongo como ocurriría normalmente en la naturaleza.

El desarrollo del hongo sobre este sustrato fue muy lento, ya que para que el hongo pueda desarrollarse debe penetrar y degradar las barreras constituidas por varios polímeros como la pectina, xilano y celulosa, es decir depende de la actividad hidrolítica que tenga, ya que de esta deriva la capacidad de absorción de nutrientes. Las pectinasas, amilasas, celulasas, lipasas y glucanasas tienen un papel importante en la patogenicidad del hongo

A continuación se muestran los resultados promedio obtenidos al inocular *Aspergillus flavus* sobre el material vegetal. (Condición 3 de la sección de Materiales y Métodos)

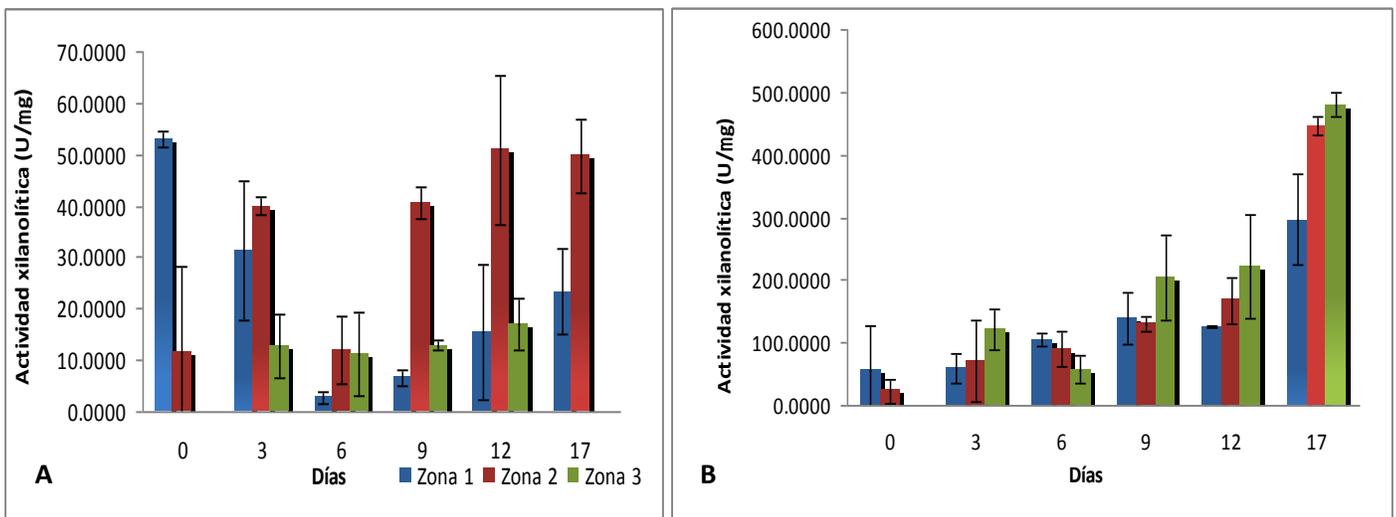


Figura 17. Comparación de la actividad xilanólítica en rodajas de Berenjena incubadas a 29°C. A) Rodajas No inoculadas, B) Rodajas Inoculadas. (n=8)

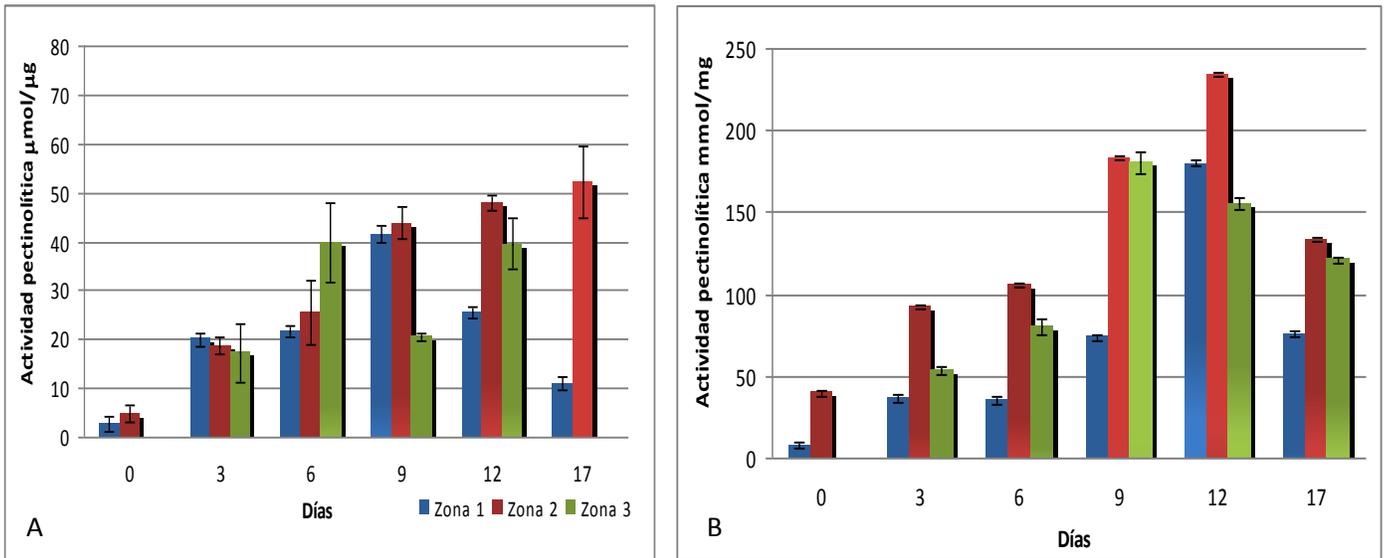
La máxima actividad xilanolítica en las rodajas de berenjena no inoculadas se encuentra por debajo de las actividades determinadas cuando se inoculó el hongo.

La berenjena tiene actividad xilanolítica y pectinolítica aunque no haya sido inoculada, por que el fruto se encuentra vivo y madurando, estas actividades enzimáticas son menores que cuando la rodaja es inoculada, el aumento de la actividad enzimática es debida al desarrollo del hongo sobre el material vegetal, ya que para crecer necesita degradar el sustrato donde se encuentra, que en su mayoría son polisacáridos. Hay que destacar que ninguna de las rodajas ya sean inoculadas o no inoculas presentaron contaminación ni bacteriana ni fúngica.

Durante los primeros días de incubación de las rodajas no inoculadas e inoculadas la actividad xilanolítica es diferente en las tres zonas estudiadas, es en los últimos días cuando la máxima actividad se encontró en la zona 2 en el caso de la berenjena no inoculada, Figura 17 A, y en la zona 3 en el caso del fruto inoculado, Figura 17 B.

La actividad xilanolítica máxima se detectó al día 17 de incubación en la zona 3 (479.33 U/ $\mu$ g), a este tiempo el hongo ocupó toda la superficie de la berenjena observándose una gran esporulación y una colonia color verde (Figura 19F), pero es en la zona de la periferia donde hay una mayor actividad debida tal vez a la degradación de la pulpa de la berenjena y a la de las semillas, siendo estas últimas rica en hemicelulosa.

Como en el caso anterior durante los primeros 6 días de incubación la actividad pectinolítica es diferente entre las tres zonas estudiadas y es a partir del noveno día cuando la actividad enzimática es mayor en la zona 2 (Figura 18A), pero es menor que la actividad que se presenta en el material vegetal inoculado durante todo el experimento.



**Figura 18. Actividad pectinolítica en rodajas de berenjena incubadas a 29°C. A) Rodajas No inoculadas, B) Rodajas Inoculadas. (n=8)**

A lo largo de todo el experimento en las rodajas inoculadas, la actividad pectinolítica presenta sus máximos en la zona media, Figura 18 B, detectándose la mayor actividad en el día 12 de incubación en la zona 2 (233.90 U/µg). La zona 2 presenta una coloración café (Figura 19E) debida tal vez a un aumento de la actividad pectinolítica en esta región, a los 17 días de incubación el hongo cubre toda la superficie de la rodaja y la actividad pectinolítica disminuye ya que hay una mayor secreción de otras enzimas que permitan al hongo desarrollarse como las enzimas xilanolíticas.

La determinación de la actividad celulolítica no se llevó a cabo debido a la falta de muestra, ya que la cantidad obtenida en cada caso era muy poca.

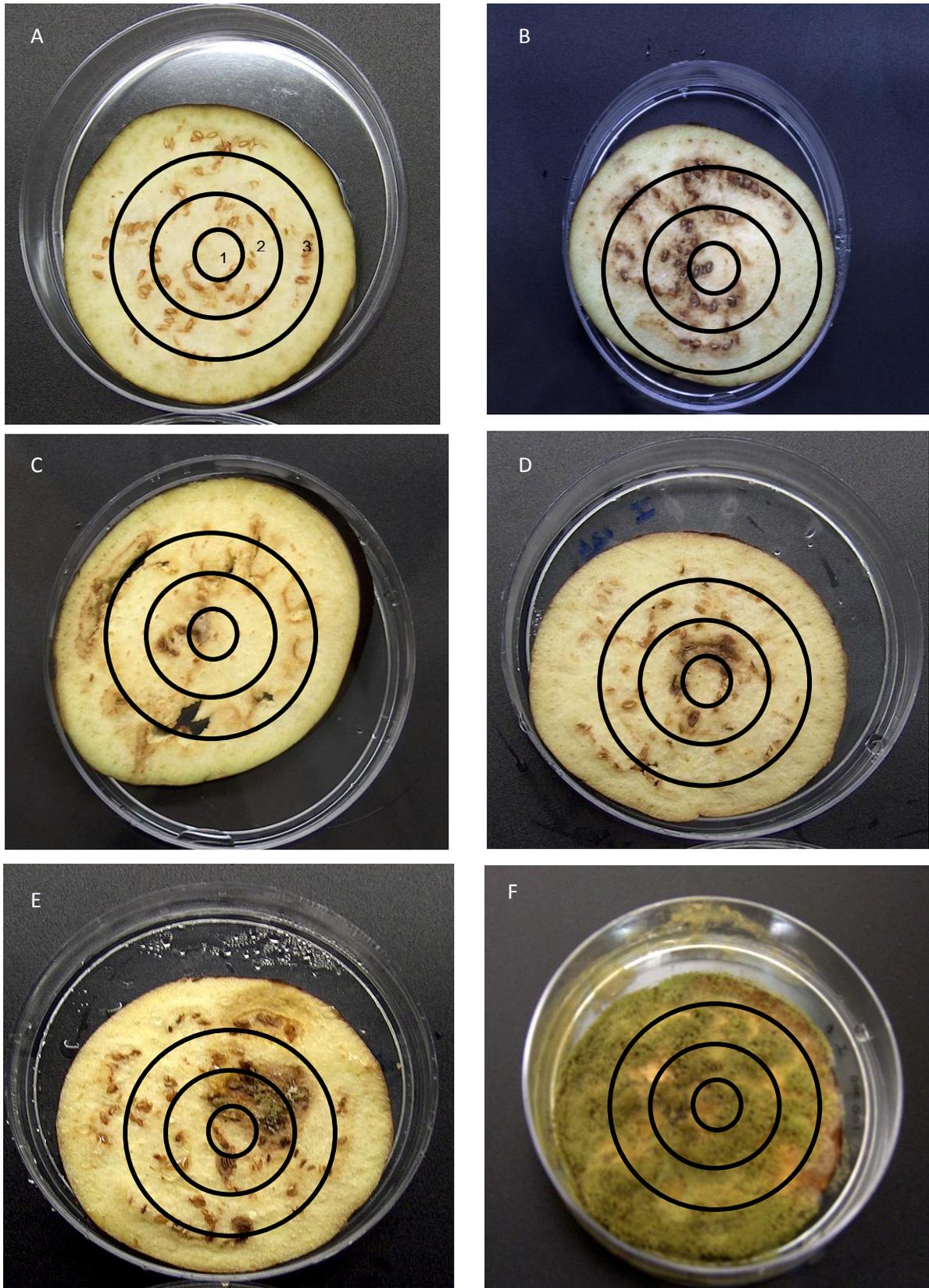


Figura 19. Rodajas de Berenjena. A) Tiempo 0, B) 3 días de incubación, C) 6 días de incubación, D) 9 días de incubación, E) 12 de incubación, F) 17 días de incubación

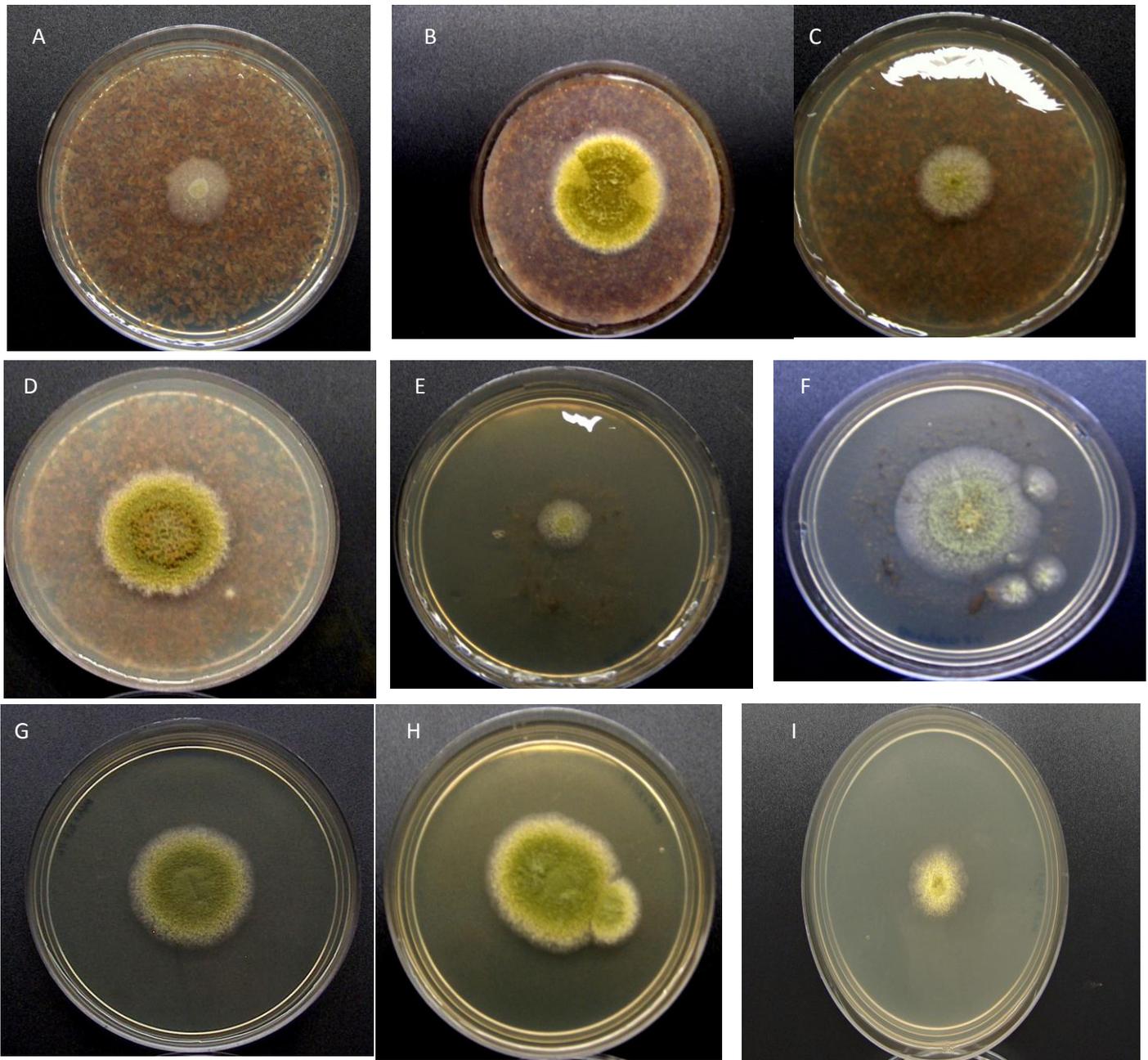
### **Medio sólido (Colonia completa)**

El sistema para estudiar la diferenciación zonal consistió en el uso de membranas porosas de policarbonato, las cuales permitieron el estudio de la secreción de proteínas en el medio sólido y en diferentes zonas, sin la interferencia del micelio. (Condición 2, de la sección de materiales y métodos)

Los hongos filamentosos tienen un papel importante en la degradación del material orgánico y por lo tanto él en ciclo del carbono. Los hongos forman un micelio, que consiste en una red de hifas interconectadas, estas hifas segregan varias enzimas al medio que son capaces de degradar el material orgánico convirtiéndolo en pequeñas moléculas, las cuales pueden ser absorbidas y usadas como nutrientes por el hongo.

La periferia de la colonia está expuesta al material orgánico inexplorado por las hifas, mientras que su centro está rodeado por un sustrato que en parte ha sido utilizado para su desarrollo. La colonización del hongo por el micelio en sustratos sólidos se da por extensión de la hifa, sin embargo se sabe poco de las diferencias entre hifas del centro y de la periferia, en términos del tipo de enzimas que producen. (Levin Chucrel, 2007)

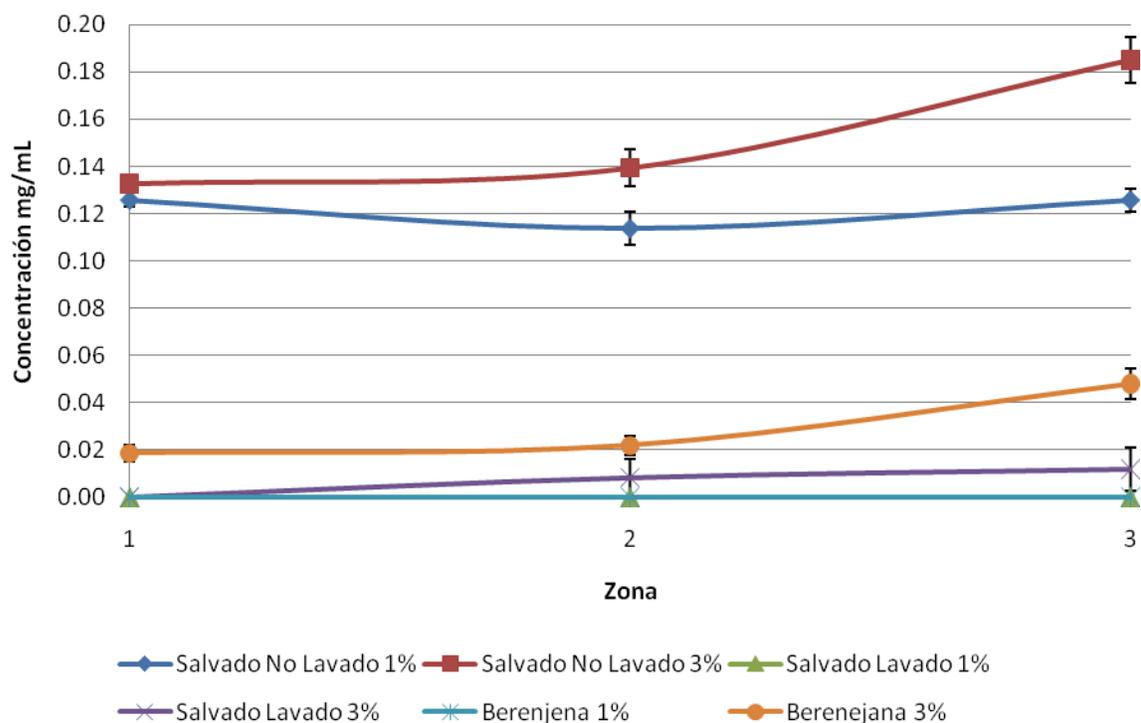
En la figura 20 se observan los controles de crecimiento de la cepa de *Aspergillus flavus* 6541 sobre los diferentes sustratos complejos utilizados (A-F), salvado de trigo lavado, salvado de trigo no lavado y berenjena, así como a las diferentes concentraciones de fuente de carbono estudiadas, además del desarrollo en diferentes azúcares simples (G-I).



**Figura 20. Controles de crecimiento, 5 días de incubación a 37°C. A) Salvado de trigo Lavado 1%, B) Salvado de trigo Lavado 3%, C) Salvado de trigo No Lavado 1%, D) Salvado de trigo No Lavado 3%, E) Berenjena 1%, F) Berenjena 3%, G) Xilosa 1%, H) Glucosa 1%, I) Ácido galacturónico.**

Éste control se realizó para observar el desarrollo del hongo a lo largo de diferentes periodos de tiempo y determinar el tiempo adecuado para su posterior incubación con las membranas de policarbonato. Se cultivó en los medios sólidos

con sustratos complejos para observar si había algún impedimento de crecimiento debido a la fuente de carbono compleja. Las fuentes de carbono simples, como la xilosa, glucosa y ácido galacturónico, son algunos productos de degradación de la acción de las enzimas estudiadas sobre los sustratos complejos empleados. En todos los casos, tanto con sustratos complejos como con simples, el hongo pudo desarrollarse, teniendo un mayor desarrollo a una concentración de 3% de la fuente de carbono, y un crecimiento escasos en ácido galacturónico, debido a que este es una fuente de carbono no favorable para el desarrollo del hongo.



**Figura 21. Comparación de los perfiles de azúcares reductores en medio sólido (n=3)**

En la Figura 21, podemos observar la concentración de azúcares reductores en las tres zonas analizadas, con los diferentes sustratos utilizados antes de la incubación. Los azúcares libres para el salvado de trigo lavado y la berenjena, tanto al 1% como al 3%, se encuentran en muy bajas concentraciones al inicio de la incubación. El salvado de trigo no lavado al 1% y al 3% son los únicos que

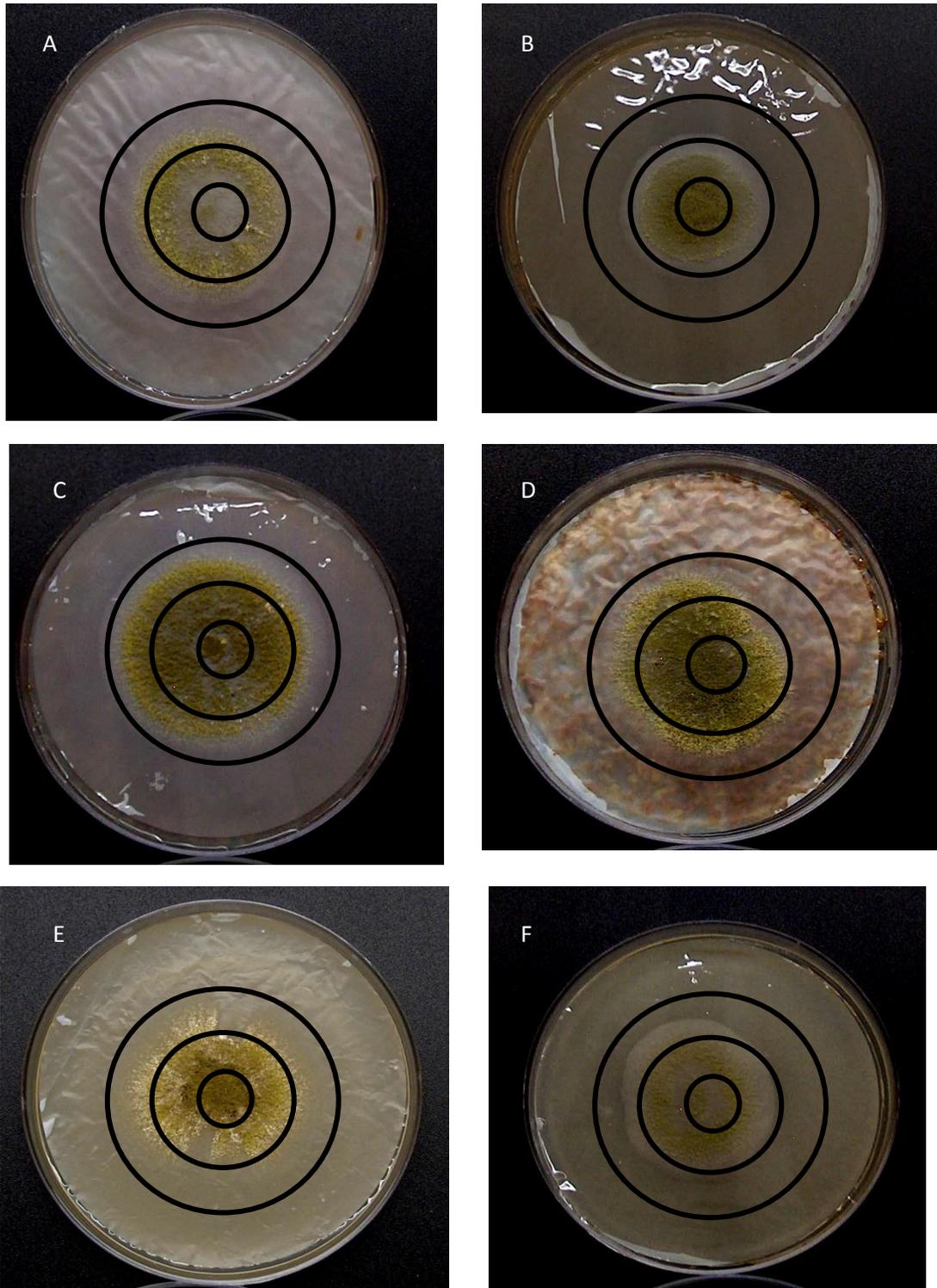
presentan una concentración mayor de azúcares reductores, debido a que tienen muchos azúcares libres presentes en el sustrato.

Para seleccionar los tiempos de incubación de los medios sólidos se realizaron diferentes experimentos donde se observó el tamaño de la colonia en diferentes tiempos de incubación.

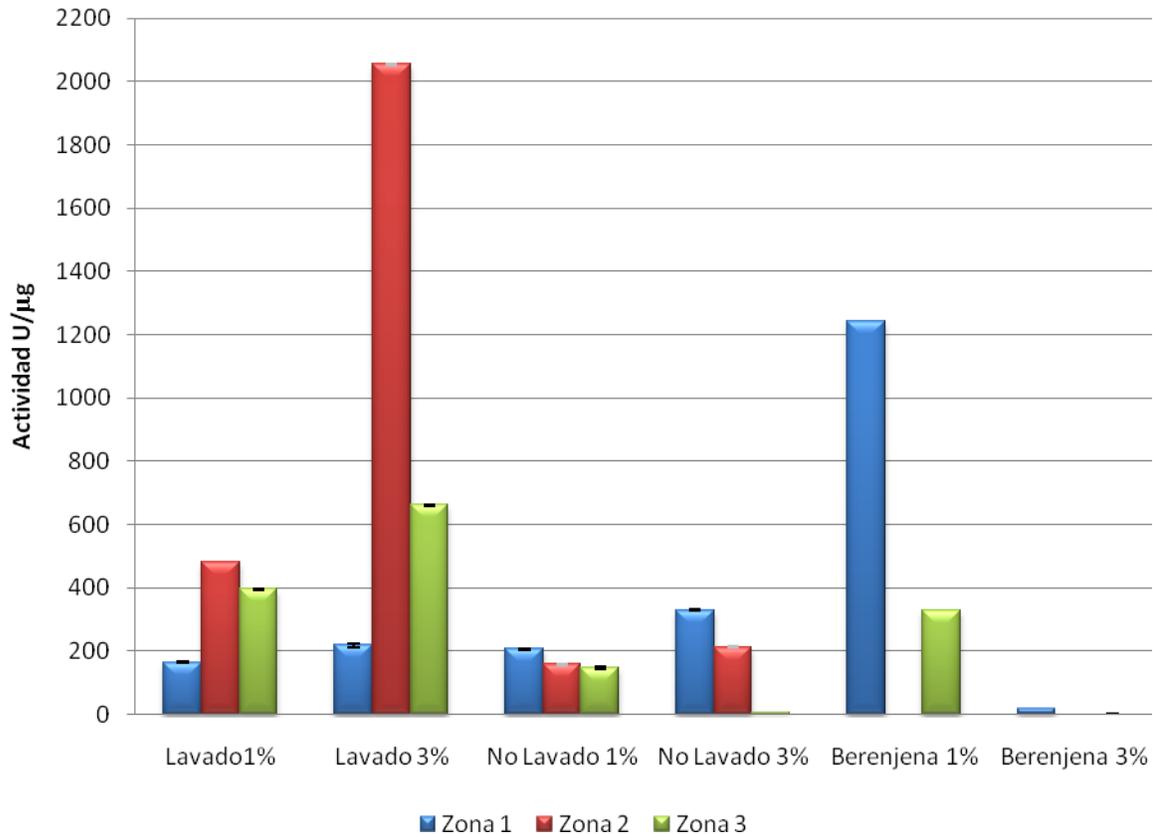
En el caso del uso de una membrana de policarbonato se seleccionó aquel tiempo donde el crecimiento del hongo abarcará las 3 zonas de estudio y que no fuera muy prolongado. El tiempo que cubrió estas necesidades fue de 5 días de incubación. (Condición 2, sección de materiales y métodos)

Para los medios usando dos membranas de policarbonato se eligió el tiempo donde el desarrollo del hongo no fuera tan grande que saliera de la circunferencia de las dos membranas usadas y presentará esporulación, ya que el crecimiento del hongo en esta condición es muy rápido, el tiempo que se seleccionó fue de dos días.

El crecimiento del hongo sobre los medios sólidos con una membrana de policarbonato a los 5 días de incubación fue de aproximadamente 5 cm de diámetro, el aspecto del micelio es aterciopelado de color verde y bordes blancos. (Figura 22)



**Figura 22. Crecimiento de medio sólido con una membrana de policarbonato, 5 días de incubación a 37°C. A) Salvado de trigo Lavado 1%, B) Salvado de trigo Lavado 3%, C) Salvado de trigo No Lavado 1%, D) Salvado de trigo No Lavado 3%, E) Berenjena 1%, F) Berenjena 3%.**



**Figura 23. Comparación de la actividad xilanólítica en medios sólidos de diferentes fuentes de carbono, 5 días de incubación a 37°C, con una membrana porosa de policarbonato. (n=8)**

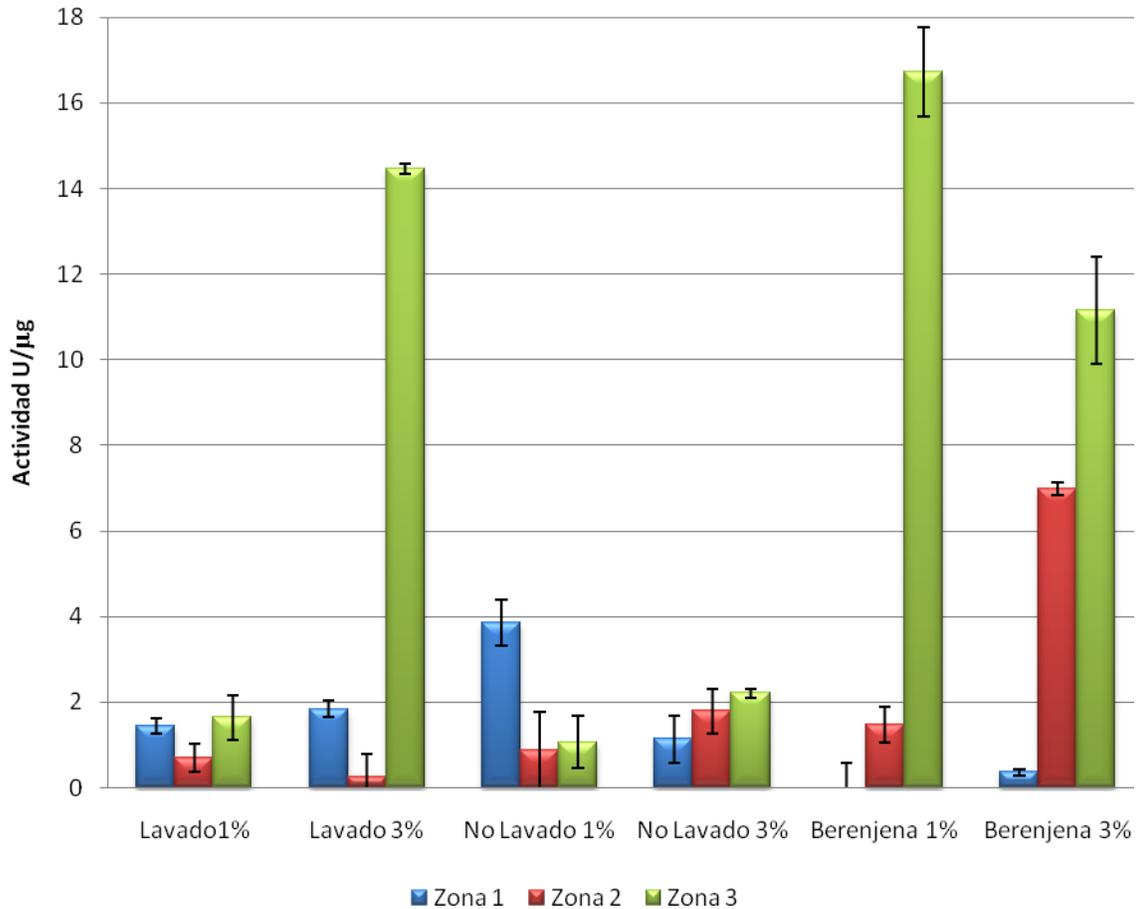
En el caso de la actividad xilanólítica en salvado de trigo lavado, Figura 23, la mayor secreción de esta enzima se encuentra en la zona 2 del medio. Las hifas de la periferia, las que están en contacto con el material orgánico nuevo, son las que secretan esta enzima, lo que permite la colonización del medio, y la degradación parcial del xilano presente. Las hifas del centro de la colonia, que ya estuvieron en contacto con los polisacáridos complejos, no secretan una gran cantidad de enzimas xilanólíticas, a este tiempo de incubación, ya que el xilano presente ya fue posiblemente degradado en su mayoría o ya no hay sustratos accesibles que pueda utilizar para su desarrollo. Las hifas de la zona 3, que son las más externas y las más jóvenes, secretan una mayor cantidad de enzimas xilanólíticas que en el centro pero no es tan elevada como en la zona 2, ya que las hifas comienzan a reconocer el sustrato en el que se encuentran.

La secreción de enzimas xilanolíticas en el salvado de trigo lavado es mayor cuando la concentración de la fuente de carbono es de 3%, posiblemente a que la cantidad de sustrato es mayor se necesita una mayor cantidad de enzimas para degradarlo y utilizarlo. Figura 23

En salvado de trigo no lavado, Figura 23, la mayor producción de enzimas xilanolíticas es llevada a cabo en el centro de la colonia, zona1. El salvado no lavado tiene una gran cantidad de azúcares simples los cuales pueden ser utilizados por el hongo para su desarrollo, después de haber consumido estos sustratos simples tiene que degradar los sustratos complejos presentes en el medio, y es cuando la secreción de enzimas xilanolíticas se incrementa, así que al tiempo de la determinación enzimática los sustratos simples se agotaron y el hongo pudo comenzar a utilizar los sustratos complejos. Las zonas 2 y 3 presentan una menor secreción de enzimas xilanolíticas que en la zona 1, ya que posiblemente en estas zonas las hifas en desarrollo emplean los azúcares simples y degradan muy poco los sustratos complejos. En la zona 3 del salvado de trigo no lavado al 3% la producción de enzimas es muy baja, debido tal vez a una mayor concentración de azúcares simples que utilizar que en una concentración de 1%.

En el caso de la berenjena, la mayor producción de enzimas se encuentra en la zona 1, Figura 23, las hifas del centro de la colonia que ya emplearon los sustratos simples segregan enzimas xilanolíticas para seguir creciendo en el medio. La concentración de este sustrato pudo influir en la secreción de enzimas xilanolíticas, ya que a una concentración de 3% la cantidad producida fue muy baja en comparación con la generada al 1% de concentración.

El sustrato que favoreció más la producción de enzimas xilanolíticas en medio sólido, permitiendo la esporulación del hongo, fue el salvado de trigo lavado a una concentración de 3% (Figura 23). En este sustrato el hongo tuvo que producir una mayor cantidad de enzima quizá porque los azúcares fácilmente asimilables eran prácticamente nulos y tuvo que emplear los sustratos complejos presentes para su desarrollo.



**Figura 24. Actividad pectinolítica en medios sólidos de diferentes fuentes de carbono, 5 días de incubación a 37°C, con una membrana porosa de policarbonato. (n=8)**

En el salvado de trigo lavado (Figura 24) la actividad pectinolítica es mayor en la zona 3, las hifas más jóvenes del micelio y que se encuentran con un sustrato nuevo, aparentemente tienen que secretar una mayor cantidad de enzimas para poder degradarlo. En las zona 1 y 2, las hifas más antiguas posiblemente ya degradaron la mayoría de la pectina del medio a sustratos más simples que son utilizados para el crecimiento del hongo, las enzimas pectinolíticas no son producidas en una gran cantidad quizá porque ya no son tan utilizadas por el hongo. En la concentración de 3% de salvado de trigo lavado la secreción de enzimas pectinolíticas es mayor que al 1%, posiblemente porque la cantidad de pectina es mayor y se necesita una mayor cantidad de enzimas que degraden el polisacárido.

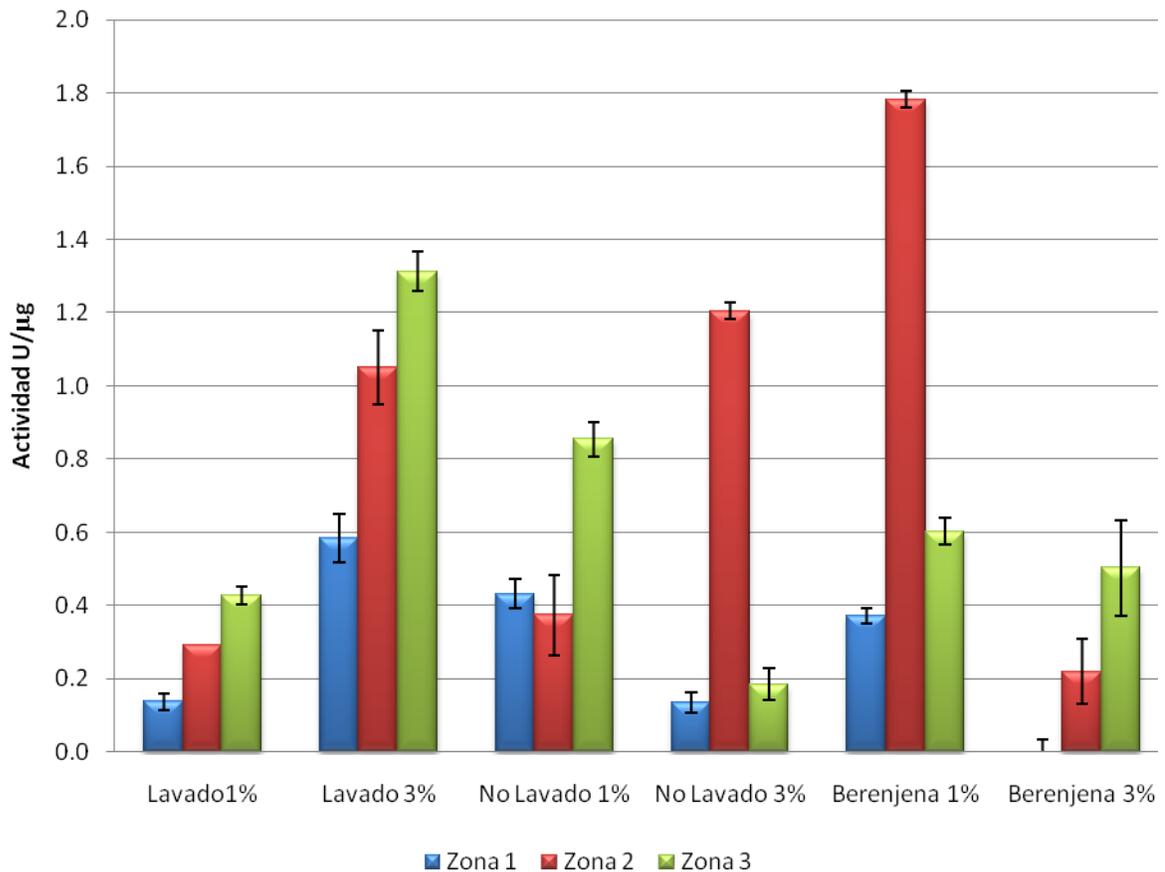
En el caso del salvado de trigo no lavado el perfil de secreción de enzimas pectinolíticas no es el mismo como se observa en la Figura 24. A una concentración de 1% la mayor producción de enzima se lleva a cabo en la zona 1, donde tal vez los sustratos simples del salvado ya fueron utilizados por el hongo y tiene que utilizar la pectina del medio para seguir creciendo, para esto necesita degradar la pectina y producir enzimas pectinolíticas. En las zonas 2 y 3 la producción enzimática es menor quizá porque aún hay azúcares de fácil asimilación. Cuando la concentración de salvado no lavado es de 3% la zona 3 es la que presenta la mayor actividad y la menor actividad es la zona 1, así que la concentración de este sustrato posiblemente afecta la producción de enzimas pectinolíticas.

La actividad pectinolítica en berenjena es mayor en la zona 3 (Figura 24), donde las hifas nuevas posiblemente tienen que secretar una gran cantidad de enzimas pectinolíticas para seguir desarrollándose. En la zona 1 donde la degradación de la pectina del medio ya se llevó a cabo por las hifas más antiguas de la colonia, la secreción de estas enzimas es casi nula ya que el hongo puede emplear los azúcares simples obtenidos de la degradación de sustratos complejos para su desarrollo. La zona 2 presenta actividad pectinolítica mayor que en la zona 1 pero no tan grande como en la zona 3, la pectina sigue siendo degradada por el hongo. La mayor secreción de enzimas pectinolíticas en berenjena fue a una concentración de 1% por lo que posiblemente la fuente de carbono influye en la producción enzimática.

El sustrato que favoreció más la producción de enzimas pectinolíticas en estas condiciones de desarrollo fue la berenjena a una concentración de 1%, posiblemente porque es un sustrato rico en pectina.

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, que puede ingresar a la célula y general la inducción, es decir, un aumento en la concentración de una enzima como consecuencia de la presencia de cierta sustancia química o inductor. (De Vries & Visser, 2001)



**Figura 25. Actividad celulolítica en medios sólidos, 5 días de incubación a 37°C, con una membrana porosa de policarbonato. (n=8)**

Con el salvado de trigo lavado, la actividad celulolítica presenta una mayor producción en la zona 3, Figura 25, donde las hifas nuevas de la colonia secretan una mayor cantidad de enzimas para poder degradar parcialmente la celulosa del medio, ya que los azúcares libres son escasos y los polisacáridos son prácticamente la única fuente de carbono. En las zona 1 y 2, las hifas más viejas que ya degradaron parte de la celulosa del medio a sustratos más simples y no

producen una gran cantidad de enzimas celulolíticas. A una concentración de 3% de fuente de carbono, la secreción de enzimas celulolíticas es mayor que al 1%, posiblemente porque la cantidad de celulosa es mayor y se necesitan una mayor cantidad de enzimas que la degraden.

El perfil de secreción de enzimas celulolíticas no es el mismo empleando como fuente de carbono salvado de trigo no lavado (Figura 25). Cuando la concentración es de 1% la mayor secreción de enzimas se lleva a cabo en la zona 3, las hifas más jóvenes segregan una mayor cantidad de enzimas para degradar la celulosa, ya es prácticamente la única fuente de carbono. En las zona 1 y 2, las hifas que secretaron previamente enzimas celulolíticas y que ya degradaron parte de la de la celulosa del medio a sustratos más simples no producen una gran cantidad de estas enzimas porque tal vez ya no son tan utilizadas. A una concentración de 3% la mayor actividad celulolítica está presente en la zona 2.

En la Figura 25 se aprecia que el perfil de producción de enzimas celulolíticas en berenjena no es igual a las concentraciones estudiadas. A una concentración de 1% de berenjena es mayor en la zona 2 y cuando la fuente de carbono se encuentra al 3%, la mayor actividad celulolítica se localiza en la zona 3 donde las enzimas jóvenes secretan están enzimas al encontrarse con un sustrato nuevo. La concentración de la fuente de carbono quizá afecta la secreción de enzimas celulolíticas, obteniendo una mayor actividad a una concentración de 1% de berenjena.

El sustrato que favoreció más la producción de enzimas celulolíticas en el medio sólido empleando una membrana porosa de policarbonato, fue la berenjena a una concentración de 1%.

Diversos estudio se han realizado en hongos saprofiticos reportan que existe cierta correspondencia temporal entre la síntesis de polisacáridasas y los polisacáridos que el hongo encuentra en las distintas capas de la pared celular vegetal, entonces como el hongo es capaz de reconocer el sustrato, siendo esta una molécula tan grande y que no puede penetrar a la célula e inducir la

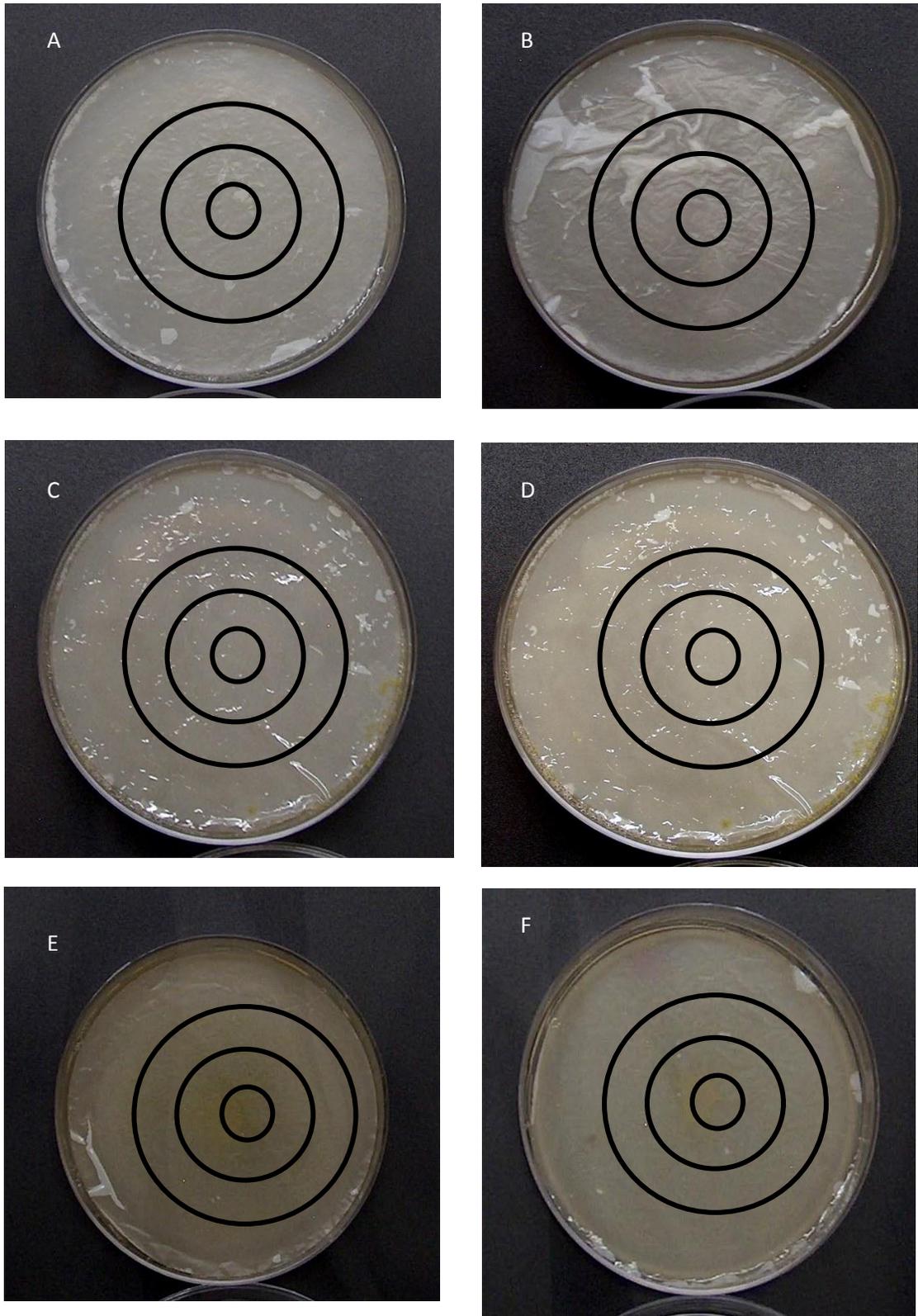
producción de enzimas que logren degradar al sustrato. Existe un sistema constitutivo de enzimas extracelulares degradadoras de la pared celular, así los productos de degradación, moléculas evidentemente más pequeñas, son capaces de atravesar la membrana celular del hongo e inducir una mayor producción de enzimas. (De Vries & Visser, 2001). Se ha encontrado que el nivel basal de concentración enzimática es no inducible, y que la mayor parte de las enzimas sintetizadas son enzimas inducibles.

El crecimiento del hongo está limitado por el agotamiento de los nutrientes o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo.

En éste sistema de estudio se puede considerar que las hifas de la periferia o zona 3, es decir, la zona más externa estudiada corresponde a las hifas más jóvenes del micelio y que son las que se encuentran en la fase de latencia. Estas hifas al encontrarse en un medio fresco sufren un cambio en su composición química antes de ser capaces de iniciar la multiplicación, presentan un marcado aumento de los componentes macromoleculares y de la actividad metabólica, casi sin división celular, las hifas jóvenes tienen una gran actividad metabólica y pueden producir una gran variedad de enzimas.

Las hifas de la zona 2 o zona media, se encuentran entre la fase de latencia y la fase exponencial. Y las hifas de la zona 1 que son las hifas más antiguas se encuentran en la fase estacionaria y posiblemente algunas en la fase de muerte donde hay un agotamiento de los nutrientes y la acumulación de productos tóxicos que pueden detener el crecimiento.

El crecimiento del hongo entre las dos membranas de policarbonato fue mayor y en un tiempo más corto que con una sola membrana. El diámetro de la colonia en todos los medios a los 2 días de incubación fue de aproximadamente de 8 cm y el micelio era de color crema. Figura 26



**Figura 26. Crecimiento de medio sólido con dos membranas de policarbonato, 3 días de incubación a 37°C. A) Salvado de trigo Lavado 1%, B) Salvado de trigo Lavado 3%, C) Salvado de trigo No Lavado 1%, D) Salvado de trigo No Lavado 3%, E) Berenjena 1%, F) Berenjena 3%.**

## Medio sólido (Micelio vegetativo)

El sistema para estudiar la diferenciación zonal sólo con el micelio vegetativo, es llamado “sándwich” y consistió en el uso de dos membranas porosas de policarbonato, el hongo se desarrollo entre estas dos membranas, las cuales permitieron el intercambio de gases, nutrientes y proteínas con el medio, y únicamente obtener micelio vegetativo. (Condición 2 de la sección de material y métodos)

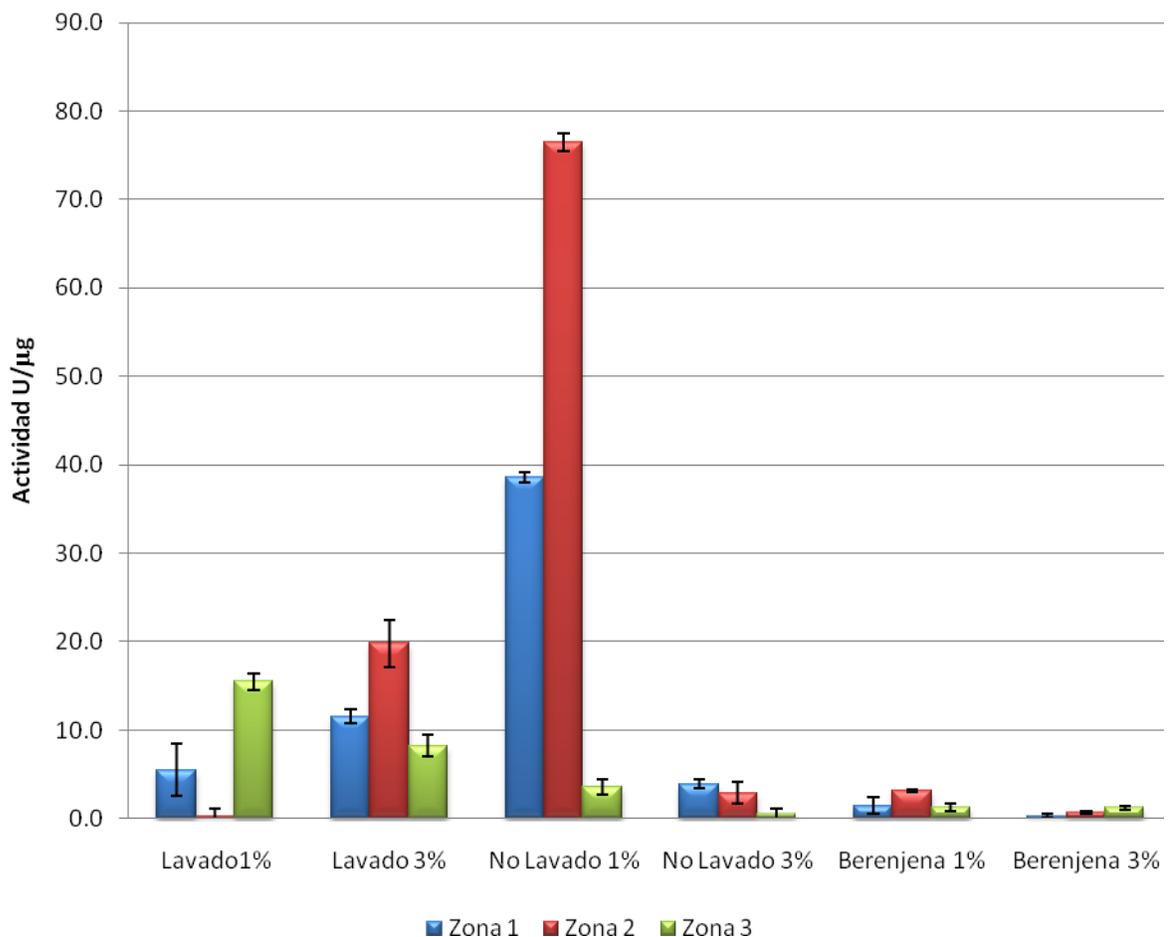


Figura 27. Actividad xilanólítica en medios sólidos, 2 días de incubación a 37°C, con dos membranas porosas de policarbonato. (n=8)

El perfil de secreción de enzimas xilanólíticas empleando salvado de trigo lavado no es el mismo cuando la concentración es de 1% y 3% (Figura 27). En el caso del salvado lavado 1%, la zona 3 es la que tiene una mayor producción de enzimas

xilanolíticas, las hifas más recientes que están reconociendo el sustrato son las que segregan una mayor cantidad de enzima para poder degradar el xilano presente y usarlo como fuente de carbono. La zona 2, es donde se encuentra la menor producción de enzimas xilanolíticas, las hifas más antiguas posiblemente ya no necesitan secretar una gran cantidad de enzima ya que el polisacárido presente ha sido parcialmente degradado y los monosacáridos, productos de esta degradación, son los utilizados por el hongo para su crecimiento. Cuando el salvado lavado se encuentra al 3%, la zona 2 es donde hay una mayor secreción de enzimas xilanolíticas.

En el salvado de trigo no lavado la concentración tal vez afectó la producción de enzimas xilanolíticas, ya que a una concentración de 3% la secreción de estas enzimas es baja en comparación con las segregadas al 1% (Figura 27). Cuando el salvado se encuentra al 1% la mayor producción de enzimas se encuentra en la zona 2, donde las hifas de mediana edad son las encargadas de esta secreción, posiblemente la cantidad de azúcares libres no es suficiente para su desarrollo y necesita degradar los polisacáridos presentes para su crecimiento. Las hifas más jóvenes que se encuentran en la zona 3, quizá no necesitan secretar una gran cantidad de enzimas, por que los sustratos simples son suficientes para su desarrollo.

En el caso del salvado de trigo no lavado al 3%, las zonas 1 y 2 tienen aproximadamente la misma secreción de enzimas xilanolíticas, que es más mayor que en la zona 3 (Figura 27). A una concentración del 3%, la cantidad de azúcares de fácil asimilación es mayor que al 1%, por lo que las enzimas xilanolíticas no son necesarias para el desarrollo del hongo.

Cuando la fuente de carbono es berenjena (Figura 27) y se encuentra en una concentración de 1%, la zona central es la que presenta una mayor secreción de enzimas xilanolíticas. En la zona 1, la degradación de los polisacáridos ya se llevó a cabo parcialmente y el hongo utiliza los sustratos simples para desarrollarse y posiblemente ya no es necesario que se produzca tanta cantidad de enzimas. En

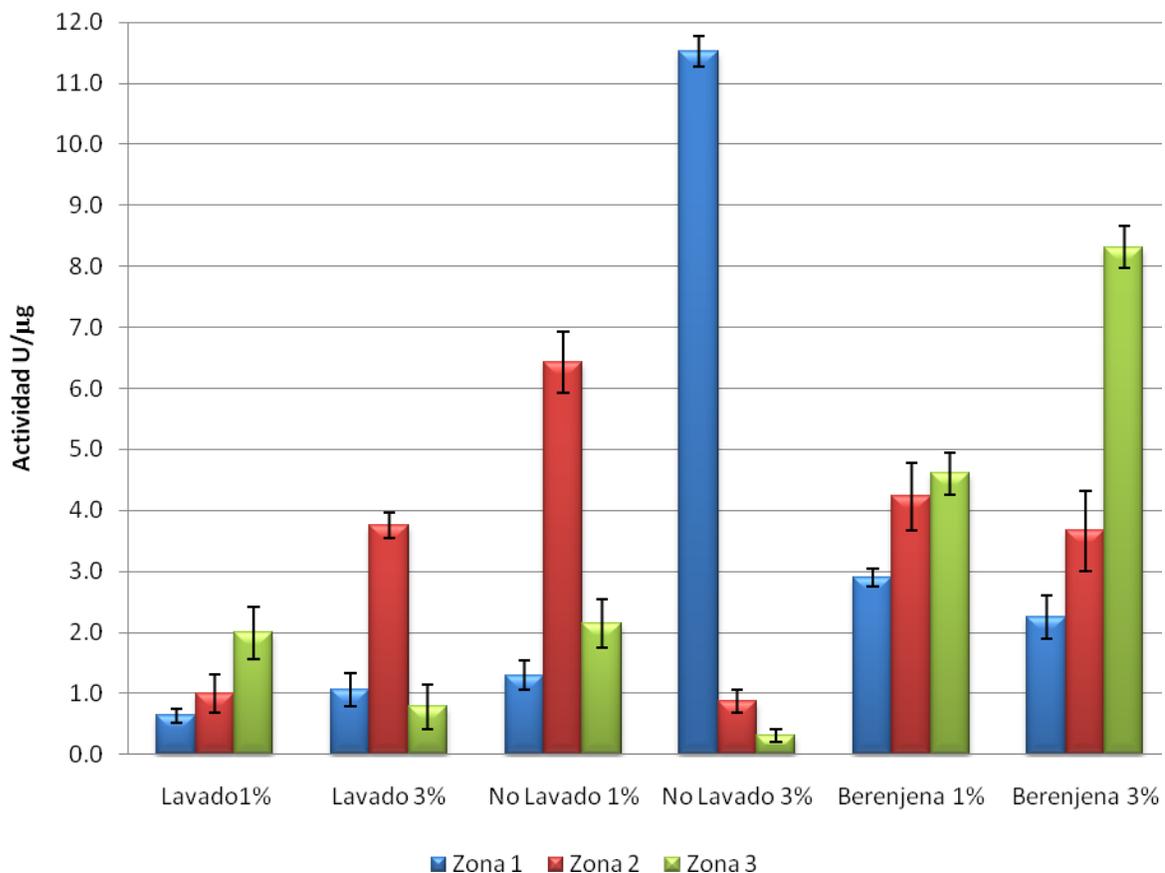
la zona 3 las hifas más jóvenes y que comienzan a reconocer los sustratos complejos, comienzan a secretar enzimas que degraden los polisacáridos para poder seguir creciendo.

A una concentración de 3% de berenjena la zona más externa es la que tiene una mayor producción de enzimas, en este caso la secreción de enzimas posiblemente se ve influenciada por la concentración de la fuente de carbono, a una concentración mayor la producción enzimática es menor. Al haber una mayor concentración de sustratos simples, las enzimas xilanolíticas no son tan necesarias para el crecimiento del hongo. Figura 27

El sustrato que favoreció la mayor producción de enzimas xilanolíticas en las condiciones de trabajo fue el salvado de trigo no lavado al 3%.

En el salvado de trigo lavado al 1% la mayor secreción de enzimas pectinolíticas se encuentra en la zona más externa (Figura 27). Para el tiempo en el que se llevó a cabo la determinación los polisacáridos de las zonas 1 y 2 quizá ya fueron degradados y los productos de esta degradación son los empleados por el hongo para su crecimiento, por lo que las enzimas pectinolíticas no son producidas en una gran cantidad, siendo la zona 3 donde las hifas son más jóvenes donde hay una mayor secreción de estas.

En salvado trigo lavado al 3% la máxima producción de enzimas pectinolíticas se localiza en la zona media (Figura 27). Las hifas de mediana edad son las que secretan una mayor cantidad de enzimas para degradar los sustratos complejos del medio, las hifas recientes de la zona 3 comienzan a reconocer el sustrato y no secretan grandes cantidades de enzimas pectinolíticas ya que comienzan su desarrollo.

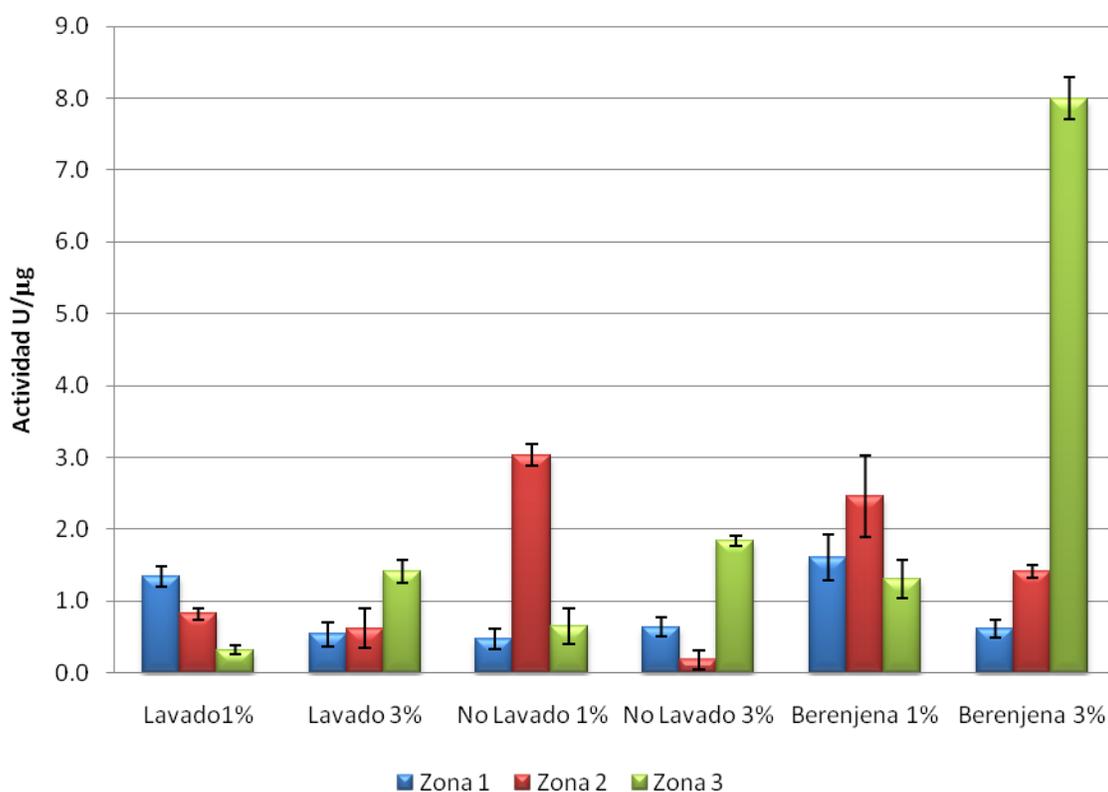


**Figura 28. Actividad pectinolítica en medios sólidos, 2 días de incubación a 37°C, con dos membranas porosas de policarbonato. (n=8)**

En el salvado no lavado al 1% la secreción de enzimas pectinolíticas (Figura 28) es menor en la zona 1 donde las hifas más viejas de la colonia ya secretaron enzimas que degradaron los polisacáridos y usan los productos de esta degradación como fuente de carbono. En la zona 2 donde se presenta una mayor producción de enzimas es donde se encuentran hifas que se están desarrollando y para eso necesitan degradar los sustratos complejos del medio. Las hifas nuevas de la zona 3 secretan enzimas pectinolíticas para poder desarrollarse pero en una menor cantidad que en la zona anterior, ya que comienzan a reconocer el sustrato donde se encuentra. En el salvado no lavado al 3% la zona 1 es la que presenta una mayor secreción de enzimas pectinolíticas.

Cuando la fuente de carbono es berenjena se observa el mismo perfil de secreción de enzimas pectinolíticas (Figura 28), donde la mayor cantidad es producida en la zona 3, donde las hifas recientes son las que segregan más enzimas para seguir desarrollándose, y en cuanto a las hifas de las zonas 1 y 2 que ya son más antiguas posiblemente no necesitan secretar tantas enzimas pectinolíticas para su desarrollo porque ya degradaron gran cantidad del sustrato complejo donde se encuentran en monosacáridos de más fácil asimilación.

La concentración de la fuente de carbono probablemente afecta la secreción de enzimas pectinolíticas, obteniendo una mayor actividad a una concentración de 3%. El sustrato en el cual la producción de enzimas pectinolíticas fue mayor es el salvado de trigo no lavado 3%.



**Figura 29. Actividad celulolítica en medios sólidos, 2 días de incubación a 37°C, con dos membranas porosas de policarbonato**

Con salvado lavado 1% la zona que presenta más secreción de enzimas celulolíticas es la central (Figura 29) por las hifas con más tiempo de desarrollo, cuando se encuentra al 3% de concentración la máxima actividad se encuentra en la zona 3 donde las hifas más jóvenes llevan a cabo la secreción de esta enzima.

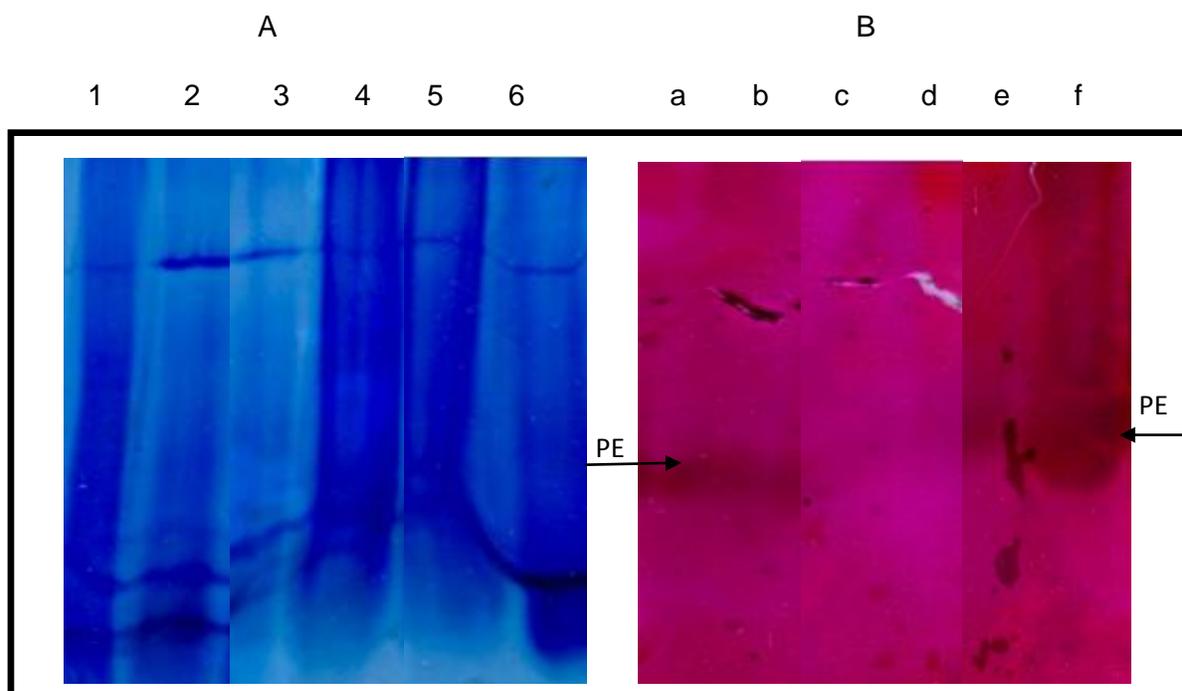
A una concentración de 1% de salvado de trigo no lavado la máxima producción de enzimas celulolíticas se encuentra en la zona 2 y cuando se encuentra al 3% es la zona periférica (Figura 29).

En este sistema de estudio debido a que el micelio crece demasiado rápido las hifas pueden estar en la fase de latencia y unas pocas en la fase exponencial. Y las enzimas que se producen se ven más influenciadas por la esporulación del hongo que por la edad de las hifas.

## Análisis de geles SDS-PAGE

Los geles de electroforesis se realizaron para observar si existía diferencia entre las enzimas producidas en las condiciones estudiadas, medio líquido, medio sólido y sobre un material vegetal biológicamente activo.

A continuación se muestran los geles de electroforesis algunas de las condiciones estudiadas, así como los zimogramas de actividad pectinolítica correspondientes de la electroforesis. Los zimogramas de actividad xilanólica no se presentan debido a que no mostraron ningún resultado.

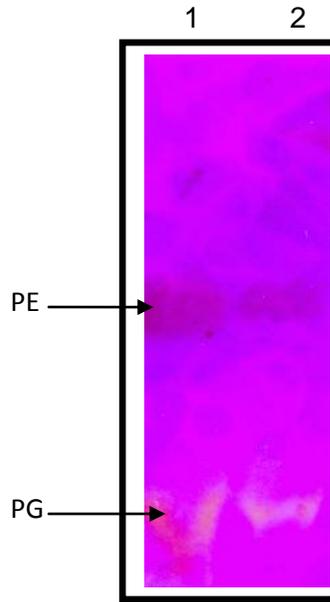


**Figura 30. A) Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, B) Zimograma proveniente de medio líquido Salvado No Lavado 3% Agitado 3 días de incubación (1 y a), Salvado No Lavado 3% Estático, 3 días de incubación (2 y b), Salvado Lavado 3% Agitado, 4 días de incubación (3 y c), Salvado Lavado 3% Estático, 4 días de incubación (4 y d), Berenjena 3% Estático, 5 días de incubación (5 y e), Berenjena 3% Agitado, 5 días de incubación (6 y f). En todos los casos se cargaron 150 µg por pozo. PE =Pectin esterasa**

En la Figura 30 A se muestra el perfil de proteínas de diferentes condiciones del medio líquido. En el carril 1 y 2, se observa el medio líquido del salvado de trigo no lavado 3% con 3 días de incubación, en lo cuáles se obtuvo un máximo de

actividad xilanolítica y pectinolítica, en el medio agitado y estático se observan dos bandas a la misma altura, pero las del medio estático son más intensas que las del medio agitado. En los siguientes carriles (3 y 4) se muestra el perfil del medio líquido del salvado lavado 3% con 4 días de incubación (Figura 30 A), en donde se observan en los dos carriles dos bandas de la misma intensidad una en parte superior y otra en la inferior del gel, la banda superior se encuentra a la misma altura en las dos condiciones, agitado y estático, pero la banda inferior perteneciente a la condición de agitación constante se encuentra ligeramente por debajo de la banda del medio estático. En los últimos carriles del perfil de proteína (5 y 6) se muestran los medios líquidos de berenjena 3% a los 5 días de incubación (Figura 30 A), en donde se aprecia una banda de la misma intensidad en las dos condiciones estudiadas (agitado y estático), la banda perteneciente al medio agitado se encuentra por debajo de la banda del medio estático.

En la Figura 30 B se muestra el zimograma del medio líquido en diferentes condiciones de incubación. En los primeros carriles, 1 y 2, se observa una banda a la misma altura y de la misma intensidad tanto en estático y en agitación, localizada en la parte inferior del gel y que posiblemente pertenezca a una PE producida por el hongo. En los carriles 3 y 4 no se aprecia ninguna banda en las condiciones estudiadas (cultivo estático y agitado). En los últimos carriles del zimograma (5 y 6) se observa una banda en el medio agitado y estático que posiblemente corresponda a una pectin esterasa, PE, estas bandas se localizan a la misma altura del gel, en la parte inferior de este, y de diferente intensidad, donde la banda del medio agitado es mucho más ancha que la del medio estático.



**Figura 31. Zimograma proveniente de medio líquido agitado de Salvado Lavado 3% y 7 días de incubación, 1: Medio estático (150  $\mu$ g), 2: Medio agitado (150  $\mu$ g). PE= Pectin esterasa, PG= Pectin galacturonasa.**

En el zimograma de actividad pectinolítica del medio líquido agitado del salvado lavado 3% (Figura 31) se observa que en condiciones de agitación hay una banda en la parte superior del gel que posiblemente corresponde a una pectin esterasa, PE, en esta misma condición también se aprecia una banda de una hidrólisis parcial de la pectina del medio. En el medio estático hay una banda en la parte superior a la misma altura que en el medio agitación y que también puede corresponder a una PE secretada por el hongo, sólo que la banda del medio agitado es más intensa que la del medio estático. En la parte inferior del medio estático se observa una banda que corresponde a una hidrólisis de la pectina. No se muestra el gel de proteína ya que ninguna banda se puede apreciar.

Comparando los zimogramas de las Figuras 30 y 31, podemos observar que las enzimas producidas en medio con salvado de trigo lavado 3% y salvado de trigo no lavado 3% son diferentes. Así que la fuente de carbono tuvo efecto en la producción de enzimas pectinolíticas en medio líquido

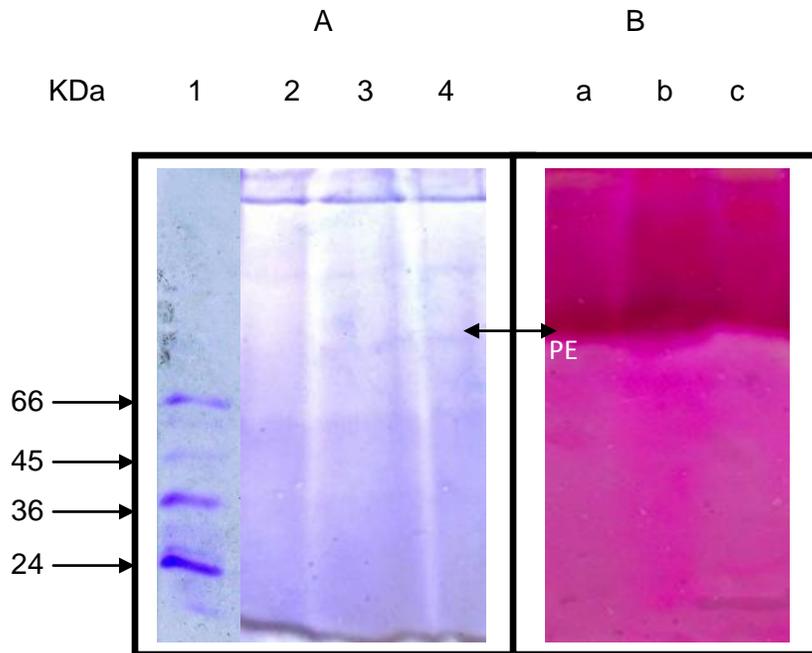
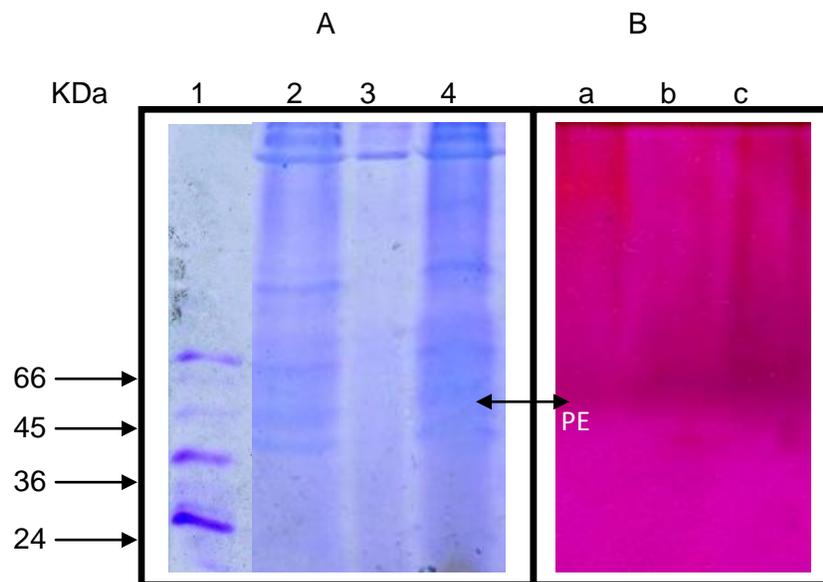


Figura 32. A) Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, B) Zimograma provenientes de rodajas de berenjena, sin inocular con 9 días de incubación. Marcadores de peso molecular (1), Zona 1 Berenjena (2 y a), Zona 2 Berenjena (3 y b), Zona 3 Berenjena (4 y c). En todos los casos se cargaron 150  $\mu\text{g}$  por pozo. PE= Pectin esterasa

En la Figura 32 A se observa el perfil de proteínas de las rodajas de berenjena no inoculadas e incubadas por 9 días que fue realizado como control para distinguir lo que tiene la berenjena y lo que produce el hongo, en los carriles 2, 3 y 4 se aprecian bandas muy finas a la misma altura y a lo largo de todo el gel. En el zimograma, Figura 32 B, se aprecia una banda en los tres carriles (a,b,c) a la misma altura y con la misma intensidad, por arriba del marcador 66 KDa, y que corresponde con una ligera banda en el perfil de proteína, esta banda posiblemente corresponda a una pectin esterasa de la berenjena.



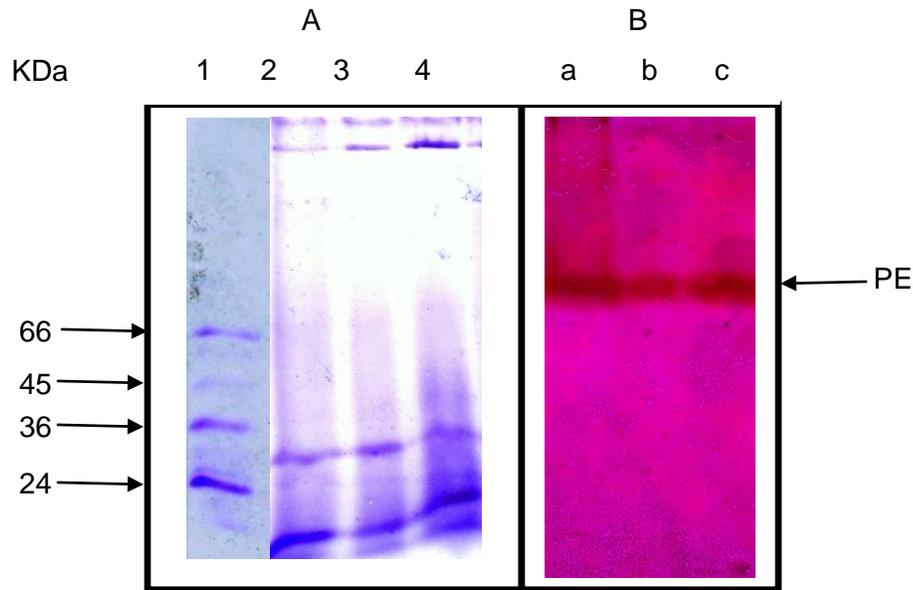
**Figura 33. A) Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, B) Zimograma proveniente de rodajas de berenjena inoculada e incubada 9 días. Marcadores de peso molecular (1), Zona 1 Berenjena (2 y a), Zona 2 Berenjena (3 y b), Zona 3 Berenjena (4 y c). En todos los casos se cargaron 150  $\mu$ g por pozo.**

En el perfil de proteínas de las rodajas de berenjena, Figura 33 A, se observa en los carriles 2 y 4) bandas muy finas a la misma altura y a lo largo de todo el gel por arriba de los 36 KDa, en el carril 3 solo se observan 2 bandas por arriba de los 66 KDa. En la figura 33 B se presenta el zimograma de las rodajas en donde se aprecia una banda presente en los carriles a, b y c, a la misma altura y con aproximadamente la misma intensidad, a la altura de 45 KDa, y que corresponde con una ligera banda en el perfil de proteína en los carriles 2 y 4, esta banda quizá corresponda a una pectin esterasa producida por el hongo que se desarrollo sobre la rodaja de berenjena.

Los perfiles enzimáticos de las rodajas de berenjena varían de acuerdo al tiempo de incubación; las rodajas sin inocular presentan un perfil enzimático (Figura 32 A) propio debido a la actividad metabólica que tiene el material vegetal vivo. El perfil

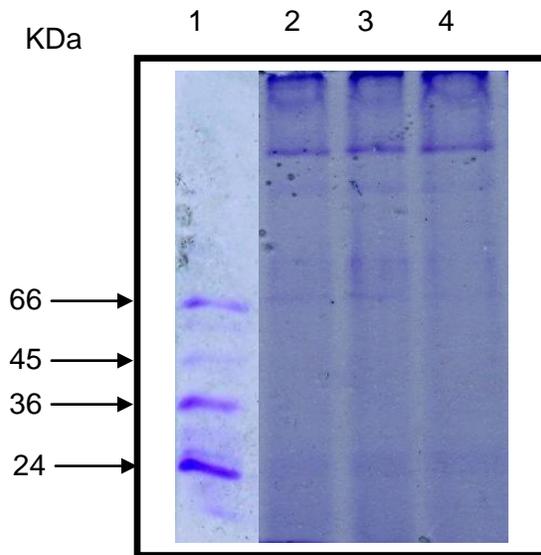
de las rodajas inoculadas (Figura 33 A) es diferente al de las rodajas no inoculadas, debido al crecimiento del hongo en este sustrato. Al observar el perfil de proteínas a diferentes días de incubación con desarrollo del hongo, se aprecia que estos perfiles son diferentes, a los 9 días de incubación (Figura 33 A) hay muchas bandas finas en el gel, pero a los 12 días de incubación solo hay una banda en el gel, por lo que posiblemente a este tiempo de incubación tan prolongado hay una degradación de las proteínas producidas por el hongo o a dejado de secretarlas.

En el zimograma de las rodajas no inoculadas (Figura 32 B) se observan unas bandas de lo que posiblemente es una PE propia de la berenjena en la parte superior del gel, a los 9 días de incubación la PE se encuentra por debajo de la mitad del gel (Figura 33 B) y es una enzima producida por el hongo. A los 12 días de incubación la PE también se encuentra por debajo de la mitad del gel.



**Figura 34. A) Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE, B) Zimograma** provenientes de medio sólido con Salvado de trigo No Lavado 3%, incubado 5 días con una membrana porosa de policarbonato. Marcadores de peso molecular (1), Zona 1 Salvado No Lavado 3% (2 y b), Zona 2 Salvado No Lavado 3% (3 y b), Zona 3 salvado No Lavado 3% (4 y c), en todos los casos se cargaron 150 µg por pozo.

Se puede ver que el perfil de proteína es muy parecido en las 3 zonas analizadas (Figura 34 A), se aprecian tres bandas por debajo de 36 KDa a la misma altura y con aproximadamente la misma intensidad, y una banda en la parte superior del gel por arriba de los 66 KDa. En la Figura 34B se muestra el zimograma donde se aprecia una banda en los carriles a,b y c, a la misma altura y con la misma intensidad, por arriba del marcador 66 KDa. Esta banda que no se aprecia con claridad en el gel de proteína, posiblemente corresponda a una pectin esterasa (PE) (E.C. 3.1.1.11), que es una enzima que desmetoxila las cadenas pécticas a ácidos pécticos, es una enzima específica que solo hidroliza los grupos carboxilo esterificados en la pectina.



**Figura 35. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE provenientes de medio sólido con Berenjena 3%, incubado con una membrana porosa de policarbonato. 1: Marcadores de peso molecular, 2: Zona 1 Berenjena 3% (150 µg), 3: Zona 2 Berenjena 3% (150 µg), 4: Zona 3 Berenjena 3% (150 µg)**

En los carriles 2,3 y 4 de la Figura 35 se aprecian bandas localizadas a la misma altura y con aproximadamente la misma intensidad, a lo largo de todo el gel. En este caso el perfil de proteína es muy parecido en las tres zonas de crecimiento y hay un mayor número de bandas de proteína que en el caso del salvado de trigo no lavado (Figura 34). Con salvado de trigo no lavado 3% las bandas son de bajo peso molecular encontrándose la mayoría por debajo de 66 KDa y en el caso del medio sólido con Berenjena 3% las bandas son de alto peso por arriba de 66 KDa. En este caso no se presenta el zimograma de actividad pectinolítica ya que no se observa ningún resultado.

No se presentan los geles de proteína ni los zimogramas de actividad pectinolítica de los medios sólidos con dos membranas ya que ninguno presenta actividad enzimática, ni se observan bandas de proteínas.

## **IX. Conclusiones**

Se logró desarrollar un sistema de crecimiento en placa utilizando membranas de policarbonato, que permitió la evaluación del crecimiento, el consumo de sustrato y la producción de enzimas. Este sistema también es muy útil cuando se manejan sustratos complejos como los empleados en el presente trabajo. Además de que se puede evaluar el efecto de la morfología sobre diversas funciones celulares (producción de enzimas, consumo de sustrato, etc), utilizando una o dos membranas.

La producción de enzimas se evaluó en medio líquido y sólido, encontramos se producen xilanasas, pectinasas y celulasas. Los niveles en que se producen varían de acuerdo al sistema de cultivo utilizado. En medio líquido estático se produjeron los niveles más altos de enzimas, seguido por el cultivo en placa con una membrana de policarbonato, después el cultivo líquido agitado y por último el cultivo en placa con micelio vegetativo (sándwich).

En medio líquido el primer sistema enzimático detectado fue el de celulasas seguido por xilanasas y pectinasas.

En medio sólido con una membrana de policarbonato (micelio esporulado) la expresión de los sistemas enzimáticos varió dependiendo el sustrato en el que se desarrollo. En el caso del salvado de trigo no lavado la mayor producción de pectinasas se encuentra en la zona periférica de la colonia (zona 3) donde se encuentran las hifas más jóvenes y la mayor secreción de celulasas se encuentra en la zona central o zona 2 y el máximo nivel de xilanasas se localiza en la zona central (zona 1) que es donde están las hifas más viejas de la colonia. Con salvado de trigo lavado las celulasas y pectinasas tienen su máxima secreción en la zona más externa de colonia, zona 3, que es donde están las hifas más jóvenes, y las xilanasas se producen en un nivel mayor en la zona media (zona 2). Empleando como sustrato berenjena la zona 3 o periférica presenta una mayor

secreción de pectinasas, la zona media de celulasas y la zona 1 o central de xilanasas.

En medio sólido con dos membranas de policarbonato, los niveles de producción de enzimas también variaron dependiendo el sustrato empleado y la concentración de la fuente de carbono. Hubo una mayor producción enzimática en medio sólido permitiendo la esporulación del hongo que en medio sólido sin esporulación (técnica sándwich).

Ya que *Aspergillus flavus* es uno de los hongos más abundantes y con mayor distribución, capaz de desarrollarse en muchos sustratos como plantas, árboles, insectos, animales y muchos tipos de granos, la berenjena fue empleada como modelo biológico activo para estudiar la degradación del material vegetal por el hongo como ocurriría normalmente en la naturaleza. Se evaluó la producción de enzimas en este material vegetal activo y se encontró que la mayor producción de pectinasas se localiza en la zona media (zona 2), y la máxima secreción de xilanasas en la zona periférica, ambos sistemas enzimáticos a un tiempo prolongado de incubación. En este caso fue muy evidente que la degradación del material vegetal (rodajas de berenjena) es debida a la presencia de las enzimas producidas por *A. flavus*.

Con los geles de proteína y zimogramas de actividad pectinolítica se observó que las enzimas producidas son diferentes, dependiendo de la condición estudiada, variando de medio líquido a medio sólido y en un material biológicamente activo. Además de que son diferentes en las diferentes fuentes de carbono estudiadas.

## X. Bibliografía

Ahlawat, S., Battan, B., Sudha Dhiman, S., Sharma, J., & Mandhan, R. P. (2007). Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. *Journal Industrial Microbiol Biotechnol* , 763-770.

Azuma, K., Ohyama, A., Ippoushi, K., Ichianagi, T., Takeuchi, A., Saito, T., y otros. (2008). Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *Journal of agricultural and Food Chemistry* , 10154-10159.

Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. (2001). Microbial xylanases and their industrial application: a review. *Applical Microbiol Biotechnol* , 326-338.

Betini, J., Mchelin, M., Peixoto-Nogueira, S., Jorge, J., Terenzi, H., & Polizeli, M. (2009). Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* reduced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng* .

Bonifaz A. *Micología médica básica*. 3ªed. McGraw Hill. México DF 2009.

Bonnin, E., Clavurier, K., Daniel, S., Kauppinen, S., Mikkelsen, J., & Thibault, J. (2008). Pectin acetyltransferases from *Aspergillus* are able to deacetylate homogalacturonano as well as rhamnogalacturonano. *Carbohydrate polymers* , 411-418.

Chen, N., & Li, H. Cultivation and breeding of eggplant. En *Asian Vegetable Research and Development Center*.

Collonnier, C., Fock, I., Kashyap, V., Tonino, G., Daunay, M., Lian, Y., y otros. (2001). Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* , 91-107.

Concellón, A., Añón, M. C., & Chaves, R. (2004). Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. *Food Chemistry* , 17-24.

Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Molecular Cellular Biology* , 850-861.

de Carvalho Peixo-Nogueira, S., Michelin, M., Almeida Betini, J., Atílo, J., Terenzi, H., & Teixeira de Moraes Polizeli, M. d. (2008). Production of xylanase by *Aspergillus* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. *Journal Industry Microbiol Biotechnol* , 149-155.

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

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

Domingues, F., Queiroz, J., Cabral, J., & Fonseca, L. (2000). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C.30. *Enzyme and Technology Technology* , 394-401.

Enari, T.-M. (1989). Microbial Cellulases. En W. M. Fogarty, *Microbial enzymes and biotechnology* (págs. 183-221). U.S.A: Applied Science Publishers.

Flick, G. J., Burnette, F. S., Aung, L. H., Ory, R. L., & St. Angelo, A. J. (1976). Chemical composition and biochemical properties of mirlitons (*Sechium edule*) and purple, green, and white eggplant (*Solanum melongena*). *Journal of agricultural and Food Chemistry* , 1000-1004.

Flick, G., Ory, R., & Angelo, A. (1997). Comparison of nutrient composition and of enzyme activity in purple, green, and white eggplant. *Journal of agricultural and Food Chemistry* , 117-120.

Frery, A., Doganlar, S., & Daunay, M. (2007). Eggplant. En *Genome mapping and molecular breeding in plants* (págs. 287-313). Berlin: C. Kole.

Graminha, E., Gonzalez, A., Pirota, R., Balsalobre, M., Da Silva, R., & Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal feed science and technology* , 1-22.

Guimaraes, P., Galvao, A., Batista, C., Azevedo, G., Oliveira, R., Lamounier, R., y otros. (2000). Eggplant (*Solanum melongena*) infusion has a modest and transitory effect on hypercholesterolemic subjects. *Brazilian Journal of medical and biological research* , 1027-1036.

<http://www.ehso.com/ehshome/aflatoxin.php>. (s.f.).

Ichianagi, T., Kashwada, Y., Shida, Y., Ikeshiro, Y., Kaneyuki, T., & Konishi, T. (2005). Nasunin from eggplant consist of cis-trans isomers of delphinidin 3-(4-(p-coumaroyl)-L-rhamnosyl(1-6)glucopyranoside)-5-glucopyranoside. *Journal of agricultural and Food Chemistry* , 9472-9477.

Kee-Hong, K., Brown, K., Harris, P. V., Langston, J. A., & Cherry, J. R. (2007). A proteomics strategy to discover b-glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two-dimensional page in-gel activity assay and tandem mass spectrometry. *Journal of proteome research* , 4749-4757.

Khandeparker, R., & Numan, M. T. (2008). Bifuncional xylanases and their potential use in biotechnology. *J Ind. Microbiol Biotechnol* , 635-644.

Lerouxel, O., Cavalier, D. M., Liepman, A. H., & Keegstra, K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides-a complex process. *Current Opinion in plant biology* , 621-630.

Levin Chucrel, A. M. (2007). *Differentiation in colonies of Aspergillus niger*. Buenos Aires: TED Gigaprint.

Mellon, J. E., Cotty, P. J., & Dowd, M. K. (2007). *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1201-1208.

Minic, Z., & Jouanin, I. (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant physiology an biochemistry* , 435-449.

Oliveira, L. A., Porto, A. L., & Tambourgi, E. B. (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural waste. *Bioresource technology* , 862-867.

Ovando-Chacón, S., & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia* , 111-120.

Paz-Lago, D., & Hernández, M. (2000). Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasa a partir del preparado comercial NOVOBAN 240. *Cultivos tropicales* , 27-31.

Pérez-Gilabert, M., & García Carmona, F. (2000). Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chemistry* , 695-700.

Ratanachomsri, U., Sriprang, R., Sornleck, W., Buaban, B., Champreda, V., Tanapongpipat, S., y otros. (2006). Thermostable xylanase from *Marasmius* sp.: Purification and characterization. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* , 105-110.

Robles Ruíz, J. F. (2000). Obtención de zumo de berenjena (*Solanum melangena*) mediante el uso de la enzima poligalacturonasa. *TZHOECOEN* , 161-168.

Rodriguez, S., López, B., & Chaves, A. (1999). Changes in polyamines and ethylene during the development and ripening of eggplant fruits (*Solanum melongena*). *Journal of agricultural and Food Chemistry* , 1431-1434.

Sandrim, V., Rizzatti, A., & Terenzi, H. (2004). Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochemistry* , 1823-1828.

Sangeta, Y., Pramod Kumar, Y., Dinesh, Y., & Kapil Deo Singh, Y. (2008). Pectin Lyase: A review. *Process Biochemistry* , 1-10.

Shallom, D., & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Ecology and industrial microbiology* , 219-228.

Singh, P., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G., y otros. (2008). Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry* , 955-961.

Smith, J. (1994). *Aspergillus*. USA: Plenum Fresh.

Solis, S., Loeza, J., Segura, G., Tello, J., Reyes, N., Lappe, P., y otros. (2008). Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase-overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niger* CH-Y-1043. *Enzyme and Microbial Technology* , 123-128.

Subramaniyan, & Prema. (2002). Biotechnology of microbial xylanases:enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews biotechnology* , 33-64.

Subramaniyan, S., & Prema, P. (1999). Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiology letters* , 1-7.

Todaro, Cimino, F., Rapisarda, P., Catalano, A., Barbagallo, R., & Spagna, G. (2008). Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry* , 434-439.

Van Eck, J., & Snyder, A. (2004). Eggplant (*Solanum melongena* L.). En *Methods in Molecular Biology* (págs. 439-447). Tolowa, NJ: Humana Press.

Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Revista peruana de biología* , 78-87.

Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in plant science* , 203-209.

Weenink, X. O., Punt, P. J., van den Hondel, C., & Ram, A. F. (2005). A new method for screening and isolation of hypersecretion mutants in *Aspergillus niger*. *Applied microbial and cell physiology* , 5-13.

Whitaker, B. D., & Stommel, J. R. (2003). Distribution of hydroxycinnamic acid conjugates in fruit of commercial eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars. *Journal of agricultural and Food Chemistry* , 3448-3454.

Zhang, Y. P., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* , 452-481.

<http://www.ehso.com/ehshome/aflatoxin.php>

<http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/imagenes/matriz-celulosa.png>

[www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-2pared1.htm](http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-2pared1.htm)