



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis comparativo de las enzimas producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* creciendo en desechos agroindustriales como fuentes complejas de carbono.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE ROMO RÍOS

MÉXICO, D.F.

AÑO 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE Tsuzuki Reyes María Guadalupe
VOCAL Camacho Cruz Alejandro
SECRETARIO Aguilar Osorio José Guillermo De Jesús
1° SUPLENTE Giles Gómez Martha
2° SUPLENTE Ruíz Villafan Beatriz

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

SUSTENTANTE:

María Guadalupe Romo Ríos

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM Proyecto; “Secretoma de *Aspergillus flavus*: enzimas que participan en la degradación y utilización de sustratos complejos”,
Clave: IN225710.

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Agradecimientos

Primero que nada, le quiero agradecer al doctor Guillermo Aguilar Osorio, por permitirme la maravillosa oportunidad de trabajar en su equipo. Gracias a usted, tuve grandes experiencias y conocí gente extraordinaria, incluyéndolo a usted, es un gran hombre y un gran investigador.

Quiero agradecer a mis padres, por su eterno apoyo y amor. Papá siempre fuiste la voz que me animo y me dio esperanza en mí misma, además de inspirarme para mejorar cada día. Mamá tengo que aclarar que siempre fuiste y serás mi más grande apoyo. Nunca voy a terminar de agradecer todo lo que ustedes dos han hecho por mí. Los amo con todo mi corazón.

Mis hermanos, Adrián y Sergio, quiero que sepan que todo lo que he hecho es por que quiero ser un buen ejemplo para ustedes. Siempre quiero que cuenten conmigo, así como yo sé que contaré con ustedes toda mi vida. Nunca dejen que les digan que no pueden hacer algo. Los dos son hombres maravillosos y lograrán mucho en su vida. Los amo.

A mi novio, Sam, no se como puedo agradecerte todo lo que has hecho por mi. Sabes que siempre contarás conmigo, estemos juntos o no, siempre serás una de las personas más importantes de mi vida. Sabes que te amo y le agradezco al destino por ponerte en mi camino. Siempre te amaré, por ser mi mejor amigo, mi confidente y mi primer amor.

† A mis dos abuelitas, gracias por las hermosas memorias, nunca las olvidaré. Gracias por criar a mis padres, por que ahora han pasado sus enseñanzas a mí y forjaron lo que soy.

A mis tíos, Javier Romo y Jaime Romo, gracias por ser como mis segundos padres. Eli, Javier, Andrea, Fátima, Braulio, Adir y Teresa, quiero que sepan que también son como mis hermanos que los amo mucho y también contarán conmigo siempre. A mis demás tíos y primos (tanto paternos, como maternos). Gracias por creer en mí y por su apoyo absoluta.

A mi otra familia, mis amigos, Has, Aurora, Mariana Berroeta, Diana, López, Mariana Bolivar, Sharon, Bubu, Stefy, David, Mariana Miranda, Pablito, Erick y a los que ya no veo tanto, Ricardo, Gustavo, Giorgio, Fernando (Zague), Mota y demás que han estado en mi vida. Gracias por que han ayudado a formar la persona que soy y por los momentos inolvidables que compartimos y compartiremos juntos.

Y por ultimo, pero no menos importante, a mis compañeras y amigas en la travesía María, Karliux, Karla, Mariana y especialmente a Brenda por la paciencia y apoyo que me mostró al incorporarme en esta gran familia de fans de los hongos.

Gracias a todos ustedes por compartir este hermoso, maravilloso e inolvidable momento conmigo.

María Guadalupe Romo Ríos

Contenido

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	3
2.1 Los hongos	3
2.2 El género <i>Aspergillus</i>	4
2.3 <i>Aspergillus flavus</i>	6
2.4 <i>Aspergillus niger</i>	8
2.5 Polisacáridos de la pared celular de plantas	9
2.5.1 Pectinas	11
2.5.2 Xilanos	13
2.6 Enzimas secretadas por hongos para la degradación de polisacáridos	14
2.6.1 Pectinasas	15
2.6.2 Xilanasas	18
2.7 La Agroindustria y sus desechos	19
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	21
3.1 Objetivo General	21
3.2 Objetivos Particulares.....	21
3.3 Hipótesis	21
3.4 Planteamiento del Problema.....	22
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y METODOLOGÍAS.....	23
4.1 Microorganismos.....	23
4.2 Siembra masiva de hongos filamentosos	23
4.3 Cosecha de esporas	23
4.4 Conteo de esporas.....	23
4.5 Producción de enzimas en medio líquido (fermentación por lote).....	24
4.6 Obtención de filtrados enzimáticos crudos de los medios.....	24
4.7 Determinación de actividad exopectinolítica	24
4.8 Determinación de actividad Xilanólítica	25
4.9 Concentración de los filtrados enzimáticos por medio de liofilización.....	25
4.10 Obtención de geles de SDS-PAGE.....	25
4.11 Zimogramas	26

4.12 Concentración de los filtrados enzimáticos por medio de ultrafiltración	26
4.13 Determinación de cinética de degradación de sustrato de los concentrados enzimáticos	26
4.14 Determinación de la liberación de pectina de la cáscara de limón por acción enzimática.....	27
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1 Efecto del pH en la producción enzimática en fermentación por lote con diferentes fuentes complejas de carbono.....	29
5.2 Efecto del tipo de fuente compleja o simple de carbono en la producción enzimática en fermentación por lote.....	32
5.2.1 Resultados obtenidos con <i>A. flavus</i> CECT-2687	33
5.2.2 Resultados obtenidos con <i>A. niger</i> N-402	36
5.3 Efecto del tipo de cáscara de limón y de su tratamiento en la producción enzimática en fermentación por lote.....	39
5.4 Producción en masa de enzimas por fermentación por lote	42
5.5 Análisis de los perfiles electroforéticos.....	44
5.6 Caracterización de los concentrados enzimáticos de ambas cepas.....	45
5.6.1. Efecto de la Actividad Exopectinolítica de acuerdo al grado de esterificación del sustrato.....	46
5.6.2 Efecto en la Actividad Xilanolítica de acuerdo al origen del sustrato	48
5.7 Cinética de degradación de sustratos por medio de los concentrados enzimáticos	49
5.7.1 Cinética de degradación de Pectina	53
5.7.2 Cinética de degradación de Xilano	60
5.8 Liberación de pectina por efecto de tratamiento enzimático.....	63
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	65
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	67

ABREVIATURAS USADAS:

<i>A. flavus</i> CECT-2687	<i>Aspergillus flavus</i> CECT-2687
<i>A. niger</i> N-402	<i>Aspergillus niger</i> N-402
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
g	Gramos
h	Horas
KDa	Kilodaltons
m	Metros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
T	Temperatura
U	Unidades enzimáticas
mV	Milivolts
µg	Microgramos
µL	Microlitros
ppb	Partes por billón
OMN	Concentrado enzimático de la cepa <i>Aspergillus niger</i> N-402 crecido en olote de maíz
CLN	Concentrado enzimático de la cepa <i>Aspergillus niger</i> N-402 crecido en cáscara de limón
OMF	Concentrado enzimático de la cepa <i>Aspergillus flavus</i> CECT-2687 crecido en olote de maíz
CLF	Concentrado enzimático de la cepa <i>Aspergillus flavus</i> CECT-2687 crecido en cáscara de limón

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* uno de los más fascinantes grupos de hongos debido a su inmensa diversidad biológica, además de que los mohos de este género están íntimamente relacionados con la industria alimentaria, claros ejemplos son *A. oryzae* que es utilizado en la realización del sake y *A. niger* que se utiliza tanto para la producción de ácido cítrico como en la producción de enzimas con aplicaciones en procesos unitarios durante la producción de alimentos. Del mismo modo, son de vital importancia para la industria farmacéutica, ya que se utilizan en la producción de antibióticos.

Se sabe que *A. niger* es un hongo ascomiceto filamentoso y saprófito lo que lo hace capaz de desarrollarse en materia orgánica en descomposición y que además para hacerlo cuenta con una amplia gama de enzimas degradadoras de polisacáridos. Este microorganismo ha sido reconocido por la FDA (Food and Drug Administration) como microorganismo GRAS (Generally Recognized As Safe), es económicamente importante en la industria alimentaria, ya que es utilizado sin restricciones en la producción industrial de ácido cítrico y muchas otras enzimas que son de uso común en diversas industrias.

Por otro lado *A. flavus*, es un hongo saprófito que tiene la habilidad de colonizar tanto materia en descomposición, como plantas en desarrollo. Este microorganismo es ampliamente conocido por su capacidad para producir aflatoxinas, lo que hace que su presencia en cualquier tipo de alimento sea poco deseable. Por esta característica tiene un gran impacto económico, por las enormes pérdidas que ocasiona en diversos cultivos cada año. Los cultivos más frecuentemente contaminados con *A. flavus* son el maíz, el algodón y el cacahuate, aunque este microorganismo no es especie específico y puede ser encontrado en muchos cereales durante su almacenamiento.

Se sabe que los tejidos vegetales están compuestos en su mayoría por polímeros de gran peso molecular, entre los que se destaca la pared celular vegetal, la cual tiene la función principal de soportar la presión de turgencia osmótica de la misma, ésta se constituye por capas de microfibrillas de celulosa que están incrustados en una matriz compuesta de pectina y hemicelulosa.

Tanto *A. niger* como *A. flavus* producen enzimas que les sirven para degradar los polisacárido de la pared celular de las plantas lo que les permite aprovechar estos materiales como nutrientes para crecer. Una diferencia interesante es que *A. niger* produce una amplia batería de enzimas para degradar polisacáridos y se han encontrado, por ejemplo, cerca de 70 genes que codifican para enzimas que degradan pectina y sustancias relacionadas de los cuales se han caracterizado y estudiado con detalle cerca de 30 enzimas, mientras que en *A. flavus* se han identificado 18 genes y sólo se conocen 4 enzimas. Este hecho llama la atención ya que *A. niger* teniendo gran potencial genético y enzimático no coloniza plantas y crece sólo en materia orgánica en decaimiento, mientras que *A. flavus* es capaz de crecer en tejidos viables de plantas con apenas una cuantas enzimas.

El problema que se desea elucidar en este trabajo es, determinar si las enzimas secretadas por estos hongos juegan un papel importante en el mecanismo de patogenicidad de *A. flavus* sobre plantas vivas y tratar de definir el por qué *A. niger* a pesar de contar con su vasta gama de enzimas sólo es saprófito que no crece ni coloniza las plantas u organismos vivos. Es decir, si las escasas enzimas que produce *A. flavus* son más eficientes que las que produce *A. niger*, lo que le facilita la colonización de plantas vivas.

Para lograr lo anterior se comparó y cuantificó las enzimas secretadas por *A. flavus* CECT-2687 y *A. niger* N-402, en medios con diferentes fuentes complejas de carbono; como olote de maíz, salvado de trigo y cáscara de limón, para degradar los polímeros de la pared celular vegetal presentes en el medio, debido a que es la manera más sencilla para simular el medio normal en el que se desarrollan estos hongos.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Los hongos

Los hongos constituyen un conjunto de seres vivos que incluyen desde organismos unicelulares hasta organismos pluricelulares macroscópicos. Están formados por células eucariontes cubierta por una pared rígida, se caracterizan por ser inmóviles y presentar nutrición heterótrofa por absorción y reproducción sexual y asexual. Se presentan en 2 principales tipos de morfología: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme (Galagan, *et al.*, 2005)

Los hongos filamentosos son un grupo muy numeroso de organismos, cerca de 500,000 especies, que están formados por células cilíndricas alargadas y tienen un rango muy amplio de distribución en la naturaleza, donde juegan un papel importante; ya que contribuyen a la descomposición de la materia orgánica, así como de otros ciclos biológicos (Brambl, 2009). También son organismos aerobios que macroscópicamente producen colonias algodonosas con presencia de esporas y microscópicamente presentan estructuras tubulares, formados por múltiples células, denominadas hifas.

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos; lo anterior condiciona su modo de vida, ya que para desarrollarse necesitan estar asociados a materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos de carbono y otros elementos naturales (Abbas, *et al.*, 2005).

Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas, que en algunos casos pueden servirles de factor de virulencia en el hospedero (Kim, *et al.*, 2010). La reproducción de la mayoría de los hongos filamentosos puede ser tanto asexual como sexual los hongos que pueden realizar ambos tipos de reproducción sexual son conocidos como hongos verdaderos y los que sólo se reproducen de manera asexual, como pseudohongos. La reproducción asexual es aquella en la que la célula hija se separa de la madre mediante división celular, es decir mitosis y se lleva a cabo mediante la formación de esporas en hifas especializadas y la reproducción sexual se lleva a cabo en células distales con distinta diferenciación sexual, seguida de una segunda

fase de fusión de núcleos, recombinación y posterior meiosis, que da como resultado esporas sexuales haploides en órganos de reproducción diferenciados (Geiser, 2009).

En el caso específico de los hongos filamentosos las células hijas se forman en el extremo apical de los filamentos, por elongación y tabicación, por lo que no se separan de las hijas. Por ello para facilitar la dispersión a distancia de los hongos filamentosos se forman asexualmente esporas unicelulares de fácil dispersión.

2.2 El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* es uno de los más fascinantes grupos de hongos debido a su inmensa diversidad tanto ecológica como metabólicamente hablando. Los mohos del género *Aspergillus* están íntimamente relacionados con la industria alimentaria ya que son cruciales en la misma, claros ejemplos son *A. oryzae* que es utilizado en la realización del sake y *A. niger* que se utiliza tanto para la producción de ácido cítrico como en la producción de enzimas con aplicaciones en procesos de producción de alimentos (Kim y Marten, 2008). También, se sabe que generalmente son la causa del deterioro de muchos productos alimenticios desde semillas hasta productos alimenticios procesados.



Figura 1. Maíz infectado por *A. flavus* (www.aspergillusflavus.org)

Una de las características más importantes, biotecnológicamente hablando, es la producción y secreción de numerosas enzimas, ácidos orgánicos y otros metabolitos secundarios, sin embargo otros

productos metabólicos suelen ser muy tóxicos y son parte de la invasión fúngica en el hombre y otros seres vivos, un ejemplo muy claro es la infección de semillas donde causan la inhibición de la germinación y la posterior podredumbre de las mismas (Perrone, *et al.*, 2007)

Otra característica muy significativa es que algunas especies, como *Aspergillus flavus*, pueden actuar como patógenos tanto en plantas como en animales causando Aspergillosis. Sin embargo, para que esta infección ocurra por parte de estos mohos, es necesario que el hospedero presente inmunodepresión (Mellon, *et al.*, 2007)

La facilidad con la que las esporas de este género se dispersan a través de los ecosistemas por medio de corrientes de aire, además de su capacidad de crecer prácticamente en cualquier ecosistema, siempre y cuando la humedad y la disponibilidad de nutrientes lo permitan, hace que este género sea considerado como ubicuo. Otra característica que define a los hongos en general es su estrategia nutricional, debido a que son organismos incapaces de desplazarse, secretan ácidos y enzimas en la superficie en la que se desarrollan degradando polímeros de azúcares en monómeros que pueden ser absorbidos a la célula fúngica (Kim y Marten, 2008). Taxonómicamente, la manera más rápida para identificar una especie de *Aspergillus* es el tamaño y la forma de la cabeza conidial y el color y tamaño de las esporas.

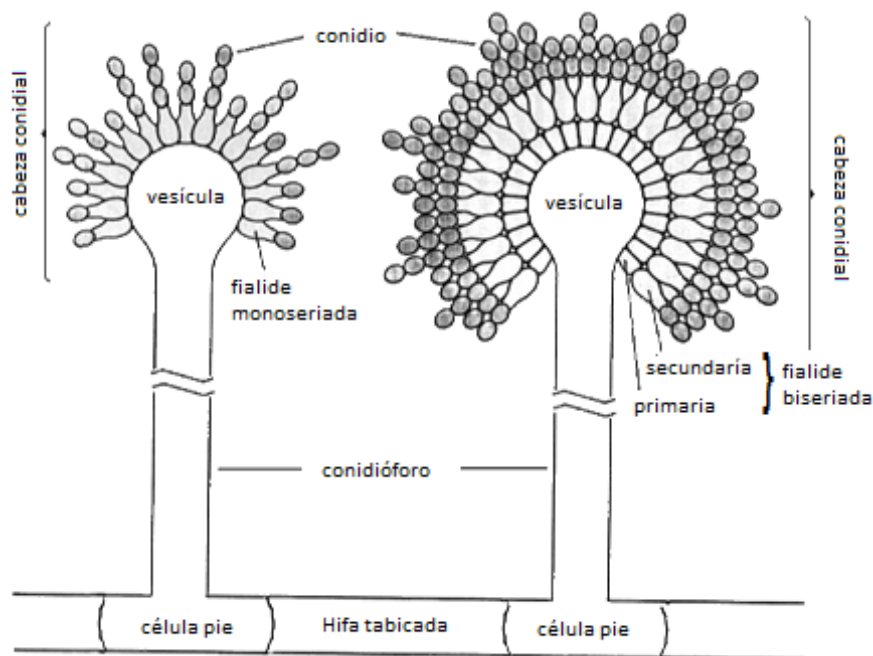


Figura 2: Morfología microscópica del conidióforo de *Aspergillus spp* (Alcalá, *et al.*, 2009)

Cada componente de la morfología microscópica del conidióforo de este género (Figura 2), tiene un importante papel para el desarrollo y proliferación del mismo. El conidióforo es la base que soporta la cabeza conidial y que surge como una ramificación perpendicular del micelio, por otro lado la cabeza conidial esta formada por la vesícula, las fialides y las conidias, la morfología de ésta es fundamental para la caracterización de una cepa de *Aspergillus*. Las fialides son las células generadoras de conidias que se forman en toda la superficie de la vesícula. Las conidias en el caso del género *Aspergillus* son fialosporas y forman cadenas no ramificadas y pueden ser pigmentadas o no. Por ejemplo, la cepa *A. niger* posee esporas negras y *A. flavus* esporas verdes y pequeñas.

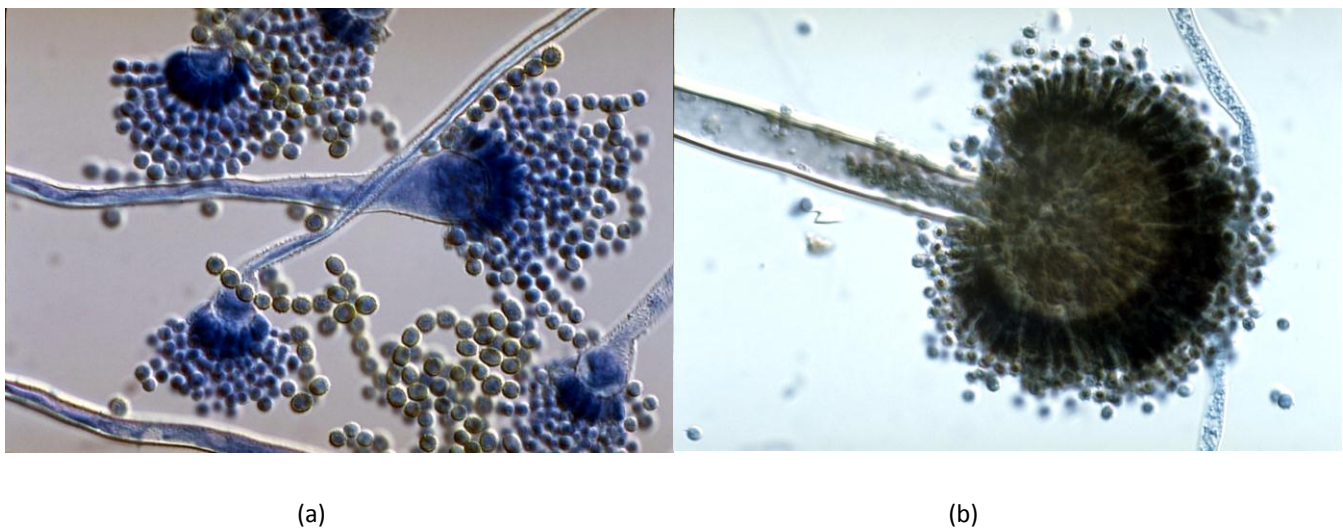


Figura 3. Vistas microscópicas de los hongos (a) *Aspergillus flavus* (Carrillo, 2003) y (b) *Aspergillus niger* (Carrillo, 2003).

2.3 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus es un hongo saprófito con la habilidad de utilizar un amplio rango de fuentes de nutrientes y que tiene una gran importancia económica y patogénica, ya que es productor de una micotoxina hepatocarcinogénica, principalmente la B1, que causa pérdidas millonarias anuales en el sector agropecuario, al tener que rechazar cualquier cosecha que contenga más de 20 ppb de aflatoxina B1 para la FDA (US Food and Drug Administration) y 4 ppb para la Unión Europea (Mellon, *et al.*, 2007), en productos para alimentación humana y animal (Hedayati, *et al.*, 2007)

Aspergillus flavus es un patógeno oportunista que ha sido aislado de cultivos como maíz, cacahuate, algodón y de otros organismos tales como aves, mamíferos e insectos (Mellon, *et al.*, 2007), se dice que es oportunista, ya que generalmente ataca el tejido vegetal o animal enfermo o dañado. En el caso de los vegetales, ataca aquellos que han sido dañados por insectos o que han sido almacenados en malas condiciones, es decir, en una humedad relativa mayor al 13% y temperaturas mayores a 30° C (Wrather, *et al.*, 2000).

Se ha encontrado que *Aspergillus flavus* cuenta con 18 genes que codifican para enzimas enfocadas en la degradación de polímeros de pared celular vegetal, de las cuales 4 están caracterizadas como pectinasas (Luo, *et al.*, 2011)

Por otro lado, *A. flavus* suele formar colonias con una densa capa de conidias que se encuentran en un rango de colores entre el amarillo y el verde con un diámetro de 3 a 5 cm. (Jiujiang, *et al.*, 2005). Las cabezas de las conidias típicamente son radiales (Rodrigues, *et al.*, 2007).

Las colonias de *A. flavus*, con un diámetro aproximado de 2-4 cm, suelen formar una densa capa de conidias amarillo verdosas al ser incubado por 4 días en medio Sabouraud a 37°C. Las conidias suelen ser radiales y los conidióforos pueden crecer de 1 a 2.5 mm de longitud. Las vesículas tienen un diámetro promedio de 25-45 µm. Las conidias miden 3.6 µm de diámetro y son de color verde pálido (Samson, *et al.*, 2004).

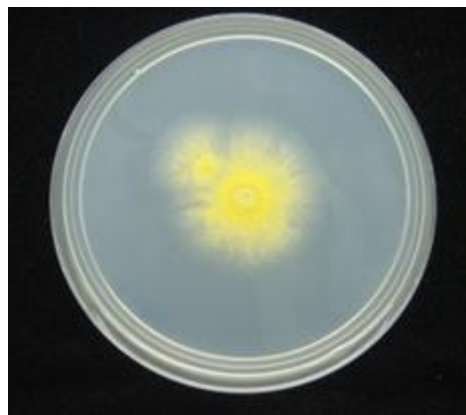


Figura 4. *Aspergillus flavus* en medio Sabouraud.

2.4 *Aspergillus niger*

Se sabe que *Aspergillus niger*, tiene una amplia distribución mundial, su ocurrencia ha sido documentada desde la región ártica hasta el trópico. A diferencia de otras especies, los reportes de *A. niger* en el trópico no superan el 50% del total reportado, sin embargo se reconoce que es más común en regiones cálidas. (Samson, et al., 2006).

Se encuentra, principalmente en materia orgánica en descomposición, y produce una muy variada gama de enzimas. Es considerado un microorganismo saprobio común del suelo. Sin embargo, en su interacción con el hombre y animales, este hongo se reconoce como patógeno asociado a infecciones del oído medio y externo, también se ha asociado a enfermedades pulmonares y renales. Como fitopatógeno se ha asociado a lesiones en la raíz de cacahuets y síntomas en sorgo, cebolla y ajo. Algunas cepas, que provienen de suelos ácidos, presentan actividad solubilizadora de fosfato de calcio en medio de cultivo. (Samson, et al., 2006).

El ADN de *A. niger*, contiene 70 genes que codifican para la producción de 30 exoenzimas enfocadas en la degradación de sustancias pécticas, mientras que en *A. flavus* sólo se han encontrado 18 genes y se ha demostrado únicamente la existencia de 4 pectinasas. Este moho, tiene hifas bien desarrolladas, profusamente ramificadas, hialinas y septadas. Como regla general las células son multinucleadas. Un gran número de células conidiogénicas se producen en la superficie de la vesícula multinucleada a medida que ésta se desarrolla, por lo que se observan como cabezas conidiales radiadas (Castilho, et al., 2000).

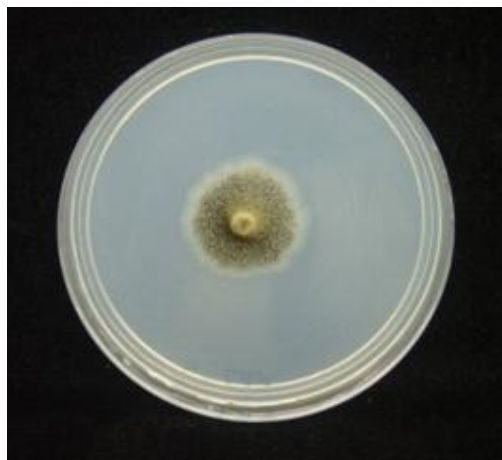


Figura 5. *Aspergillus niger* en medio Sabouraud.

2.5 Polisacáridos de la pared celular de plantas

La pared celular vegetal es un órgano complejo que le otorga soporte y estructura a los tejidos vegetales. Dentro de los principales componentes de la pared celular se encuentran la celulosa, la hemicelulosa, las pectinas y los glucanos (Fennema, 1993).

La pared celular de plantas es la principal característica que diferencia las células vegetales de las animales. Su presencia es básica para muchas características de las plantas, también previene la elongación de la célula y tiene un papel muy importante en la absorción, transporte y secreción de sustancias en la planta (Albersheim, 1975).

La pared de la célula vegetal es alrededor de 0,2 μm de espesor y recubre por completo el exterior de la membrana plasmática de la misma. Esta estructura cumple algunas de las funciones de la matriz extracelular producida por las células animales, a pesar de que las dos estructuras están compuestas de macromoléculas totalmente diferentes y tienen una organización distinta. La pared celular vegetal conecta las células para formar tejidos, induce el crecimiento y división celular (Berk y Lodish, 2005).

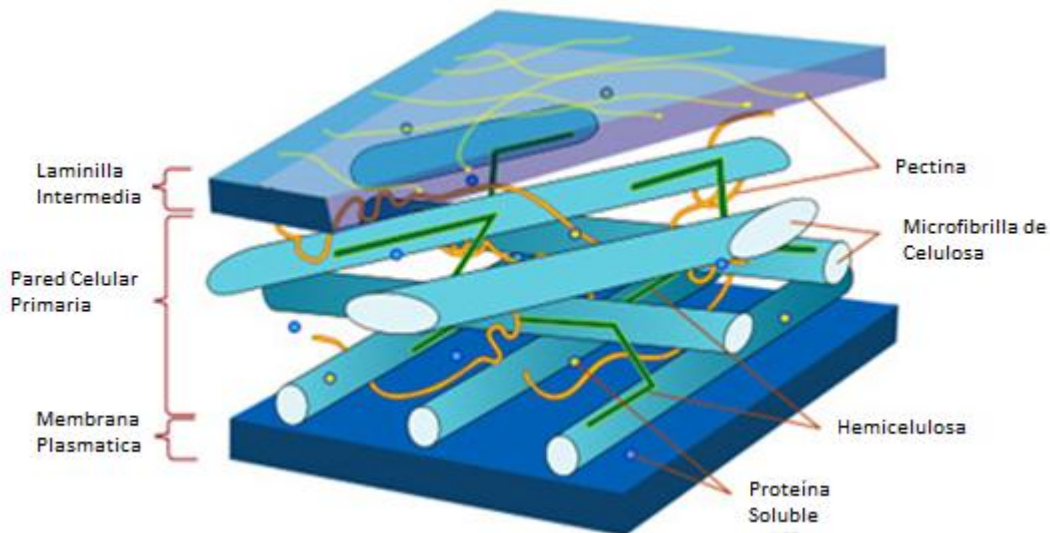


Figura 6. Pared celular de las plantas (Portal of the EU-SOL project, 2010).

El componente más característico de la pared celular vegetal es la celulosa, lo que determina en gran medida su arquitectura. La celulosa es una cadena de glucosas unidas entre si por enlaces β -1,4. Estas cadenas largas y delgadas de celulosa se unen para formar “microfibrillas”. El marco de celulosa de la pared está interconectada por una matriz de moléculas diferentes a la celulosa, tales como la hemicelulosa y sustancias pécticas. Otras sustancias que se pueden encontrar en la pared celular vegetal son lignina y sustancias grasas como ceras. (Albersheim, 1975).

Los polisacáridos constituyen un grupo heterogéneo de polímeros, en que intervienen más de 10 monosacáridos unidos por distintos enlaces glucosídicos; los polisacáridos de menos de 10 unidades son considerados oligosacáridos (Badui, 2006).

La mayoría de los polisacáridos cuentan con cientos e incluso miles de monómeros, por lo que su peso molecular puede ser de hasta millones, debido a lo anterior en solución sólo forman dispersiones de tamaño coloidal y estando puros son inodoros e incoloros.

Se encuentran como cadenas lineales o ramificadas de un sólo monómero (homopolisacárido) o por varios tipos de monosacáridos (heteropolisacárido). Los enlaces que se presentan en la cadena pueden darse entre el C₁ o C₂ y el C₂, C₃, C₄, C₅ o C₆ del segundo residuo. Un polisacárido ramificado presenta más de dos tipos de enlace en una sola molécula (Badui, 2006).

De acuerdo con su función biológica, los polisacáridos se han dividido en dos grandes grupos: los que constituyen la estructura celular y le confieren rigidez a los tejidos (celulosa, pectinas, gomas, etc.) y los que representan la reserva energética de animales (glucógeno) y vegetales (inulina y almidón); cada grupo tiene propiedades físicas y químicas muy distintas. (Badui, 2006).

Los polisacáridos estructurales presentan generalmente las siguientes características: son insolubles en agua, forman puentes de hidrógeno intermoleculares muy fuertes y enlaces glucosídicos generalmente β y sus dispersiones son de muy alta viscosidad; los polisacáridos más importantes para el presente trabajo son los polisacáridos estructurales, específicamente pectinas y xilanos.

2.5.1 Pectinas

Las sustancias pécticas comprenden un extenso grupo de heteropolisacáridos vegetales cuya estructura básica esta integrada por moléculas de ácido D-galacturónico, unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1,4), en el cual algunos carboxilos pueden estar esterificados con metilos o en forma de sal. Las pectinas se encuentran asociadas con otros hidratos de carbono, principalmente con hemicelulosas, en las paredes celulares de los vegetales. Las pectinas se encuentran en mayor cantidad en los frutos inmaduros y especialmente en algunos tejidos suaves, como en la cáscara de los cítricos (naranja, limón, toronja, lima), en las manzanas, las peras, etc. Aun dentro del propio vegetal existe una distribución de las mismas; las más esterificadas están en la parte más interna, y las menos esterificadas en la periferia (Badui, 2006).

Las sustancias pécticas se encuentran en las laminillas intermedias de las células vegetales, se les considera estrechamente vinculadas a la celulosa y llenan los espacios intercelulares en los tejidos vegetales. En los tejidos jóvenes, especialmente en los frutos, las pectinas se encuentran presentes en cantidades tan abundantes que a menudo forman canales anchos, apartando entre sí a las células (Showalter, 1993).

Se pueden distinguir 2 principales sustancias pécticas: los ácidos pectínicos, que tienen una pequeña porción de sus ácidos poligalacturónicos como ésteres metílicos, y los ácidos pécticos, que sólo contienen moléculas de ácido poligalacturónico libre de esterificación (Badui, 2006).

La funcionalidad de una pectina, y por ende su aplicación, dependen de factores intrínsecos como su peso molecular y su grado de esterificación y por factores extrínsecos, tales como el pH, las sales disueltas y la presencia de azúcares. La viscosidad de sus dispersiones, al igual que la de muchos otros polisacáridos, se incrementa a medida que aumenta el peso molecular; en el caso de las pectinas, la viscosidad es mayor en cuanto más se incrementa el grado de esterificación (Badui, 2006).

Por lo anterior, las pectinas desempeñan un papel muy importante en la industrialización de las frutas, como la elaboración de jaleas (manufacturadas con pectinas de bajo metoxilo), gelatinas (con pectinas de alto metoxilo) y, sobretodo, en lo relacionado con la elaboración de bebidas.

arabinogalactanos altamente ramificadas y/o cadenas laterales cortas de unidades de D-xilosa, unidas por enlaces covalentes. La presencia de cadenas laterales puede ser también un factor limitante de la longitud de las zonas de unión y de la asociación de cadenas. Estas zonas de unión se forman entre cadenas de pectina regulares y no ramificadas cuando se eliminan las cargas negativas de los grupos carboxilato (por adición de ácido), cuando se reduce la hidratación de las moléculas (por adición de cosoluto, casi siempre un azúcar, a la solución de pectina), y/o cuando las cadenas del polímero de ácido pectínico se unen mediante puentes de cationes calcio (Fennema, 1993).

2.5.2 Xilanos

La hemicelulosa, de la cual el xilano es parte, es el nombre que se le ha dado a un grupo muy extenso de polisacáridos con diversos tipos de monómeros (heteropolisacáridos) que se localizan principalmente en la pared celular de plantas y que son muy distintos al almidón o a la celulosa. Generalmente son solubles en soluciones alcalinas concentradas (18 a 24% de hidróxidos de sodio o de potasio), presentan estructura amorfa (aun cuando algunos se desarrollan una forma fibrilar), y actúan como agentes cementantes en el tejido vegetal (de Vries y Vissier, 2001).

Los xilanos están formados por unidades de D-xilosa y son componentes de la madera. La D-xilosa es una aldopentosa, que cuando adopta su forma cerrada da lugar a un anillo piranósico. Los xilanos están formados por la unión de residuos de β -D-xilopiranosas mediante enlaces (β -1,4). Con frecuencia los xilanos contienen monosacáridos derivados que se unen a la xilosa mediante enlaces (α -1,2) ó (α -1,3). Estas modificaciones son características para cada tipo de madera y todas estas variantes se agrupan bajo el término de hemicelulosas, una hemicelulosa característica de maderas duras, es el glucuronoxilano que está formado por β -D-xilopiranosas unidas mediante enlaces (β -1,4), y presenta residuos de 4-O-metil- β -glucurónico unidos mediante un enlace (β -1,2) (de Vries, 2001).

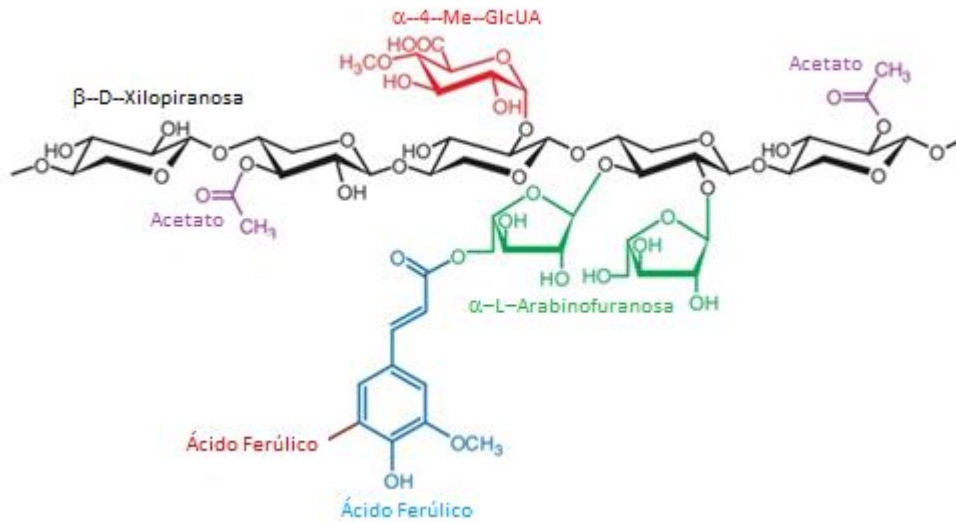


Figura 8: Estructura esquemática del xilano mostrando los principales sustituyentes que se presentan en su estructura. (Varki, *et al.*, 2009).

2.6 Enzimas secretadas por hongos para la degradación de polisacáridos

Una enzima es una proteína que actúa como catalizador biológico, llevando a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades, no se consume durante la reacción y en general presentan un alto grado de especificidad. Todas las células, incluyendo microorganismos y organismos superiores, producen enzimas. Su acción está estrechamente ligada con las reacciones metabólicas, y la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas a las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían si no estuvieran presentes las enzimas (Badui, 2006).

Todas las enzimas son proteínas, tienen una estructura tridimensional globular y sólo presentan actividad cuando tienen una conformación especial que permite establecer una disposición óptima de los aminoácidos de su centro activo o sitio catalítico (Badui, 2006).

La especificidad de las enzimas se puede clasificar en tres diferentes tipos la primera es la especificidad estereoquímica, es decir que esta pueda reconocer una forma óptica específica del sustrato (α , β), la segunda es la regioespecificidad donde la enzima sólo actúa en determinado grupo

funcional en determinada posición de una molécula y finalmente la quimioselectividad donde las enzimas sólo actúan sobre sustratos con determinado enlace y grupo funcional específico al lado de éste (Badui, 2006).

Las enzimas juegan un papel muy importante en el desarrollo y crecimiento de todos los organismos, en el caso específico de *A. flavus* y *A. niger*, éstas ayudan a degradar polímeros y que de esta manera el hongo tenga disponibles diferentes monómeros como fuentes de nutrientes. Las enzimas que serán expresadas dependen directamente del medio en el que se encuentre el microorganismo.

2.6.1 Pectinasas

La pectina, polisacárido encontrado en pared celular primaria y lámina media de frutas y vegetales, es un extenso grupo de heteroglicanos vegetales cuya estructura básica está integrada por moléculas de ácido D-galacturónico, unidas por enlaces glucosídicos α -D- (1,4), en la cual algunos de los carboxilos pueden estar esterificados con metilos o en la forma de sal (Jayani *et al.*, 2005). Los grupos ácidos a lo largo de la cadena están altamente esterificados con grupos metoxilo, también puede haber presentes grupos acetilo (Ramanujam, *et al.*, 2008). Otros sustituyentes comunes en la pectina son la ramnosa y otros azúcares, tales como xilosa, galactosa y arabinosa (Shembekar y Dhorte, 2009).

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas están integradas por grupo heterogéneo de enzimas relacionadas que hidrolizan las sustancias pécticas generalmente presentes en plantas y forman un grupo de al menos siete diferentes actividades enzimáticas que contribuyen a la degradación de pectina. La pectolisis es uno de los procesos más importantes de las plantas, ya que juega un papel en la elongación celular, así como la maduración de las frutas. En cambio, la pectolisis microbiana es importante para la patogénesis, simbiosis y descomposición de la planta (Lang y Dörnenburg, 2000). Las principales fuentes de microorganismos que producen enzimas pectinolíticas son las levaduras, bacterias y una gran variedad de hongos principalmente del género *Aspergillus* (Luh y Pha, 1951).

Las pectinasas se pueden dividir en tres grupos diferentes, las poligalacturonasas que se encargan de hidrolizar enlaces glucosídicos α -(1,4) empezando por el extremo no reductor del polímero; las pectinliasas que también rompen enlaces glucosídicos α -(1,4) pero por medio de un mecanismo de acción de β -eliminación. De las dos enzimas anteriores se han encontrado tanto endoenzimas como exoenzimas. Por último, las pectinesterasas rompen el enlace éster entre la cadena de ácido galacturónico y sus restos metilados y por lo tanto reducen el grado de metilación, lo que facilita el ataque de otras enzimas pectinolíticas. (Jayani *et al.*, 2005)

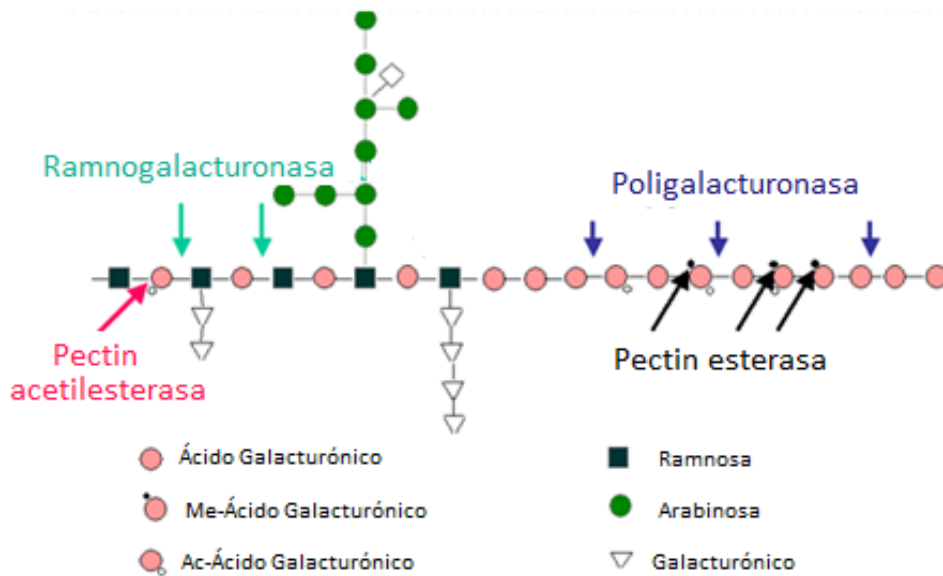


Figura 9: Esquematación del sitio de acción de las principales enzimas pectinolíticas. (Varki, *et al.*, 2009).

Las ramnogalacturonasas cortan el enlace entre ácido galacturónico y ramnosa en la parte “peluda” de la pectina. Las pectinesterasas remueven pequeñas ramificaciones de las cadenas pécticas, no afectan la longitud, pero si la solubilidad de la pectina y la vuelve más sensible al ataque de otras enzimas. Las poligalacturonasas rompen las cadenas pécticas añadiendo una molécula de agua e hidrolizando el enlace α -1,4-glicosidico entre dos moléculas de ácido galacturónico, éstas a su vez se dividen en endo y

exo. En el primer grupo se encuentran las enzimas encargadas de hidrolizar de manera aleatoria los enlaces α -1,4-glicosídicos de la pectina, preferentemente aquellos que están altamente esterificados.

En cambio, las enzimas tipo exo causan una ruptura secuencial de los enlaces α -1,4-glicosídicos de la pectina, a partir de los extremos no reductores de la cadena principal.

Las poligalacturonasas y las pectato-liasas son endopectinasas, lo que quiere decir que actúan entre dos moléculas de ácido galacturónico haciendo la pectina más soluble y disminuyendo la viscosidad de las soluciones de la pectina. Las primeras catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glicosídicos en el ácido poligalacturónico (Niture y Pant, 2004).

Las poligalacturonato y polimetilgalacturonato liasas rompen los enlaces glicosídicos α -1,4 mediante reacciones de trans-eliminación, que remueven un protón, lo que da como resultado un enlace insaturado entre los carbonos C-4 Y C-5 de la unidad de sacáridos y los extremos no reductores.

Si actúan sobre la región esterificada del homogalacturonano, se conocen como pectato-liasas. De igual manera, dentro de las liasas se encuentran enzimas con mecanismos tanto endo como exo (Niture y Pant, 2004).

Cabe recalcar que las endopoligacturonasas son las más importantes para la maceración de tejido vegetal, captura de nutrientes y la virulencia de *A. flavus* (Arunachalam y Asha, 2010). Otras poligalacturonasas importantes para la maceración de tejido vegetal son las pectinmetil esterases, que ayudan a la degradación de la pectina al aumentar los puntos de unión para otras pectinasas (Jayani, *et al.*, 2005).

Las pectinasas tienen un amplio campo de utilización en la industria alimentaria, donde ya se utilizan ampliamente enzimas producidas y aisladas de *A. niger*, tales como la ayuda de extracción de jugo de frutas y vegetales, producción de néctares y purés, en la clarificación de vinos y cerveza y en la alimentación animal (Bhat, 2000).

2.6.2 Xilanasas

El xilano es un polisacárido constituido por una cadena lineal de residuos de xilosa y diversas ramificaciones. El xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa. La cadena consta de 30-100 unidades de β -D-xilopiranosas con enlaces 1,4-glicosídicos.

El xilano es el componente mayoritario de la hemicelulosa. Las hemicelulosas consisten en polímeros de pentosas como la xilosa y la arabinosa, hexosas como glucosa, manosa, galactosa y ácidos urónicos.

Existen 6 tipos de xilanasas, la glucuronidasa que rompe la unión éster del glucurónido, las feruloil esterases que se encargan de la hidrólisis de un polisacárido feruloilado, arabinofuranosidasas que se encargan de romper el enlace entre la arabinosa y glucosa en la cadena principal de polímero; las acetilo xilanasas que liberan grupos acetatos las endo-xilanasas que rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal y finalmente las β -xilosidasas que son activas sólo sobre oligosacáridos muy cortos, hidrolizan enlaces β -1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa.

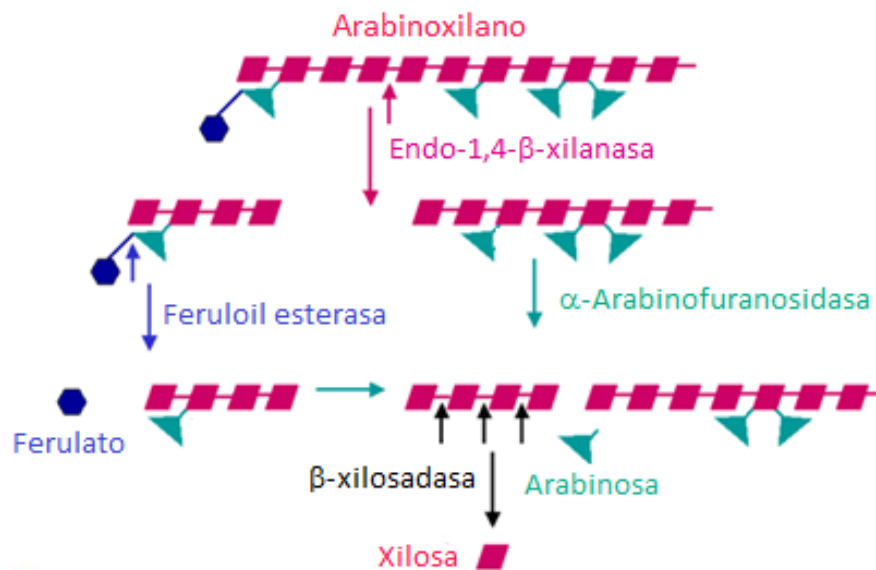


Figura 10: Esquemización del sitio de acción de las principales enzimas xilanolíticas.

(Varki, *et al.*, 2009).

La biodegradación del xilano depende de dos clases de enzimas las endoxilanasas que son capaces de degradar el mismo en oligosacáridos más pequeños hasta llegar a xilosa por medio de β -xilosidasas. Muchas enzimas xilanólíticas han sido caracterizadas en varias especies del género *Aspergilli*, encontrando que su pH óptimo desde 3.5 hasta 9.0 (de Vries, 2001).

2.7 La Agroindustria y sus desechos

La agroindustria es la actividad económica que comprende la producción, industrialización y comercialización de productos agropecuarios, forestales y biológicos. Esta rama de industrias se divide en dos categorías, alimentaria y no alimentaria, la primera se encarga de la transformación de los productos de la agricultura, ganadería, riqueza forestal y pesca, en productos de elaboración para el consumo alimenticio, en esta transformación se incluyen los procesos de selección de calidad, clasificación (por tamaño), embalaje-empaque y almacenamiento de la producción agrícola, a pesar que no haya transformación en sí y también las transformaciones posteriores de los productos y subproductos obtenidos de la primera transformación de la materia prima agrícola (Ginocchio, 2000). La rama no-alimentaria es la encargada de la parte de transformación de estos productos que sirven como materias primas, utilizando sus recursos naturales para realizar diferentes productos industriales.

Es evidente que una parte muy considerable de la producción agrícola se somete a un cierto grado de transformación entre la cosecha y la utilización final. Por ello, las industrias que emplean como materias primas productos agrícolas, pesqueros y forestales forman un grupo muy variado: desde la mera conservación (como el secado al sol) y operaciones estrechamente relacionadas con la cosecha, hasta la producción, mediante métodos modernos y de gran inversión de capital, de artículos como productos textiles, pasta y papel. A lo largo de esta cadena de transformaciones se produce una gran cantidad de desechos y residuos, que pocas veces son tratados (Ginocchio, 2000).

Cada año se genera una gran cantidad de toneladas de residuos agrarios, los cuales en su mayoría son desechados, y en pocos lugares y muy localmente, se les da un uso productivo atribuyéndoles un valor añadido. Los residuos agrarios generalmente se desechan constituyendo un foco de contaminación ambiental. La cantidad de residuos producidos es estimada en 2562 millones de toneladas para los

cereales, 238 millones para las leguminosas y 162 millones para las oleaginosas, con un total mundial de 2962 millones de toneladas por año (Lal, 1995).

Por lo que, urge encontrar maneras de facilitar la degradación y posterior eliminación de las miles de toneladas de desechos que se producen, y también como una vía viable de tratar estos residuos y posteriormente utilizarlos como composta ó fertilizante.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo General

- Comparar los sistemas enzimáticos secretados por *A. flavus* CECT-2687 y *A. niger* N-402, durante su crecimiento en medios con fuentes complejas de carbono y analizar la capacidad de los sistemas de ambos microorganismos para degradar pectina y xilanos.

3.2 Objetivos Particulares

- Producir enzimas xilanolíticas y pectinolíticas con ambas cepas en fermentación en lote utilizando cáscara de limón, olote de maíz y salvado de trigo.
- Determinar en que fuente de carbono compleja se producen los más altos niveles de enzimas, para ambas cepas, para posteriormente producir concentrados enzimáticos y caracterizarlos.
- Determinar las cinéticas de degradación de Pectina y Xilano de los filtrados enzimáticos concentrados de cada cepa.
- Hacer un análisis comparativo del tipo y cantidad de enzimas obtenidas por cada cepa.

3.3 Hipótesis

Si la naturaleza de la fuente de carbono influye sobre el tipo y cantidad de enzimas producidas para su asimilación, entonces cuando *A. flavus* y *A. niger* crecen en sustratos complejos producirán sistemas enzimáticos con una amplia diversidad de componentes que utilizarán para poder asimilar con mayor o menor eficiencia tales materiales. Así mismo, las enzimas de cada microorganismo podrán ser diferentes dados los diferentes nichos ecológicos en que habita cada uno.

3.4 Planteamiento del Problema

Aspergillus niger es un hongo que cuenta con cerca de 70 genes de los cuales se han caracterizado unas 35 enzimas enfocadas en la degradación de sustancias pécticas, mientras que *Aspergillus flavus* sólo cuenta con 18 genes y con 4 enzimas pectinolíticas analizadas. A pesar de lo anterior, *A. niger* crece preferencialmente en materia orgánica en decaimiento y *A. flavus* es un patógeno oportunista de tejido vegetal vivo. Por lo que determinar el papel que juegan estas enzimas en la degradación de la pared celular vegetal y la colonización de tejido vegetal viable es de suma importancia. Por ello, el estudio de las enzimas de *A. flavus*, la caracterización y el análisis comparativo de éstas con las producidas por *A. niger* en las mismas condiciones de crecimiento, podrá conducirnos a un mejor entendimiento de las características de las enzimas que favorecen el crecimiento de *A. flavus* en tejidos vegetales.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas de referencia *Aspergillus flavus* CECT-2687, productora de aflatoxinas, y *Aspergillus niger* N-402. Se activaron en agar Sabouraud y se resembró quincenalmente en placas con el mismo medio de cultivo para mantener la cepa viable, se incubaron a 37°C por 72 horas y se mantuvieron en refrigeración (4°C).

4.2 Siembra masiva de hongos filamentosos

Se tomaron de 2-5µL de esporas en solución salina isotónica del hongo seleccionado con un asa micológica estéril y se sembró en el centro de una caja petri con agar Sabouraud presionando ligeramente el asa sobre el agar. Posteriormente, con un asa de Drigalsky estéril se extendió en todo el medio, subsiguientemente se incubó a 37°C de 48 a 72 horas.

4.3 Cosecha de esporas

Se vertió solución salina isotónica (0.9% p/v) con tween 80 (0.005% p/v) estéril a una serie de placas con cultivos fúngicos esporulados, se raspó suavemente la superficie de cada caja con un asa Drigalsky estéril, se repitió el paso anterior hasta terminar de liberar todos los conidios de los cultivos. Se recolectó toda la suspensión y se centrifugó 5 min a 500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Este paso se repitió el lavado con solución salina isotónica con tween 80, hasta que se eliminó cualquier rastro de medio ó hifas. Finalmente, se agregaron 10 mL solución salina isotónica con tween 80.

4.4 Conteo de esporas

La determinación de la concentración de esporas (conidios) en la suspensión final se realizó mediante el método de conteo directo con la cámara de Neubauer. Para ello se realizó una dilución pertinente, generalmente 1:100 de la suspensión original, a partir de esta dilución se tomaron 10 µL y se colocaron en la cámara, ésta se colocó en el microscopio observándose con el objetivo de 40X.

Se contaron las esporas contenidas en 16 cuadros que conforman uno de los cuatro cuadrantes de la cámara. La concentración de esporas de la suspensión se calculó de la siguiente manera:

$$[\text{Esporas/mL}] = \# \text{ esporas contadas} \times 4 \text{ cuadrantes} \times 2500 \times 100 \text{ (dilución)}.$$

4.5 Producción de enzimas en medio líquido (fermentación por lote)

En matraces de 500 mL, con 100 mL de medio basal (KH_2PO_4 2g/L, K_2HPO_4 2g/L y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L), con 1 % p/v de la fuente de carbono seleccionada, se inocularon esporas de la cepa seleccionada con una concentración final de 10^6 por mililitro de cultivo y se ajustó el pH con NaOH a 6.0. Los matraces fueron incubados a 37°C por 72 horas en incubadora con movimiento recíproco a 300 rpm para favorecer una buena aireación y homogeneización del medio.

4.6 Obtención de filtrados enzimáticos crudos de los medios

Los matraces con medios de cultivo líquido se muestrearon a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 horas), tomando aproximadamente 5 mL para cada muestra, los cuales se filtraron con papel filtro Whatman #1 y se guardaron las muestras a 4°C para posterior determinación de actividades enzimáticas.

4.7 Determinación de actividad exopectinolítica

Se determinó a partir de la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática empleando una curva de ácido galacturónico como patrón. La mezcla de reacción constó de 0.5 mL de solución de pectina cítrica al 1% p/v, 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM (pH 5.0) y 0.1 mL de filtrado enzimático. La mezcla de reacción se inició adicionando 0.1 mL de filtrado extracelular, se incubó durante 20 minutos a 45°C, al término de ese tiempo la reacción se detuvo adicionando 2 mL de reactivo de DNS. Los tubos se colocaron a baño María a ebullición durante 5 minutos. Se agregaron 5 mL de agua destilada y se centrifugó a 500 rpm por 5 min para eliminar la pectina residual. Posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm. En el caso de los blancos se incubaron sin muestra y al término de los 20 min de incubación se añadió el 0.1 mL de filtrado enzimático. La actividad se expresa en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima que produce una micromol de ácido galacturónico en dichas condiciones.

4.8 Determinación de actividad Xilanolítica

Se determinó a partir de la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática empleando una curva de ácido galacturónico como patrón. La mezcla de reacción constó de 0.5 mL de solución de xilano de abedul 1% p/v, 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM (pH 5.0) y 0.1 mL de filtrado enzimático. La reacción se inició adicionando 0.1 mL de filtrado extracelular, se incubó durante 20 minutos a 45°C, al término de este tiempo la reacción se detuvo adicionando 1 mL de reactivo de DNS. Los tubos se colocaron a baño María a ebullición durante 5 minutos. Se agregaron 5 mL de agua destilada a cada uno y se agitaron en un vortex a máxima velocidad para homogeneizar la muestra. Posteriormente, se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm. En el caso de los blancos se incubaron sin muestra y al término de los 20 min de incubación se añadió 0.1 mL de filtrado enzimático. La actividad se expresa en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima que produce una micromol de xilosa en dichas condiciones.

4.9 Concentración de los filtrados enzimáticos por medio de liofilización

Los filtrados enzimáticos obtenidos del modo antes descrito, fueron centrifugados a 5 000 rpm en la centrifuga Beckman J2-MC por 10 min, para eliminar los oligosacáridos o sacáridos que podrían haber pasado la filtración. Posteriormente se liofilizaron las muestras 5×10^{-3} mbar y -50°C por 36 horas. A continuación las muestras fueron resuspendidas en 150 μ L buffer tris-SDS 5X. Finalmente, se agitaron en un vórtex a máxima velocidad y se centrifugaron a 500 rpm durante 5 min.

4.10 Obtención de geles de SDS-PAGE

La preparación de los geles de poliacrilamida de 8x8 cm con SDS se realizó en condiciones desnaturalizantes. Se tomaron 5 μ L de muestra concentrada a la cual se adicionó un volumen equivalente de buffer de tratamiento desnaturalizante (SDS al 4%, glicerol al 20%, 2- β -mercaptoetanol al 10%, buffer Tris-HCl a 125mM a pH 6.8 y azul de bromofenol al 0.005%) 2X. El gel separador se preparó al 10% de acrilamida. La electroforesis se corrió a corriente constante (15mA/gel), por alrededor de 1 hora, a través de una unidad de geles verticales de 1.0 mm Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los geles para determinar peso molecular se sumergieron en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.025%, metanol al 40% v/v y ácido acético al 7% v/v durante una hora

con agitación suave (40 rpm) para teñir la proteína y se destiñeron con una solución de ácido acético al 10% v/v.

4.11 Zimogramas

Los geles de acrilamida, por separado, se incubaron en buffer de renaturalización (Tris-HCl 10mM pH 7.5) a 37°C por 1 h; se decantaron e incubaron en buffer de acetatos 100mM (pH 5.0) a 37°C durante 30 min. Se decantaron y se incubaron, para actividad pectinolítica en pectina cítrica al 1% p/v en buffer de acetatos (pH 5.0), y para actividad xilanolítica en xilano de abedul al 1% p/v en buffer de acetatos (pH 5.0), en ambos casos a 37°C por 30 min. Se decantaron y se eliminó el exceso de sustrato con agua destilada; se deshidrataron en etanol al 96% a temperatura ambiente por 15 min, y se rehidrataron con agua destilada por 20 min. Para pectinasas, el gel se tiñó con una solución de rojo de Rutenio al 0.05% p/v por 30 min con agitación suave, y se lavó con agua destilada para remover el exceso de colorante. Para xilanasas, el gel se tiñó con una solución de rojo Congo al 0.1% p/v 90 min con agitación suave, se decantó y se agregó NaCl 1M por 15 min; posteriormente se almacenó en una solución de ácido acético al 10% v/v. Cada vez que se corrió un gel para determinar proteína, uno análogo se corrió para generar su zimograma.

4.12 Concentración de los filtrados enzimáticos por medio de ultrafiltración

El filtrado enzimático, el cual estaba compuesto aproximadamente por 350 mL, fue concentrado aproximadamente 10 veces, por medio de ultrafiltración en una celda de ultrafiltración de 400 mL usando una membrana de 10,000 Da, con una presión de 30 psi, con lo que se obtuvo un aproximado de 35 mL de concentrado enzimático libre de células.

4.13 Determinación de cinética de degradación de sustrato de los concentrados enzimáticos

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 95 mL de sustrato al 1% disuelto en buffer de acetatos pH 5, en el caso de pectina se incubaron a 45°C por 6 min para homogeneizar la temperatura, posteriormente se agregó 1U/mL de sustrato y se muestreó cada 10 min la primera hora y cada 20 a

partir de la segunda. Para el xilano se realizó el mismo procedimiento pero la temperatura de incubación fue de 50°C.

El ajuste para agregar 1 U/mL de sustrato se realizó de la siguiente manera.

$$P_1 = \frac{(1 U)(1 \text{ mL de medio de reacción})}{X_1}$$

$$Y = (P_1)(V)$$

Donde:

X_1 = unidades iniciales por mL en el concentrado enzimático original

P_1 = mL de concentrado enzimático a agregar al medio de reacción

Y = Volumen a agregar de filtrado enzimático al medio de reacción

V = Volumen de medio de reacción (95 mL)

4.14 Determinación de la liberación de pectina de la cáscara de limón por acción enzimática

En matraces Erlenmeyer de 250 mL, uno por cada concentrado enzimático, se agregaron 100 mL de suspensión de cáscara de limón al 3% disuelto en buffer de acetatos pH 5, se agregó a cada uno 1 U/mL de sustrato y se incubaron a 25°C a 50 rpm por 3 horas. Pasado el tiempo de incubación se filtró con papel filtro Whatman #1 a peso constante, se lavó el sólido con 50 mL de etanol al 96%.

Posteriormente, se llevó a peso constante el papel filtro con el sólido filtrado y se determinó también el volumen final del filtrado.

El ajuste para agregar 1 U/mL de sustrato se realizó de la siguiente manera.

$$Y = (P_1)(V)$$

$$P_1 = \frac{(1 U)(1 \text{ mL de medio de reacción})}{X_1}$$

Donde:

X_1 = unidades iniciales por mL en el concentrado enzimático original

P_1 = mL de concentrado enzimático a agregar al medio de reacción

Y = Volumen a agregar de filtrado enzimático al medio de reacción

V = Volumen de medio de reacción (100 mL)

Para obtener el porcentaje de pérdida de peso, se realizó el siguiente cálculo

$$P_{RM} = (Mm + P_{PF}) - P_{PF}$$

$$\% \text{ Pérdida de peso} = 100\% - \frac{(100)}{P_{RB}}(P_{RM})$$

Donde:

P_{RM} = Peso Residual de la Muestra

Mm = Masa de la muestra

P_{PF} = Peso del papel filtro

P_{RB} = Peso residual del blanco

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Efecto del pH en la producción enzimática en fermentación por lote con diferentes fuentes complejas de carbono

En esta fermentación se utilizaron como fuentes de carbono olote de maíz, cáscara de limón y salvado de trigo; el propósito primordial de esta fermentación fue determinar qué cantidad de actividad enzimática exopectinolíticas y xilanolíticas esperar de cada cepa. A los medios de Olote de Maíz y Salvado de Trigo el pH inicial del medio se ajustó a pH 6 y los medios con cáscara de limón a pH 4.2. Estos pH fueron elegidos, ya que son los más cercanos al pH basal de las fuentes complejas de carbono utilizadas.

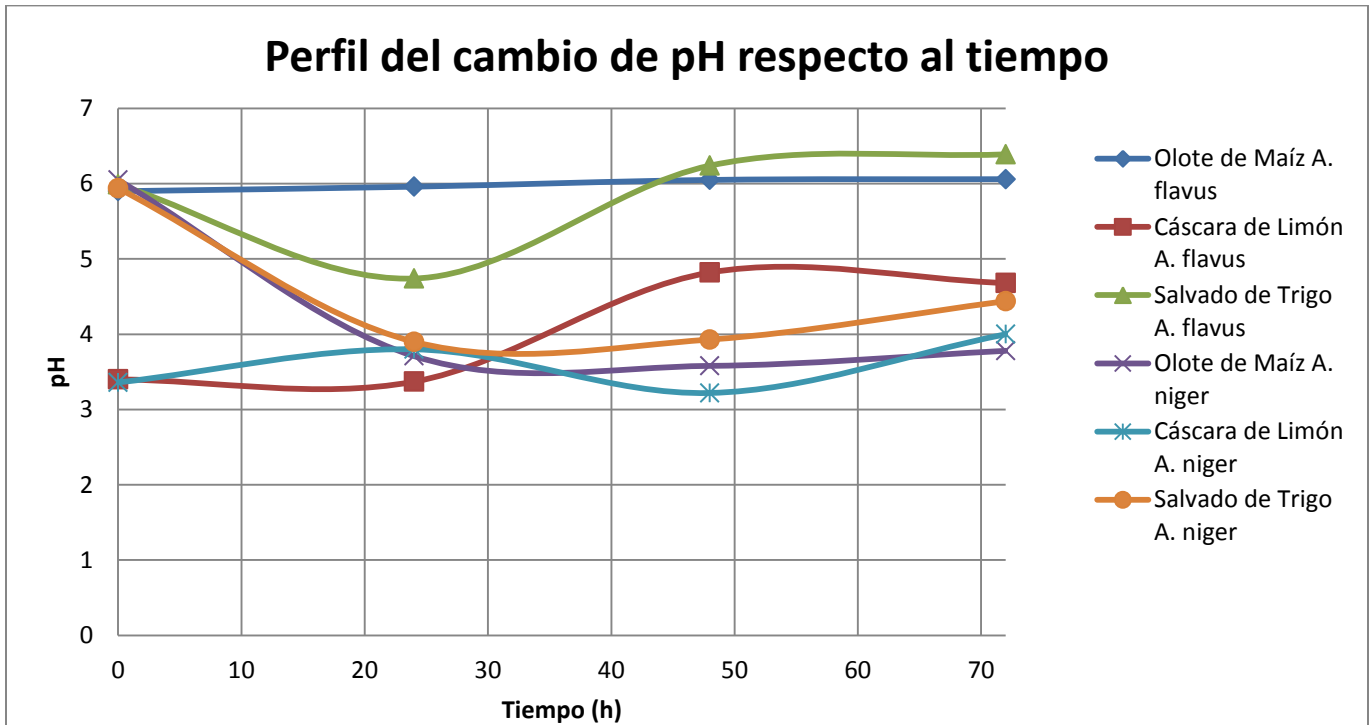


Figura 11: Perfil de pH con respecto al tiempo en la cinética de producción de actividad enzimática, en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada, para las dos cepas *A. flavus* CECT-2687 y *A. niger* N-402.

En la figura 11 se puede observar que el pH de los medios inoculados con *A. flavus* CECT-2687, como se puede observar, primero se acidifica para posteriormente basificarse, después de lo cual el pH se mantiene relativamente estable. En el olote de maíz el pH prácticamente no cambió y se estabilizó,

desde las 48 horas de fermentación, en pH 6. Para cáscara de limón el pH a las 48 horas es de 4.8, para después mantenerse estable. En salvado de trigo, a las 24 horas es cuando se encuentra el mayor descenso del mismo llegando a 4.7, las siguientes 36 horas el pH llegó a 6.3 y se mantuvo constante.

Por otro lado, en el caso de *A. niger* N-402 se puede observar que para olote de maíz y salvado de trigo el pH desciende aproximadamente dos unidades, una posible explicación para este comportamiento es que la fuente de nitrógeno en el medio es sulfato de amonio, metabólicamente es imposible reducir más el nitrógeno del medio, ya que es amonio, y los ácidos liberados por acción enzimática no son utilizados en la reducción del mismo, por lo que se acumulan en el medio y esto se manifiesta en el descenso del pH. Seguidamente, en el caso de cáscara de limón se puede observar que el pH se estabiliza alrededor de 4. Esto se debe a que el microorganismo empieza a consumir los monómeros que se produjeron por medio de las enzimas secretadas para la degradación de polímeros de pared celular vegetal.

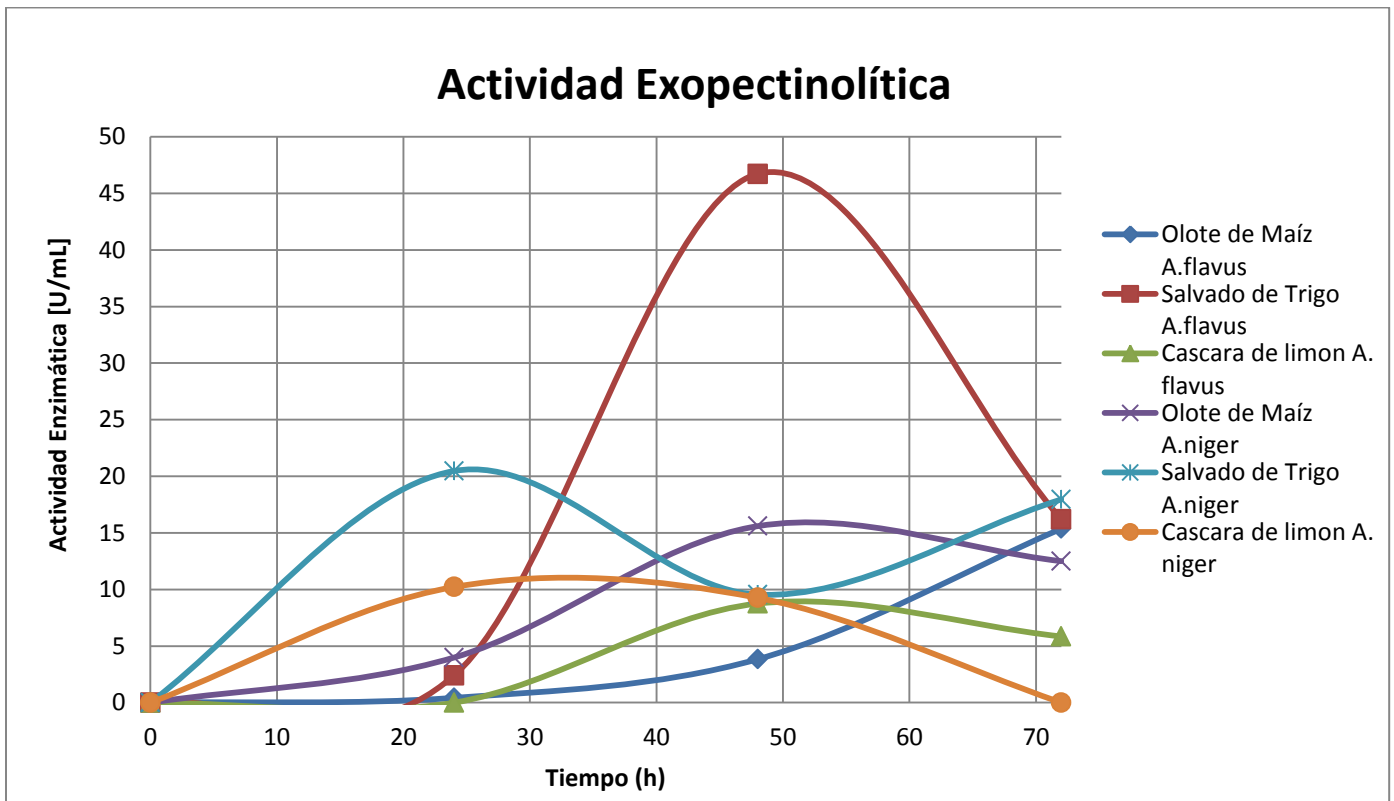


Figura 12: Cinética de producción de la actividad exopectinolítica en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada, para las dos cepas *A. flavus* CECT-2687 y *A. niger* N-402.

La figura 12 muestra la actividad exopectinolítica que se presentó para la cepa *A. niger* N-402 se encontraba entre las 20 y las 10 U/mL, para olote de maíz presentó su máxima actividad a las 48 horas de fermentación, con un valor de 15.6 U/mL, por otro lado salvado de trigo y cáscara de limón, tuvieron sus máximos a las 24 horas de fermentación, con 20.5 U/mL y 10.2 U/mL. En cambio la cepa *A. flavus* CECT-2687, presentó la mayor actividad exopectinolítica de ambas cepas, a las 48 horas con salvado de trigo con 46.7 U/mL, olote de maíz tuvo la mayor actividad a las 72 horas de fermentación, aunque sólo mostró 16.2 U/mL. Finalmente cáscara de limón a las 48 horas mostró su punto más alto con sólo 9.3 U/mL.

Se esperaba que, para ambas cepas, en cáscara de limón se exprese más este tipo de actividad, ya que esta fuente de carbono es el que contiene mayor concentración de pectina en su estructura, sin embargo salvado de trigo fue el que mostró la mayor actividad tanto para *A. niger* N-402, como para *A. flavus* CECT-2687.

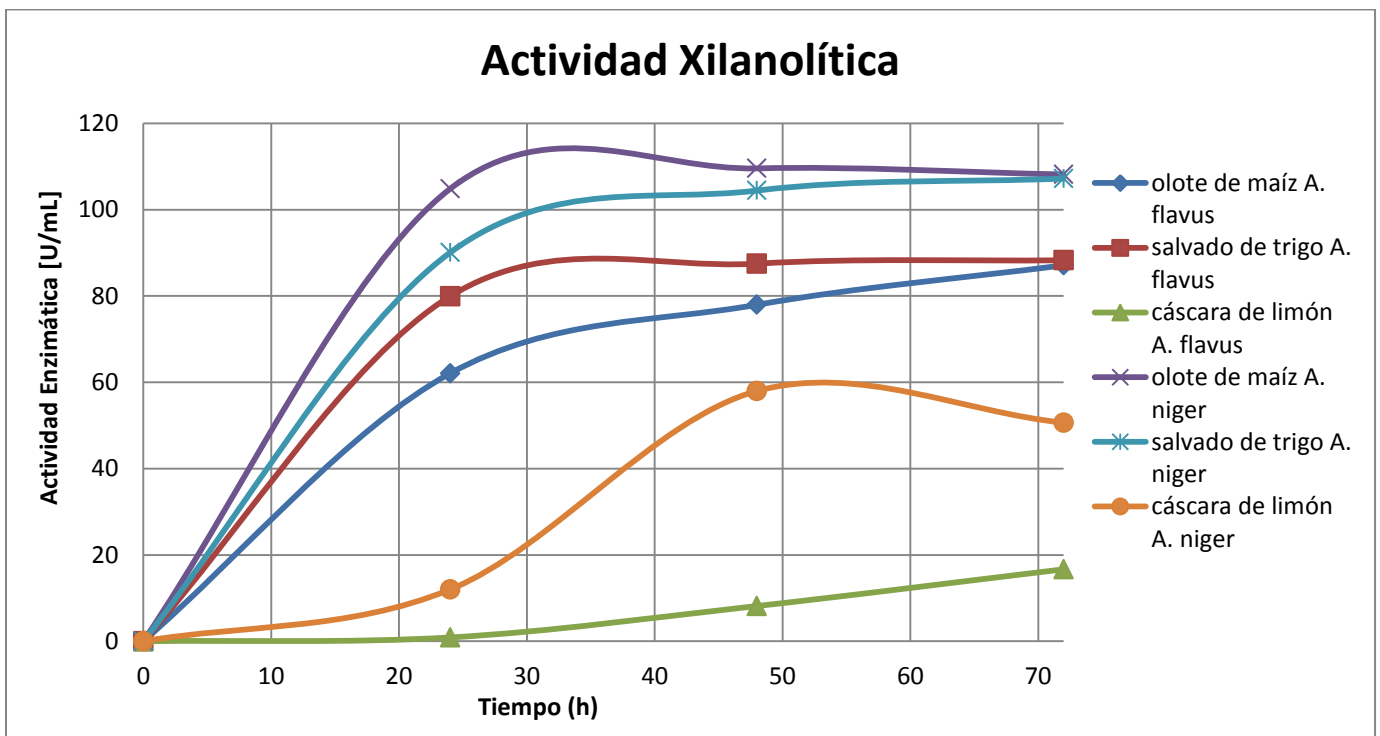


Figura 13: Cinética de producción de actividad xilanólica en la primera fermentación en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada, para las dos cepas *A. flavus* CECT-2687 y *A. niger* N-402.

En la figura 13, se puede observar que la actividad xilanolítica en ambas cepas, es decir *A. flavus* CECT-2687 y *A. niger* N-402, se expresa considerablemente más que la actividad exopectinolítica. En los medios más ricos en xilano, como el olote de maíz y el salvado de trigo, la expresión de este tipo de enzimas se induce más, lo que se traduce en que la actividad es casi 5 veces mayor que en el medio con menor concentración de xilano en el medio, es decir cáscara de limón.

Para *A. flavus* CECT-2687, el salvado de trigo fue el que presentó la mayor actividad con 88.3 U/mL, seguido de olote de maíz con 87.2 U/mL. Para el caso de *A. niger* N-402 fue al revés, es decir, con olote de maíz presentó una actividad de 108.2 U/mL y con salvado de trigo 107.2 U/mL. Sin embargo, ambas cepas con cáscara de limón presentaron una actividad mucho más baja, para *A. flavus* CECT-2687 la actividad obtenida fue de 16.7 U/mL y para *A. niger* N-402 50.6 U/mL, esto se esperaba ya que, en la cáscara de limón la presencia de xilano, no es especialmente abundante.

Tanto para olote de maíz como para salvado de trigo a las 72 horas de la fermentación, ambas cepas presentaron una actividad semejante, esto podría indicar que la fuente de carbono no influye en la producción de xilanasas, siempre y cuando el xilano que esté presente en el medio sea suficiente para inducir la producción de las enzimas.

5.2 Efecto del tipo de fuente compleja o simple de carbono en la producción enzimática en fermentación por lote

En esta fermentación se utilizaron las 3 fuentes de carbono pero en diferentes grados de pureza y polimerización, es decir la fuente pura y sin polimerizar (ácido galacturónico, glucosa, xilosa), los polímeros aislados y puros (pectina cítrica y xilano de abedul) y los polímeros en estructuras complejas (cáscara de limón, salvado de trigo y olote de maíz). La principal finalidad de esta fermentación, era observar el efecto que tiene el grado de pureza y polimerización de la fuente de carbono en la producción de enzimas de los dos hongos.

El grado de pureza puede afectar la inducción de la secreción enzimática, ya que los hongos al ser auxótrofos, necesitan de exoenzimas para obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo, así mismo la expresión de las enzimas secretadas depende de los nutrientes presentes en el medio.

Para facilitar la exposición de los datos se dividirán por cepas. Además otro punto a destacar es, que en esta fermentación se estableció pH 6 inicial en todos los medios.

5.2.1 Resultados obtenidos con *A. flavus* CECT-2687

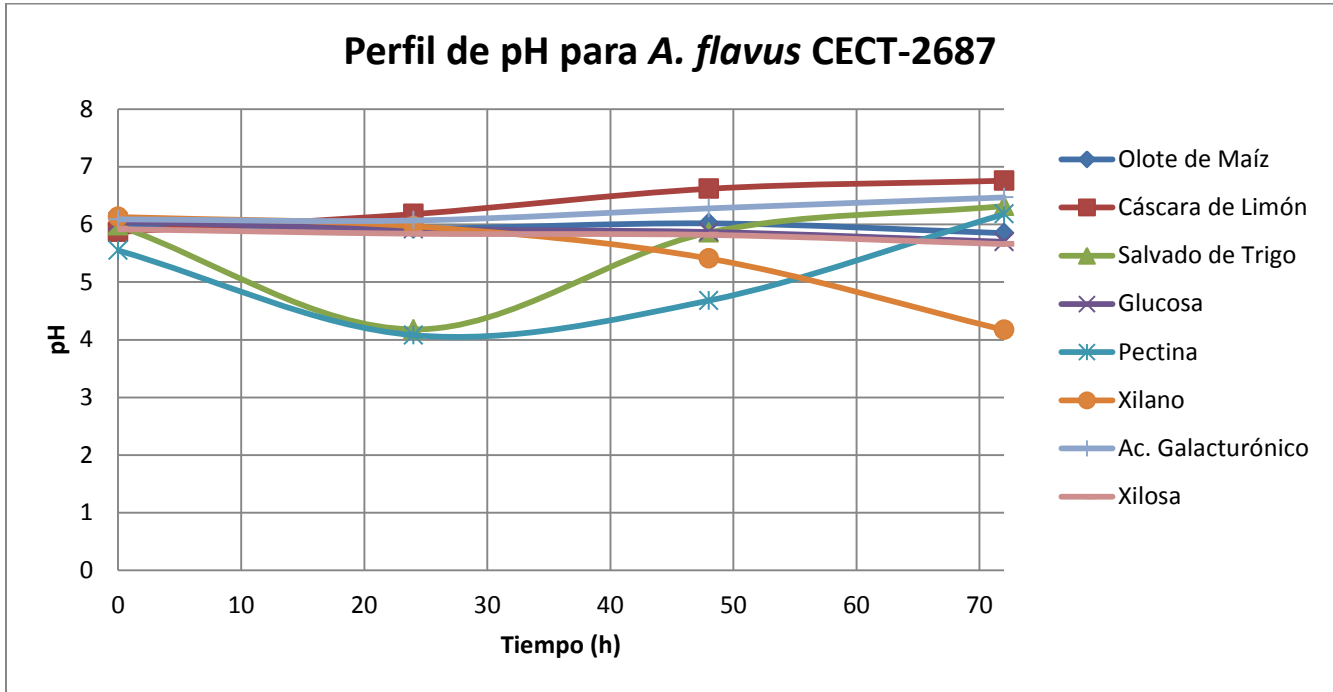


Figura 14: Perfil de pH con respecto al tiempo de la cinética de actividad enzimática, en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada para *A. flavus* CECT-2687.

Como se puede observar en la figura 14, la cáscara de limón fue el medio que más se alcalinizó, llegando hasta 6.8. Se debe destacar que en el caso de la pectina y el salvado de trigo, los medios en las primeras 24 horas de fermentación presentaron un descenso del pH cercano a 4, esto se puede explicar a que por acción enzimática se ha aumentado la concentración de monómeros ácidos en el medio, como ya se había mencionado antes, por lo que se observa el descenso del pH. El xilano fue el que más se alejó de la tendencia final de todos los medios, ya que presentó, a las 72 horas, el mayor descenso de pH llegando hasta 4.2.

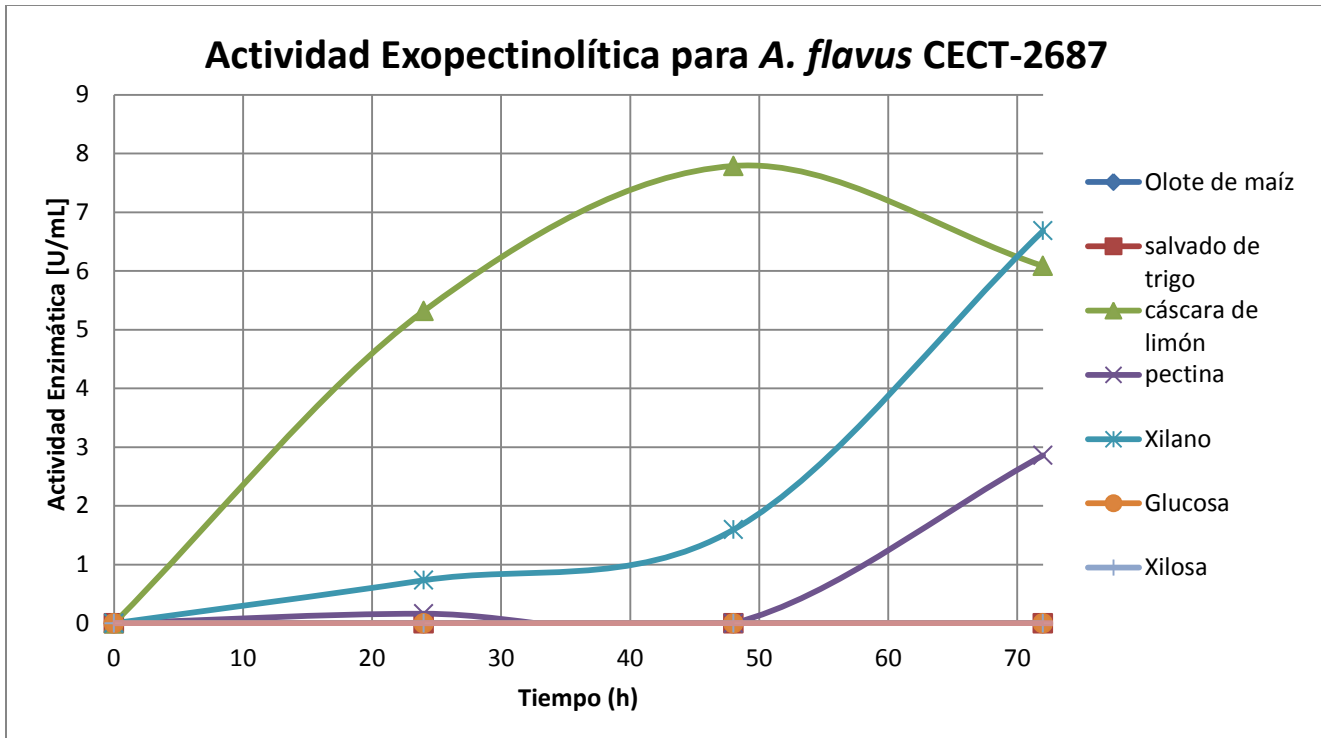


Figura 15: Cinética de producción actividad pectinolítica con respecto al tiempo, en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada para *A. flavus* CECT-2687.

La actividad exopectinolítica en olote de maíz, salvado de trigo, glucosa, xilosa y ácido galacturónico fue despreciable. En el caso de los monómeros, es decir glucosa, xilosa y ácido galacturónico, era un resultado esperado, ya que se ha observado que el género *Aspergillus* al encontrarse en medios con fuentes simples de carbono, presenta prácticamente nula actividad enzimática. (Samson, et al., 2006). Sin embargo, en el caso de olote de maíz y salvado de trigo, que no son fuentes simples de carbono, nos lleva a pensar que el microorganismo optó por sintetizar distinto tipo de enzimas, para la degradación de polímeros y la posterior asimilación de los mismos.

La cascará de limón presentó, una buena actividad pectinolítica 7.7 U/mL, alcanzando su punto máximo a las 48 horas de iniciada la fermentación. En el caso contrario, el xilano alcanzó su punto máximo de actividad a las 72 horas con 6.6 U/mL, cabe recalcar que para esta fuente de carbono no se esperaba actividad pectinolítica, sin embargo se presentó. Para la pectina a las 72 horas alcanzó su máximo, 2.8 U/mL, el resultado fue un poco sorprendente, ya que se esperaba una mayor actividad; lo

anterior lleva a pensar que la expresión de los genes con el polisacárido en forma pura y aislándose de una estructura celular tan compleja, como lo es la pared celular vegetal, no se ve muy estimulada.

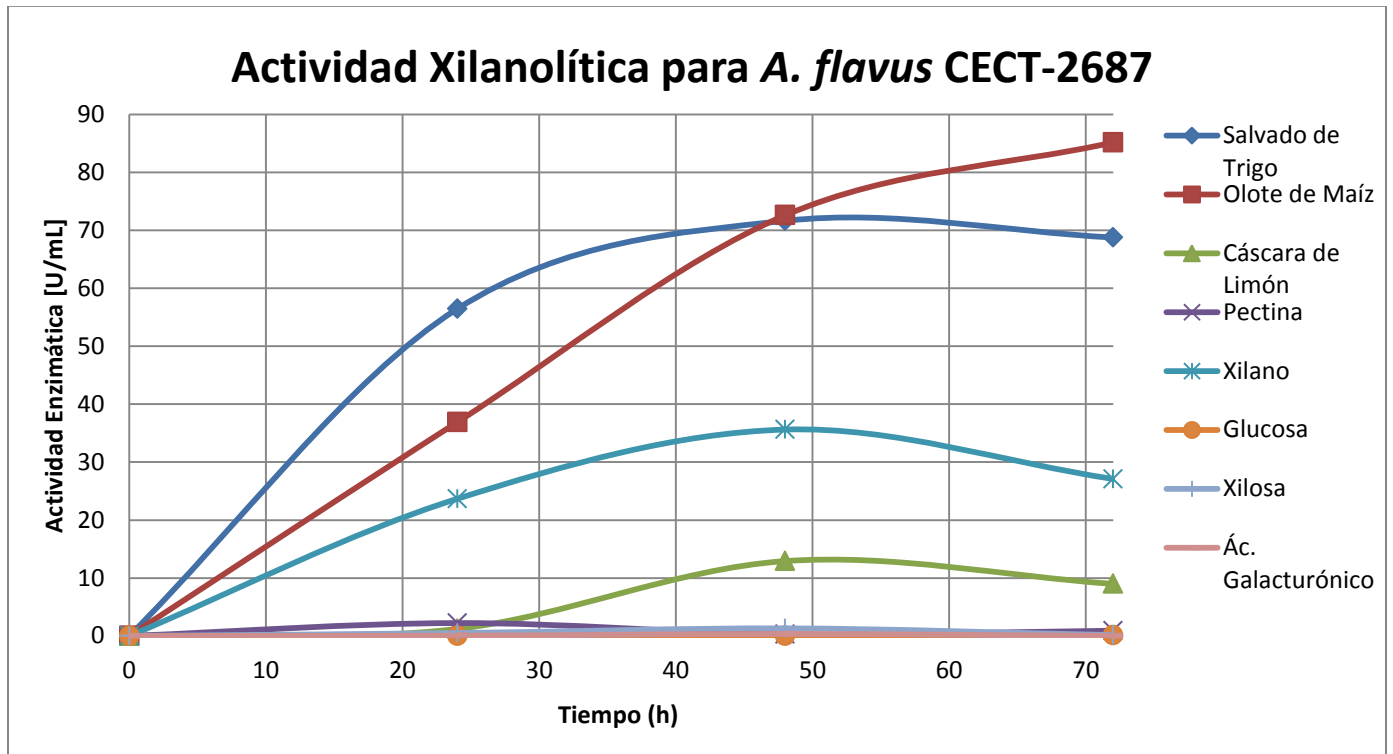


Figura 16: Cinética de producción de la actividad xilanólica con respecto al tiempo en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada para *A. flavus* CECT-2687.

La actividad xilanólica de la segunda fermentación para *A. flavus* CECT-2687, como en el caso anterior los monómeros no presentaron actividad, reforzado lo que ya se había mencionado de que el género *Aspergillus* al encontrarse en medios con fuentes simples de carbono se inhibe su expresión de las enzimas enfocadas en la degradación de polímeros de pared celular vegetal.

La mayor actividad xilanólica se presentó a las 72 horas para el olote de maíz con 85.1 U/mL, como era de esperarse por la presencia de las relativamente altas concentraciones de xilano en esta fuente de carbono. El segundo valor más alto, se presentó a las 48 horas en el salvado de trigo, con 71.65 U/mL. Xilano ocupó el tercer lugar en producción de enzimas xilanolíticas con un máximo a las 48 horas

de 35.62 U/mL. La cáscara de limón tuvo su máximo a las 48 horas con 12.9 U/mL, este fue un valor que entraba dentro de lo esperado, debido la cantidad de Xilano presente en el mismo.

5.2.2 Resultados obtenidos con *A. niger* N-402

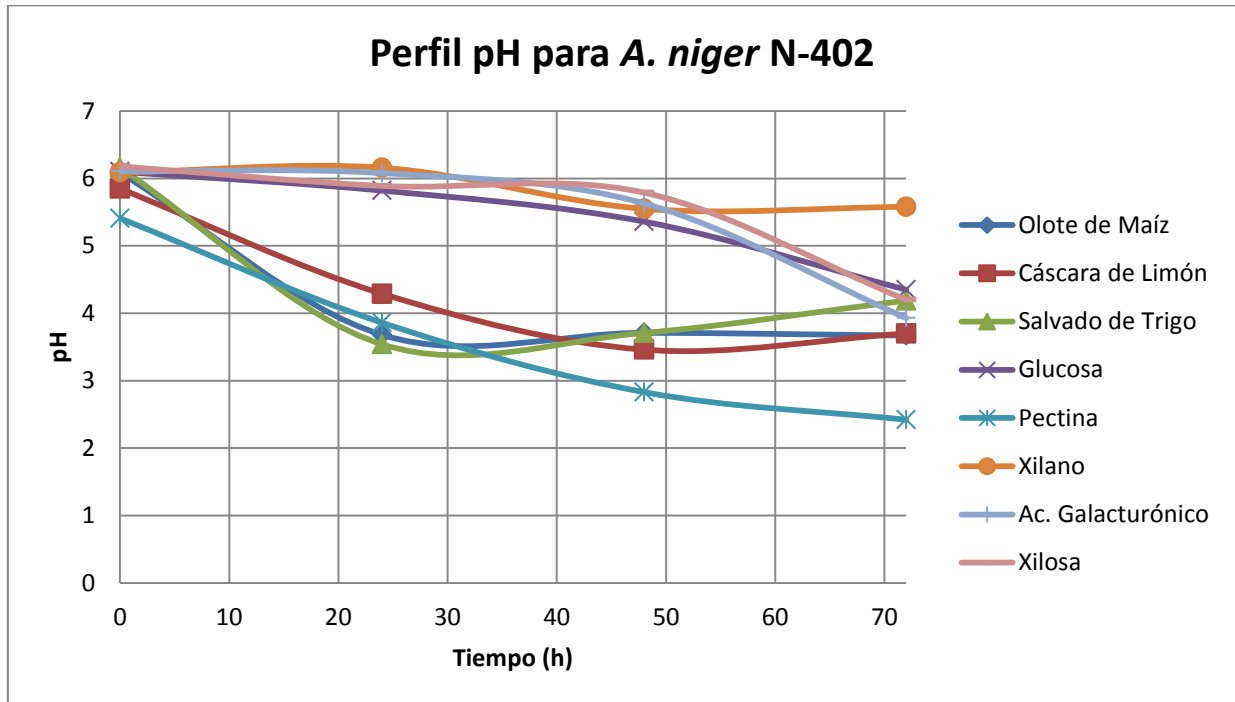


Figura 17: Perfil de pH de la cinética producción de actividad enzimática, en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada para *A. niger* N-402.

El pH, como ya se había mencionado anteriormente, con esta cepa generalmente se acidifica con el paso del tiempo. Como se puede observar el pH inicial de los medios se ajustó a 6, el medio que más acidificó y con mayor rapidez fue el de pectina y era de esperarse, ya que al degradarse este polímero se da la liberación del monómero del mismo, es decir, el ácido galacturónico.

Sin embargo, también se puede observar que el pH de los medios con fuentes de carbono siguientes: glucosa, xilano, ácido galacturónico, xilosa; el pH a las 24 horas se mantiene prácticamente igual al inicial, y para las 48 horas estas sufren un ligero descenso del mismo, para posteriormente, a las 72 h baja alrededor de 4.2. Esto se puede deber a que, ya que el hongo se encuentra en fase log, sólo la

consume fuente simple de carbono y a partir de las 48 horas se empiezan a producir metabolitos secundarios que podrían acidificar el medio.

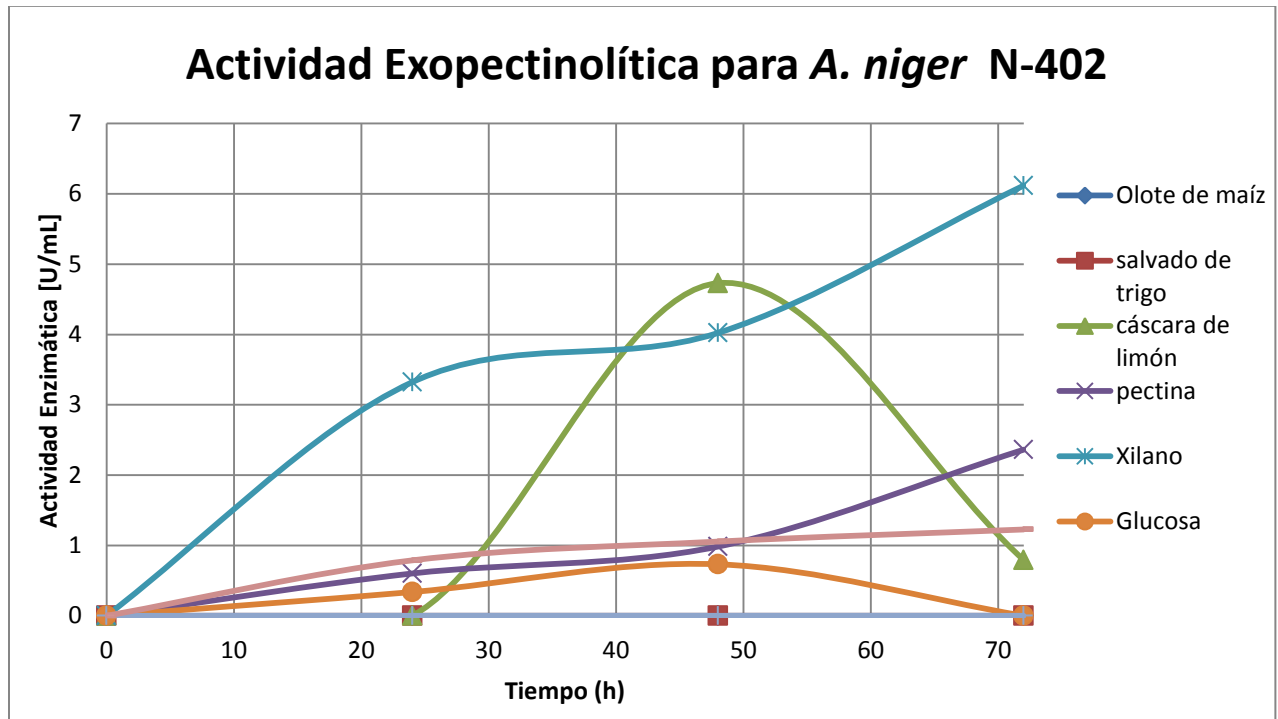


Figura 18: Cinética de producción de la actividad pectinolítica con respecto al tiempo, en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada para *A. niger* N-402.

La actividad para *A. niger* N-402, siempre es más alta, tanto xilanolítica, como pectinolítica. En el caso particular de esta cepa, la mejor actividad, se presentó con xilano a las 72 horas con 6.11 U/mL, aunque se esperaba que la mayor actividad se presentara en la cáscara de limón que tuvo su mayor actividad a las 48 horas con una actividad de 4.8 U/mL, lo que representa 1.3 veces menos actividad que el medio con xilano como fuente de carbono.

Aunque se debe de recalcar que la escala de la actividad es muy pequeña, sólo de 0 a 7 U/mL, por lo que realmente no es tan grande la diferencia de actividad.

Otro dato que resalta es que en la pectina tuvo una actividad máxima de 2.3 U/mL a las 72 horas y para el ácido galacturónico es de 1.2 U/mL lo que hace suponer que el hongo tiene preferencia por otras fuentes de carbono, como el olote de maíz.

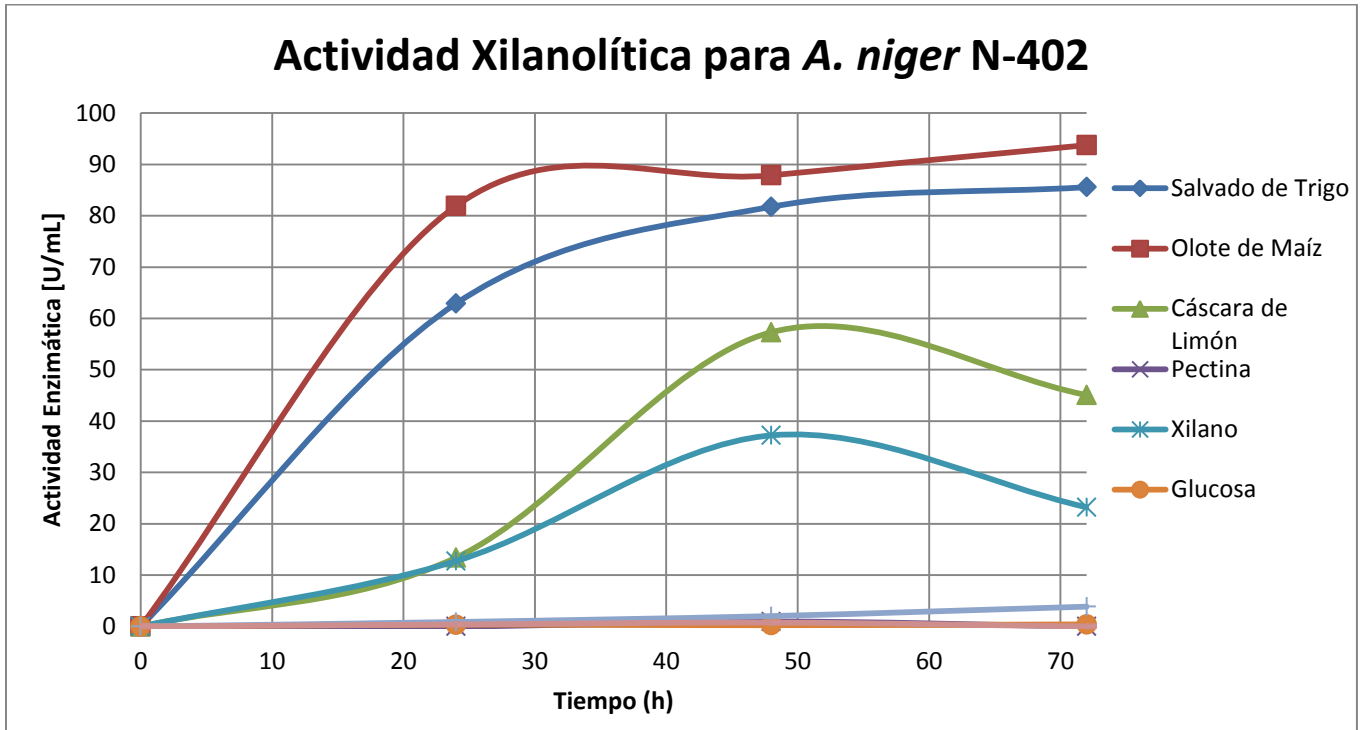


Figura 19: Cinética de producción de la actividad xilanólica con respecto al tiempo, en medio basal con 1% p/v de la fuente de carbono seleccionada para *A. niger* N-402.

La mayor actividad xilanólica para la cepa *A. niger* N-402 se produjo en el medio con olote de maíz, como fuente de carbono, con 93.74 U/mL en las 72 horas de fermentación seguido de salvado de trigo con 85.6 U/mL, en estas dos fuentes de carbono se observan tendencias bastante parecidas, ya que en las primeras 24 horas de fermentación alcanzan prácticamente la actividad que presentarán al final de la misma, en la siguientes 48 horas suben unas cuantas unidades de actividad enzimática más.

En cambio, para cáscara de limón y xilano se observó la misma curva con sus respectivos máximos a las 48 horas 57.31 U/mL y 37.22 U/mL. Como se puede observar, el xilano sí induce la producción de enzimas xilanolíticas, no así la pectina para la producción de pectinasas, como se puede observar en la figura 18. Nuevamente, los monómeros indujeron actividad de xilanasas o pectinasas.

5.3 Efecto del tipo de cáscara de limón y de su tratamiento en la producción enzimática en fermentación por lote

Esta fermentación tuvo como objetivo, observar el efecto de producción enzimática, con 2 diferentes lotes de cáscara de limón. El primer lote, que se había utilizado en todos los experimentos anteriores, era cáscara de limón agrio o también conocido como cáscara de limón mexicano y ésta se encontraba deshidratada, triturada y sin lavar con etanol al 70% (v/v). El segundo lote era cáscara de limón tipo persa, ésta fue lavada con etanol al 70% (v/v) y consecutivamente fue deshidratado y triturado.

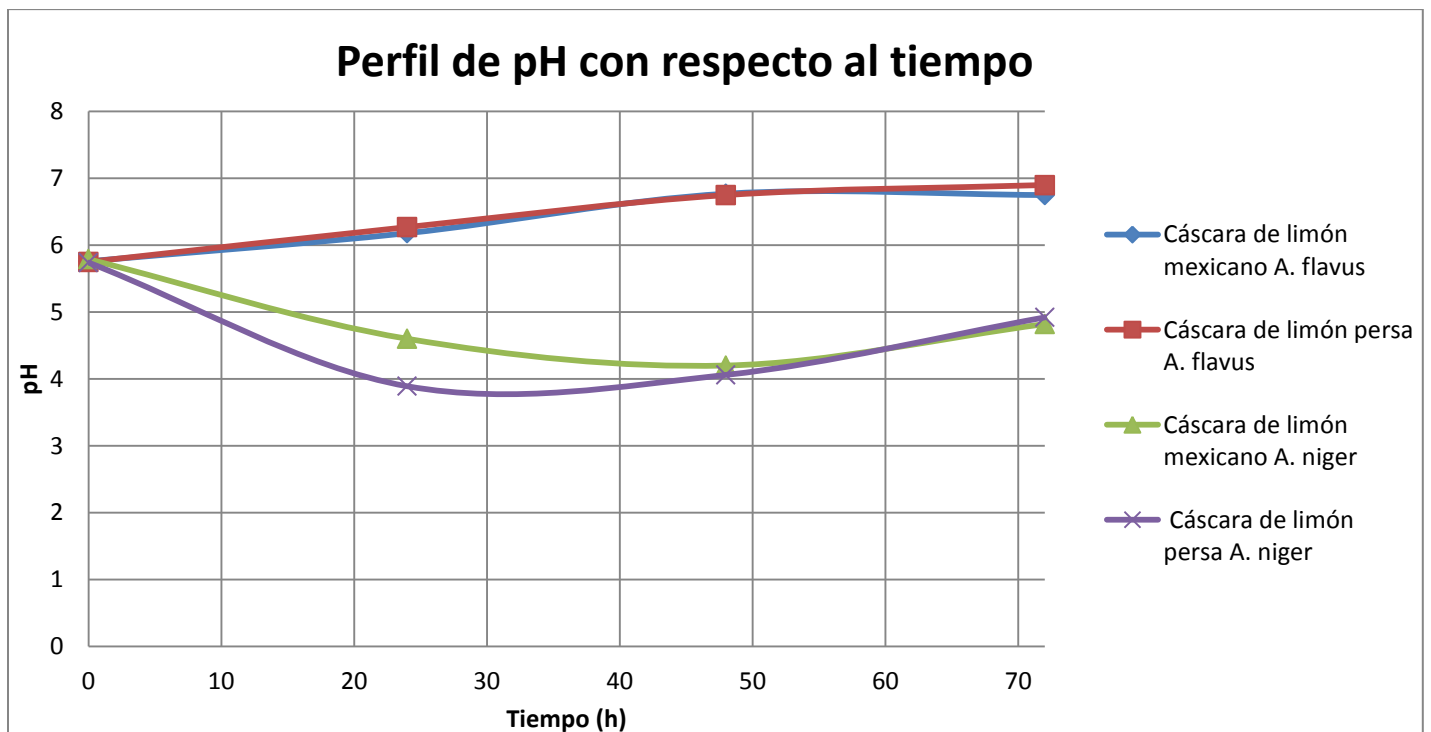


Figura 20: Perfil de pH de la cinética de producción de actividad enzimática, en medio basal con 1% p/v de los dos diferentes lotes de cáscara de limón para *A. niger* N-402 y *A. flavus* CECT-2687.

Como se puede observar en la figura 20, el pH se mantuvo prácticamente igual en ambos casos, la mayor diferencia se puede observar a las 24 horas de fermentación con la cepa *A. niger* N-402, ya que la cáscara de limón persa llegó a pH 3.9, mientras que con cáscara de limón mexicano el pH fue de 4.6. Para el caso de *A. flavus* CECT-2687 el pH se mantuvo igual durante toda la fermentación con ambos lotes de cáscara de limón, lo que lleva a pensar que mientras la fuente de carbono sea la misma el pH del medio tendrá el mismo comportamiento.

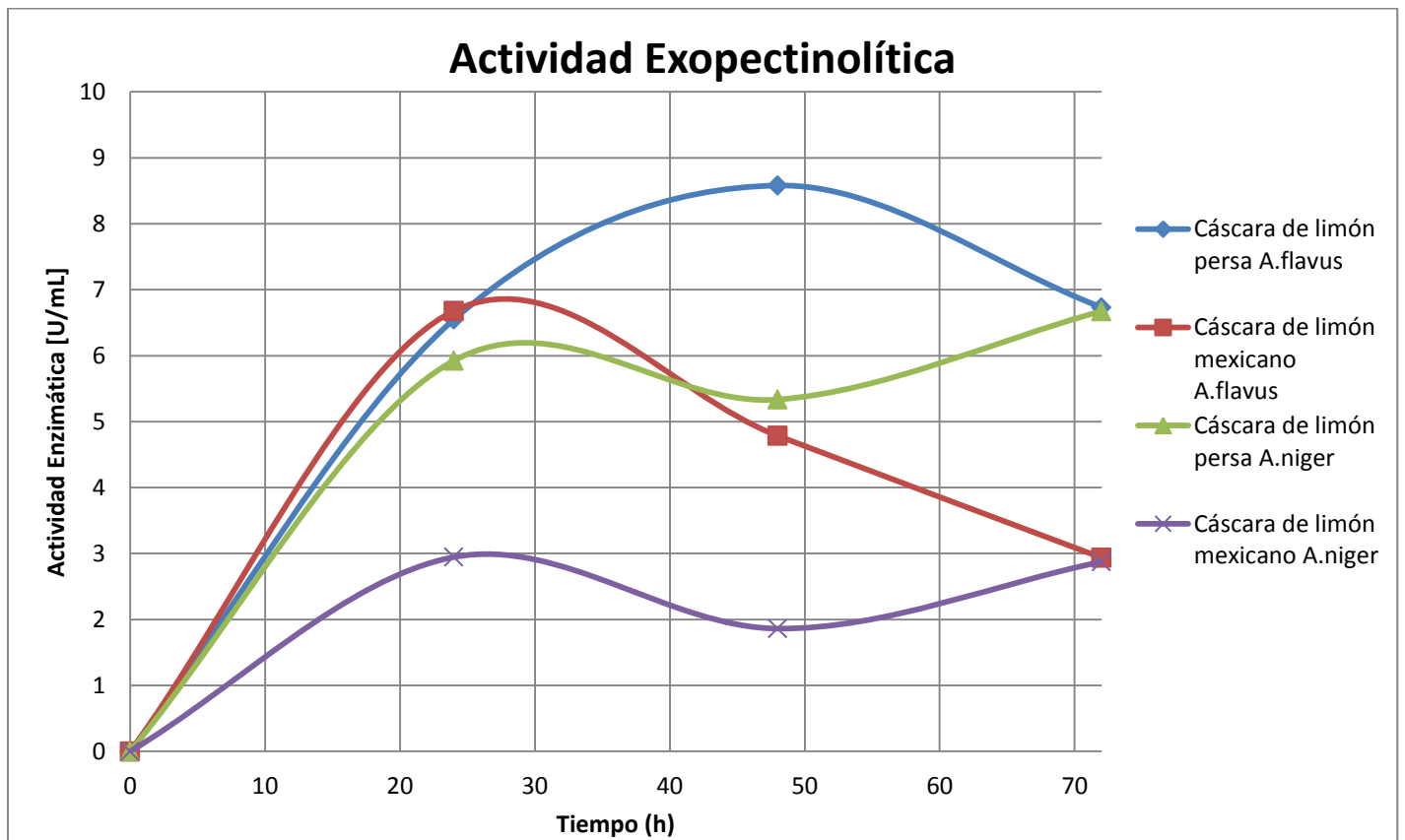


Figura 21: Cinética de producción de la actividad exopectinolítica con respecto al tiempo, en medio basal con 1% p/v con los 2 lotes de cáscara de limón, para *A. niger* N-402 y *A. flavus* CECT-2687.

La actividad para el lote de limón persa, en ambas cepas aumenta, esto se puede deber a que con el tratamiento previo que se le dio a este lote, se facilita el acceso a las fuentes de carbono o se induce mejor la secreción de enzimas al medio. La máxima actividad se presentó para *A. flavus* CECT-2687 a

las 48 horas con 8.6 U/mL y para *A. niger* N-402 la máxima se presentó a las 72 horas con 6.6 U/mL, con la cáscara de limón persa para ambas cepas. La pérdida de actividad que se presentó en todos los casos a las 48 horas, en el caso de la cáscara de limón mexicano para ambas cepas y el limón persa para *A. niger* N-402, y a las 72 horas en el caso del limón persa para *A. flavus* CECT-2687, puede deberse a que el microorganismo a entrado en fase de muerte celular, por lo que la secreción de enzimas disminuye, a si como también la inactivación de las mismas. Un dato a destacar, es que tanto *A. flavus* CECT-2687 como *A. niger* N-402 tienen el mismo valor final de actividad enzimática para los dos lotes de limón. Esto se puede explicar por medio de que la fuente de carbono presente en el medio tenía el mismo tratamiento previo.

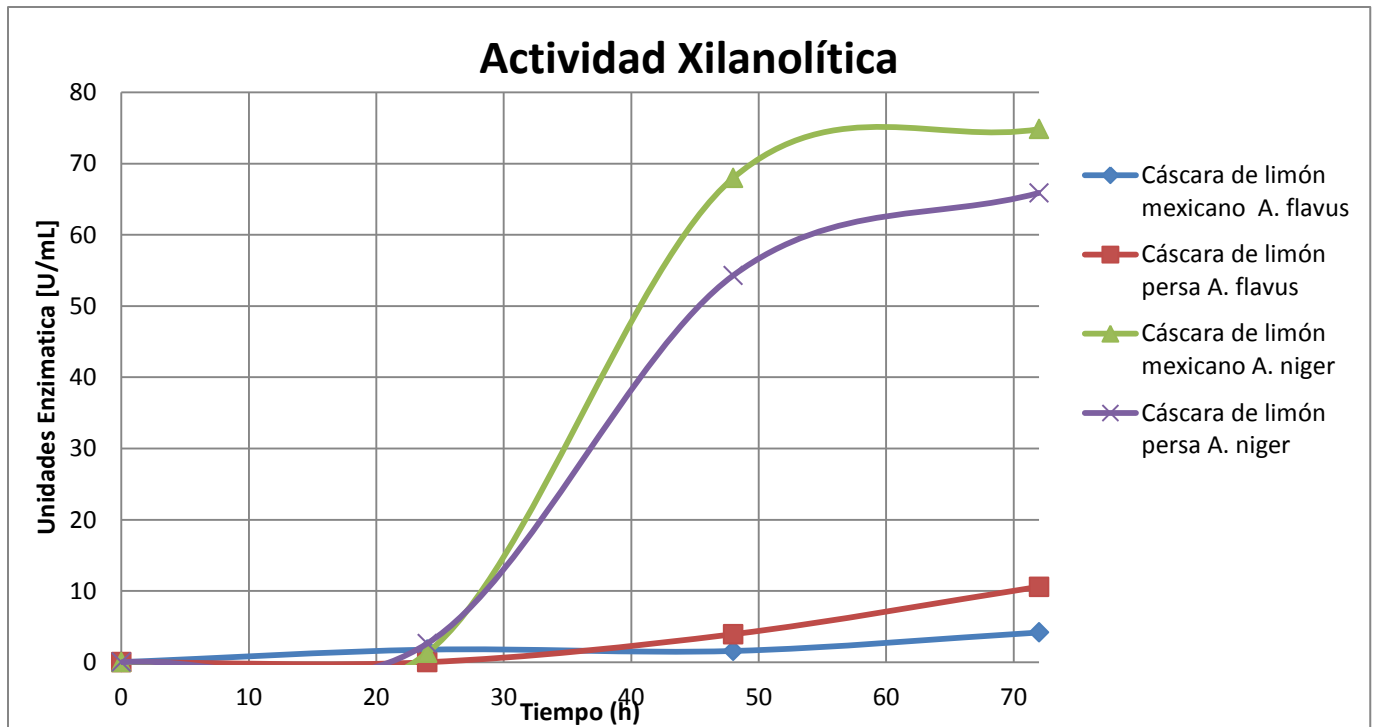


Figura 22: Cinética de producción de actividad exopectinolítica con respecto al tiempo, en medio basal con 1% p/v con los 2 lotes de cáscara de limón, para *A. niger* N-402 y *A. flavus* CECT-2687.

La actividad xilanolítica para *A. flavus* CECT-2687, como se ha observado anteriormente, es deficiente, el valor máximo se obtuvo a las 72 horas con 11 U/mL con la cáscara de limón persa. Las dos cepas presentan el mismo comportamiento frente a las dos diferentes fuentes de carbono con una diferencia de cinco unidades enzimáticas actividad xilanolítica. Por lo observado en los datos pasados, se decidió seguir con el segundo lote de cáscara de limón, es decir el limón persa con tratamiento previo, para la

fermentación en la que se daría la producción en masa de enzimas, para la posterior realización de zimogramas, geles de electroforesis y concentrados enzimáticos.

5.4 Producción en masa de enzimas por fermentación por lote

Esta fermentación, tuvo como finalidad la producción de mayores volúmenes de enzimas, para su caracterización posterior. Para tal efecto se eligieron los sustratos que presentaron mayor actividad tanto xilanólica, como pectinolítica. Se realizó una fermentación con cáscara de limón persa y olote de maíz, para ambas cepas utilizando 4 matraces para cada condición. Los filtrados obtenidos se analizaron y a partir de ellos se prepararon los concentrados para realizar el análisis por medio de los geles de SDS-PAGE y zimogramas y la caracterización de los mismos. Se incubaron 4 matraces con cáscara de limón u olote de maíz al 1% con cada cepa, lo que nos da una totalidad de 16 matraces, se incubaron a 37°C con 300 rpm, por 72 horas, en esta fermentación no se realizaron muestreos, para no disminuir el volumen final de los medios. Sólo se muestreó el tiempo cero y el final de cada matraz, para control.

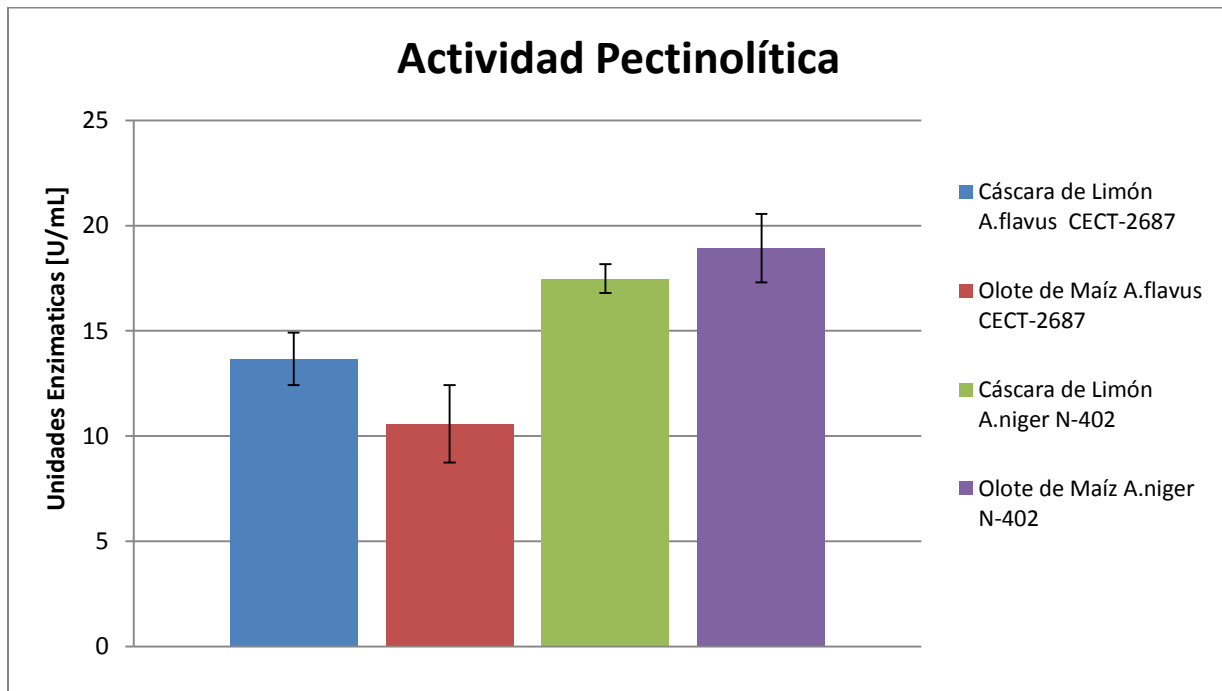


Figura 23: Promedio de la actividad exopectinolítica con las dos diferentes fuentes complejas de carbono al 1% p/v en medio basal para *A. niger* N-402 y *A. flavus* CECT-2687.

Como se puede ver en la figura 23, la actividad promedio para la cepa *A. flavus* CECT-2687 para la cáscara de limón con 13.7 U/mL y para olote de maíz fue 10.6 U/mL. Resultado que se esperaba, ya que por todos los experimentos anteriores, se había determinado que la mejor actividad se presenta con la cáscara de limón.

Así mismo, para *A. niger* N-402, la mejor actividad pectinolítica con 18.9 U/mL fue en olote de maíz, este comportamiento, también era esperado, ya que la mejor actividad es en esta fuente de carbono. Para cáscara de limón la actividad pectinolítica promedio fue de 17.5 U/mL.

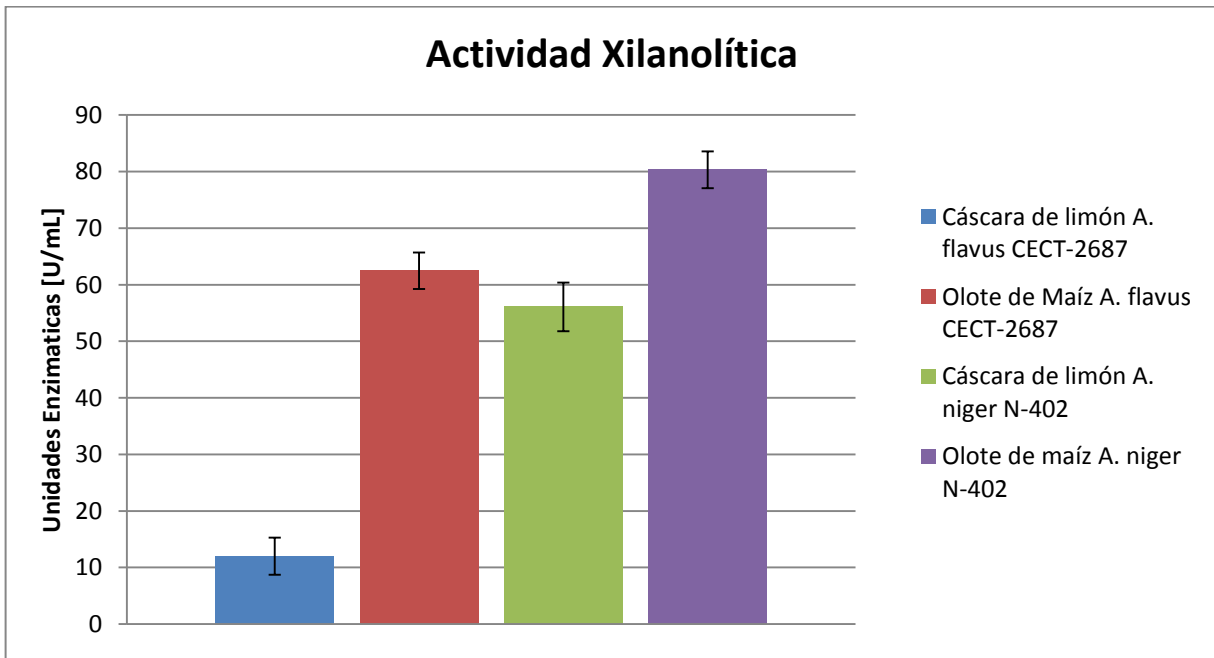


Figura 24: Promedio de la actividad xilanolítica con las dos diferentes fuentes complejas de carbono al 1% p/v en medio basal, para *A. niger* N-402 y *A. flavus* CECT-2687.

En la figura 24, en ambas cepas, *A. flavus* CECT-2687 y *A. niger* N-402, la cáscara de limón presenta la actividad xilanolítica menor, 12 U/mL y 56 U/mL respectivamente, resultados que ya se tenían previstos, por los anteriores resultados. La actividad xilanolítica predominante, con olote de maíz, para *A. flavus* CECT-2687 fue de 62.5 U/mL y para *A. niger* N-402 de 80.3 U/mL.

5.5 Análisis de los perfiles electroforéticos

Para analizar los concentrados enzimáticos, se corrieron geles de SDS-PAGE al 10%, cada poso se cargó con 5 μ L de concentrado enzimático y 5 μ L de buffer de carga. Se cargaron 3 series de las muestras, la primera se utilizó para la visualización de las bandas de proteína constitutivas de los concentrados enzimáticos. El segundo y el tercer gel fueron tratadas para observar las bandas de actividad pectinolítica y xilanolítica, es decir, se elaboraron zimogramas de actividad *in situ*.

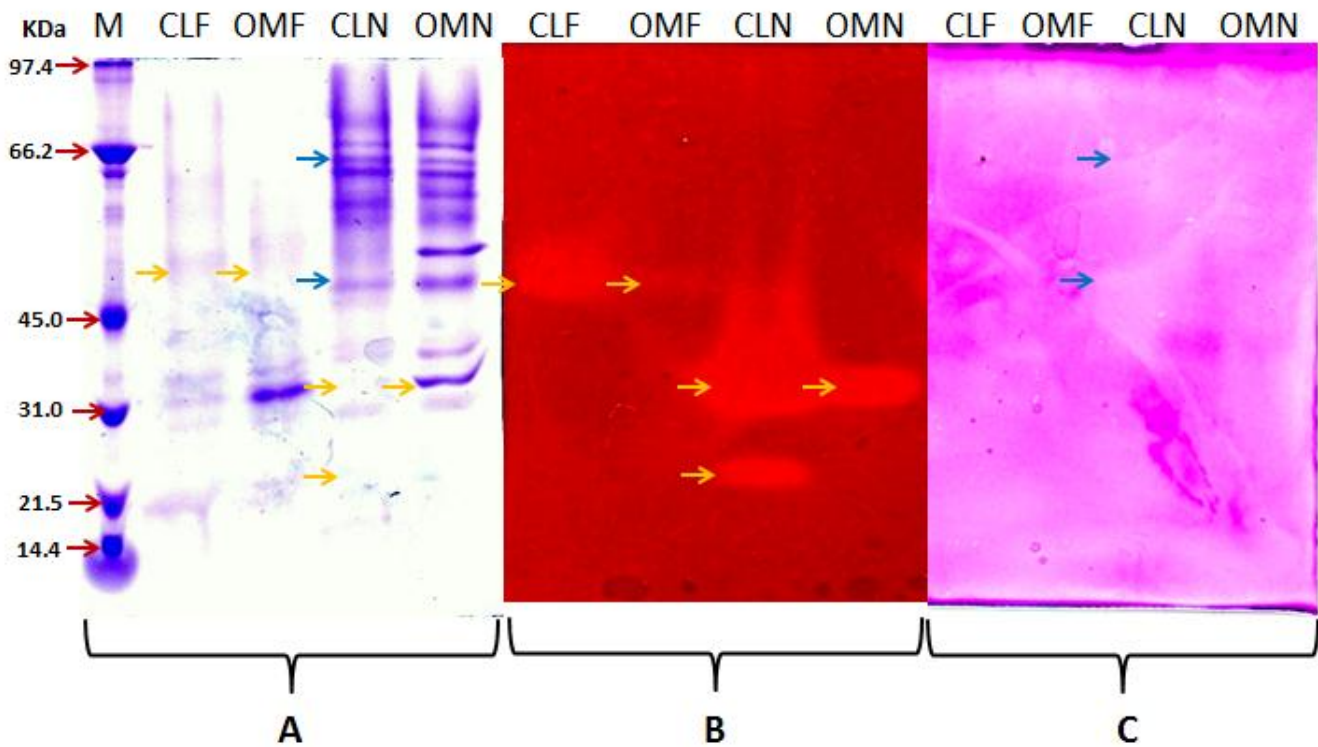


Figura 25. Geles SDS-PAGE. **A)** Electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. **B)** Zimograma de actividad xilanolítica teñido con rojo Congo. **C)** Zimograma de actividad pectinolítica teñido con rojo de rutenio.

La Figura 25 A corresponde al perfil electroforético de proteína de los cuatro filtrados enzimáticos, por lo que se pueden observar las proteínas constitutivas de todos los concentrados. El primer carril (M)

representa al marcador de peso molecular de bajo espectro con proteínas puras ubicadas en un rango de 14.4 - 97.4 KDa. En el segundo carril (CLF) es el concentrado de *A. flavus* CECT-2687 creciendo en cáscara de limón, el barrido presente indica una definida, pero baja concentración de proteína se pueden observar 7 bandas definidas, la primera se encuentra en un peso molecular cercano a los 21.5 KDa, de la banda 2 a la 4 se encuentran entre los 31 y 45 KDa de peso molecular, las siguientes, es decir de la 5 a la 7 tienen un peso molecular de entre los 66.2 y 45 KDa. El tercer carril (OMF) contiene el concentrado de la cepa *A. flavus* CECT-2687 creciendo en olote de maíz, en esta la principal banda se presenta alrededor de los 31 KDa, sin embargo, se pueden observar varias bandas más, todas entre los 31 y 45 KDa. En el cuarto y quinto carril, se encuentran los concentrados obtenidos con la cepa *A. niger* N-402 y claramente se observa una mayor cantidad de proteína como, por los resultados obtenidos en los experimentos anteriormente expuestos, se esperaba. En el carril cuarto (CLN) se puede observar el perfil electroforético del concentrado del filtrado enzimático de la cepa *A. niger* N-402 con cáscara de limón como fuente de carbono, se observan 9 bandas, la mayoría de ellas se encuentran entre los 94.7 y 45 KDa, las dos últimas bandas se encuentran en pesos moleculares pequeños, 31 y 21.5 KDa.

La figura 25 B representa el zimograma de actividad xilanólítica, donde los 4 carriles presentan halos de degradación de xilano, las más intensas se encuentran en los carriles tres y cuatro, CLN y OMN respectivamente, en el primero claramente se distinguen 2 bandas que también están presentes en el perfil electroforético, estas se encuentran entre los 31 y 21.5 KDa, por otro lado el carril cuarto carril (OMN) presenta sólo un halo intenso de degradación, que respalda el perfil electroforético, ya que es una de las bandas más intensas y se encuentra muy cerca de 31 KDa. Para los carriles CLF y OMF sólo se distingue una zona de degradación prácticamente en el mismo peso molecular y que se encuentra aproximadamente en 54 KDa.

La figura 25 C es la imagen del zimograma de actividad pectinolítica en éste sólo se observan 2 halos de degradación de pectina, se encuentran en el tercer carril (CLN) y se encuentran entre los 66.2 y 45 KDa. Estos resultados, llevan a pensar que la concentración de las enzimas pectinolítica es muy baja, lo que no permite un correcto análisis por medio del zimograma.

5.6 Caracterización de los concentrados enzimáticos de ambas cepas

5.6.1. Efecto de la Actividad Exopectinolítica de acuerdo al grado de esterificación del sustrato

Se observó que la actividad pectinolítica tuvo diferentes actividades de acuerdo al sustrato utilizado, cabe mencionar que el blanco en este experimento, es la actividad presente en los filtrados originales, es decir, sin ultrafiltrar. El grado de esterificación afecta los perfiles de actividad enzimática en cada concentrado enzimático, esto es debido a que el conjunto de enzimas que secreta cada hongo, tiene un sustrato ideal de acción, en el cual, el sinergismo de todas las enzimas acelera la reacción, en este caso en particular, el proceso de degradación del sustrato. Las pectinas con diferentes grados de esterificación son pectinas de frutos cítricos.

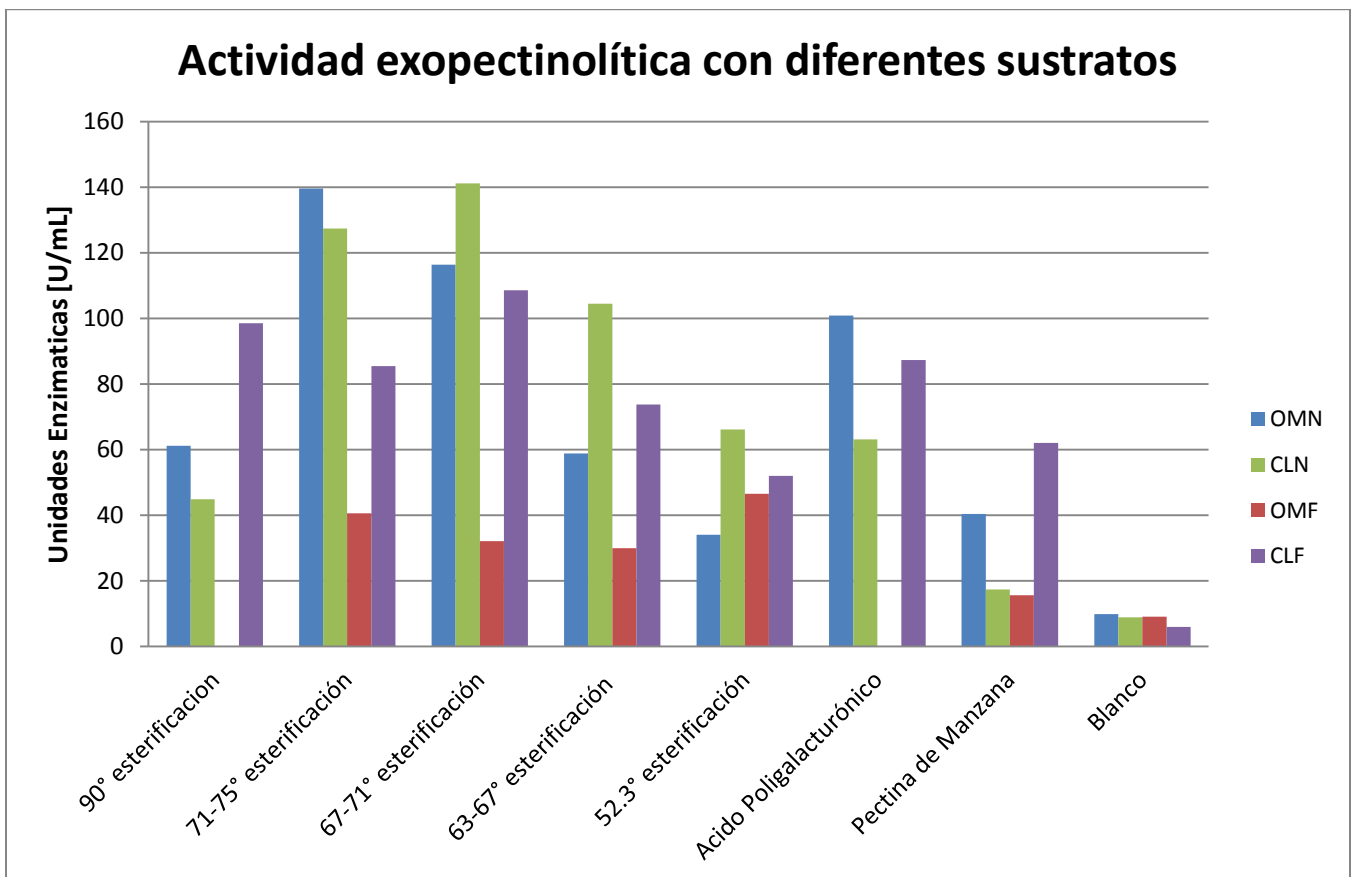


Figura 26: Actividad exopectinolítica obtenida con los concentrados enzimáticos con pectinas con diferente grado de esterificación y polimerización.

Se analizaron las actividades de cada concentrado enzimático con la pectina de manzana para determinar, las diferencias que se presentaban con el tipo de fuente de donde se obtuvo el sustrato, es decir, frutas cítricas o manzana.

En el caso de OMN, se puede observar un comportamiento tipo gaussiano de afinidad al sustrato de acuerdo al grado de esterificación, presentándose la mayor actividad con pectina de 71-75% de esterificación con 140 U/mL, el siguiente punto de actividad más alta fue con pectina con 67-71% de esterificación con una actividad de 116 U/mL, los siguientes puntos con actividades aproximadamente de 60 U/mL, son las pectinas con 90% y 63-67% de esterificación, la actividad sigue decayendo en la pectina con 52.3% de esterificación. Este fenómeno se puede explicar, con que muchas enzimas necesitan componentes ó grupos químicos específicos para reconocer su sustrato, en el caso de las pectinasas, en muchos casos el grupo éster es el que tiene este papel. El punto máximo de actividad, se puede deber a que no se presenta impedimento estérico, ni hay ausencia del grupo funcional lo que puede evitar que se de la formación del complejo enzima sustrato.

Para el siguiente concentrado enzimático que se observó la misma actividad con comportamiento gaussiano, fue para CLN, sin embargo el punto máximo se presentó en la pectina con 67-71% de esterificación con 141.2 U/mL, seguido por la actividad en la pectina con 71-75% de esterificación con un valor de 127.4 U/mL, para la pectina con 63-67% de esterificación la actividad fue de 104.5 U/mL, las siguientes con actividades muy parecidas fueron la pectina con esterificación de 52.3% y el ácido poligalacturónico con 66.2 y 63.2 U/mL. El comportamiento observado en ambos concentrados con la misma cepa *A. niger* N-402, es consistente por el mismo comportamiento, aunque con diferentes sustratos ideales.

En cambio, las cepa *A. flavus* CECT-2687, en ambos concentrados los resultados no siguen un patrón definido, aunque se puede destacar que OMF, no presenta actividad en pectinas sin esterificar y muy esterificadas. Y en pectinas con esterificación entre 75 y 52.3%de esterificación la actividad es relativamente estable, con un valor máximo de actividad de 52 U/mL en la pectina de menor esterificación y el valor mínimo de 30 U/mL en pectina con 63-67% de esterificación.

Para CLF, se presentó actividad más alta que OMF, con un valor de 109 U/mL en la pectina de 67-71%de esterificación y un valor mínimo de 52.03 U/mL en la pectina con 52.3% de esterificación. Cabe

recaltar que este concentrado fue el que presentó mayor actividad en la pectina de manzana 87.3 U/mL, comparados con las actividades de los demás concentrados 40.5 U/mL para OMN, 17.4 U/mL para CLN y 15.64 U/mL para OMF.

5.6.2 Efecto en la Actividad Xilanólítica de acuerdo al origen del sustrato

Determinar si la actividad xilanólítica variaba de acuerdo al origen del sustrato. Los sustratos utilizados fueron xilano de madera de abedul y xilano de avena. El blanco se realizó con los filtrados originales, es decir, antes de ultrafiltrar.

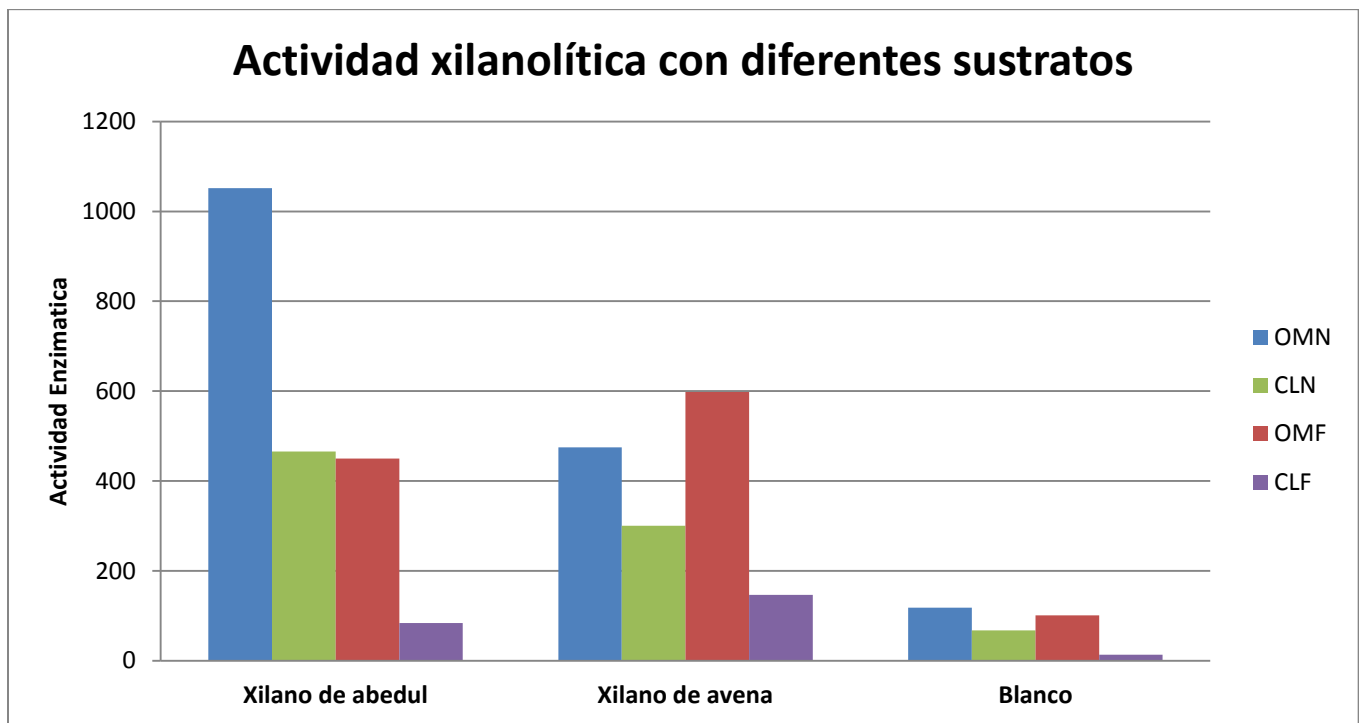


Figura 27: Actividad xilanólítica obtenida con los concentrados enzimáticos con xilanos diferentes fuentes.

La actividad en concentrado enzimático OMN, tuvo su mayor actividad en xilano de abedul con 1051.62 U/mL, casi el doble de actividad que presentaron los concentrados CLN y OMF con 465.74 U/mL y 450 U/mL, respectivamente. Comparando OMN y CLF, la actividad que muestra OMN es 13 veces mayor que la de CLF. Para que se de la producción y secreción de enzimas xilanólíticas, debe de haber inducción por medio de la presencia del sustrato en el medio, lo que no es el caso en la cáscara

de limón debido a que el xilano se encuentra en muy baja concentración. Lo que se repite en los dos concentrados de cáscara de limón.

El concentrado enzimático OMF fue el que presentó mayor actividad en el xilano de avena con 598 U/mL, en cambio CLF presentó una actividad de 147 U/mL 4 veces menor actividad que OMF. El concentrado enzimático OMN tuvo una actividad de 475 U/mL, aproximadamente el 80% de la actividad que presentó OMF. El concentrado enzimático CLN tuvo una actividad de 301 U/mL, lo que representa 1.6 veces menor actividad de OMN.

La composición del xilano de avena y la del olote de maíz, podrían ser clave en la diferencia en las actividades que se presentaron, por la concentración de arabinosas u otro sustituyente.

5.7 Cinética de degradación de sustratos por medio de los concentrados enzimáticos

Una enzima es una proteína que actúa como catalizador biológico, llevando a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades, no se consume dentro de la reacción y en general presenta un elevado grado de especificidad (Badui, 2006).

El modelo de Michaelis y Menten considera que cuando el reactivo o sustrato [S], está en contacto con la enzima [E], rápidamente se combinan para formar un complejo llamado enzima-sustrato [ES]. Posteriormente, de este complejo se liberan tanto el producto como la enzima.

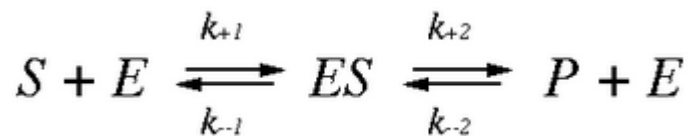


Figura 28: Ecuación general para una reacción enzimática en la que participa un sustrato.

En la ecuación anterior;

S: sustrato

ES: complejo enzima-sustrato

E: enzima

P: producto

Se dice que la rapidez de formación y descomposición del complejo enzima-sustrato es la misma lo que indica que está en equilibrio, como se puede ver en la ecuación (2).

Por lo anterior tenemos que:

$$\frac{dS}{dt} = -K_1[E][S] + K_{-1}[ES] \quad (1)$$

$$\frac{dES}{dt} = K_1[E][S] - K_{-1}[ES] - K_2[ES] = 0 \quad \text{En equilibrio} \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = K_2[ES] \quad (3)$$

$$K_1[E][S] = (K_{-1} + K_2)[ES] \quad (4)$$

$$[ES] = \frac{K_1[E][S]}{K_{-1} + K_2} = \frac{[E][S]}{Km} \quad (5)$$

Se sabe que el balance de la concentración de la enzima es el siguiente:

$$[E] = [E_t] - [ES] \quad (6)$$

$$[ES] = ([E_t] - [ES]) \frac{[S]}{Km} = \frac{1}{Km} [S][E_t] - \frac{1}{Km} [ES][S] \quad (7)$$

Por lo tanto,

$$[ES] \left(1 + \frac{[S]}{Km} \right) = \frac{1}{Km} [S][E_t] \quad (8)$$

$$[ES] = \frac{[S][E_T]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Sustituyendo (9) en (3); obtenemos que,

$$\frac{dP}{dt} = \frac{K_2[E_T][S]}{K_m + [S]} \quad (10)$$

Sin embargo, la ecuación global de Michaelis-Menten, esta expresada con respecto a la concentración de sustrato, por lo que podemos deducir que,

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{K_2[E_T][S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$

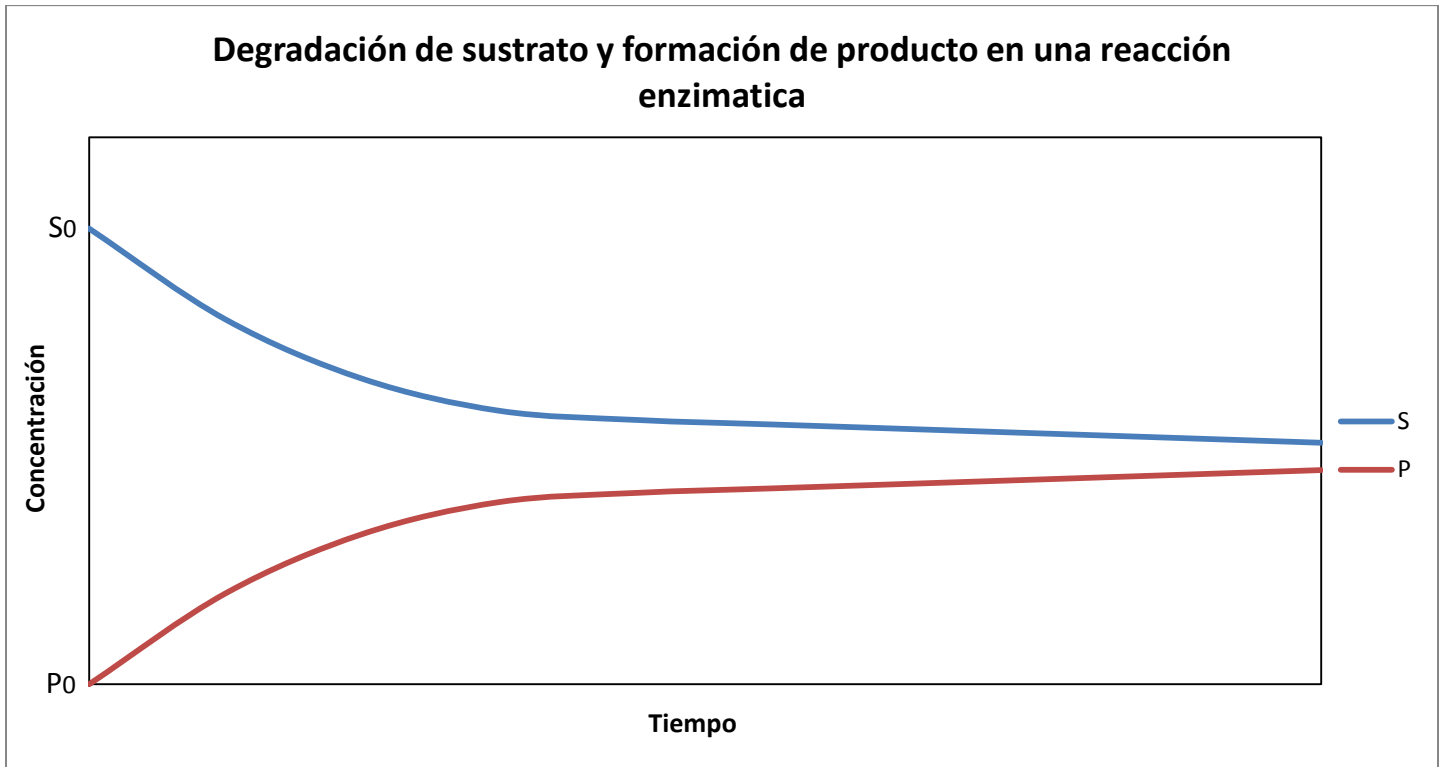


Figura 29: Representación grafica del comportamiento de la degradación de sustrato y la consecuente formación de producto en una reacción catalizada enzimáticamente.

La ecuación (11) se explica mediante la grafica anterior; ya que la formación de producto depende de la siguiente relación $P = [S_0] - [S]$, experimentalmente se obtuvieron los datos de generación de producto por medio de la reacción enzimática. Por lo que gracias a lo anterior se pudo obtener la concentración de sustrato en cada punto experimental.

Para obtener la velocidad de la reacción se utilizó el teorema del valor medio o teorema de Lagrange, en los tiempos de muestreo, ya que es una propiedad de las funciones derivables en un intervalo, y dice que dada cualquier función (f) continua en el intervalo [a, b] y diferenciable en el intervalo abierto (a, b) entonces existe al menos algún punto c en el intervalo (a, b) tal que la tangente a la curva en (c) es paralela a la recta secante que une los puntos (a, f(a)) y (b, f(b)). Es decir:

$$\frac{f(b) - f(a)}{b - a} = f'(c) \quad (12)$$

Por medio del diagrama de Lineweaver-Burk (figura 30), en el que se grafican los inversos de la velocidad contra concentración de sustrato y obteniendo la regresión de la recta obtenida se obtienen las constantes cinéticas, K_m y $V_{m\acute{a}x}$, como se puede ver en la ecuación (13). En el caso específico de este trabajo, no se pueden considerar como constantes cinéticas por si mismas, ya que los concentrados enzimáticos son un conjunto de enzimas, en las que puede existir un efecto sinérgico de las mismas. Por lo anterior llamaremos las constantes obtenidas constantes cinéticas aparentes.

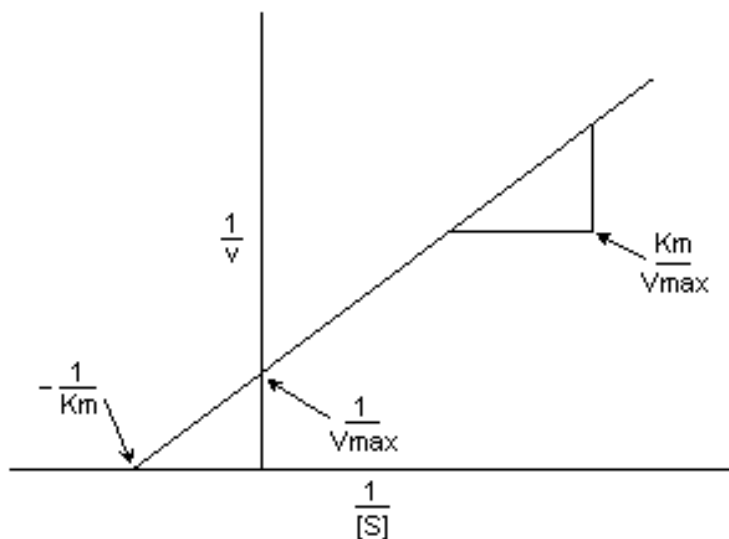


Figura 30: Diagrama de Lineweaver-Burk

La regresión lineal de este diagrama sigue la siguiente ecuación;

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{Km}{Vm\acute{a}x} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{Vm\acute{a}x} \quad (13)$$

Las unidades utilizadas para la obtención de los parámetros cinéticos aparentes son miligramos por mililitro, [mg/mL], debido a que no se puede conocer la concentración de los polímeros utilizados como sustratos, es decir, xilano y pectina. También para poder analizar los datos experimentales se obtuvo el tiempo teórico de degradación de sustrato por medio de la ecuación (14) que es la ecuación integrada de Michaelis-Menten.

$$t = \frac{P - Km \left(\ln \left(\frac{S_0 - P}{S_0} \right) \right)}{Vm\acute{a}x} \quad (14)$$

5.7.1 Cinética de degradación de Pectina

Para determinar la cinética de degradación de pectina se utilizaron los cuatro concentrados obtenidos es decir, OMN, CLN, OMF y CLF, con pectina con 67-71% de esterificación, ya que en esta fue donde se presentó la mejor actividad en los cuatro filtrados. La determinación de las mismas se realizó como se explicó en el punto anterior.

Para obtener las gráficas siguientes, se obtuvieron las $Vm\acute{a}x$ aparentes y Km aparentes con los datos experimentales de cada uno de los concentrados, las cuales respectivamente fueron sustituidas en la ecuación 14, que como se explicó anteriormente, da como resultado un tiempo teórico de degradación de sustrato. Se expondrán los resultados obtenidos por grupos de concentrados de la misma fuente de carbono, ya que se obtuvieron resultados consistentes.

En principio, las consideraciones generales de la cinética química pueden aplicarse a las reacciones catalizadas enzimáticamente, aunque estas últimas tienen la particularidad de mostrar el fenómeno de saturación por sustrato. A una concentración constante de enzima, si vemos el gráfico de la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente en función de la concentración del sustrato, es evidente que a bajas concentraciones del mismo la velocidad de formación de producto es proporcional a la concentración del sustrato. A medida que se aumenta la concentración de sustrato se aprecia una pérdida de la proporcionalidad, en esta zona la reacción es de orden mixto y finalmente, a altas concentraciones, la velocidad de la reacción es independiente de ésta. (Lei y Jiang, 2011)

Las constantes cinéticas de los filtrados son aparentes, ya que se está determinando la actividad de un grupo de enzimas y no una sola, las constantes cinéticas son únicas para cada enzima, sin embargo para analizar el proceso que se lleva a cabo en la degradación de la pectina de los concentrados enzimáticos, estas se consideraran como una sola enzima.

Tabla 1: Propiedades cinéticas aparentes de los filtrados enzimáticos CLN, CLF en la degradación de pectina con 67-71% de esterificación.

Propiedades Enzimáticas Aparentes	CLN	CLF
V _{máx} [mg/ml*min]	0.2	0.4
K _m [mg/mL]	4.9	57.8

La velocidad máxima (V_{máx}) corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental, y la K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{máx}, la K_m, también expresa el grado de afinidad de una enzima por su sustrato.

La afinidad de las enzimas CLN, tienen un K_m más pequeño, lo que significa que son más afines al sustrato, la V_{máx} es aproximadamente la mitad que la de CLF. El K_m de CLF es muy grande, aproximadamente 11 veces más que CLN, lo que se puede ver reflejado en las graficas siguientes.

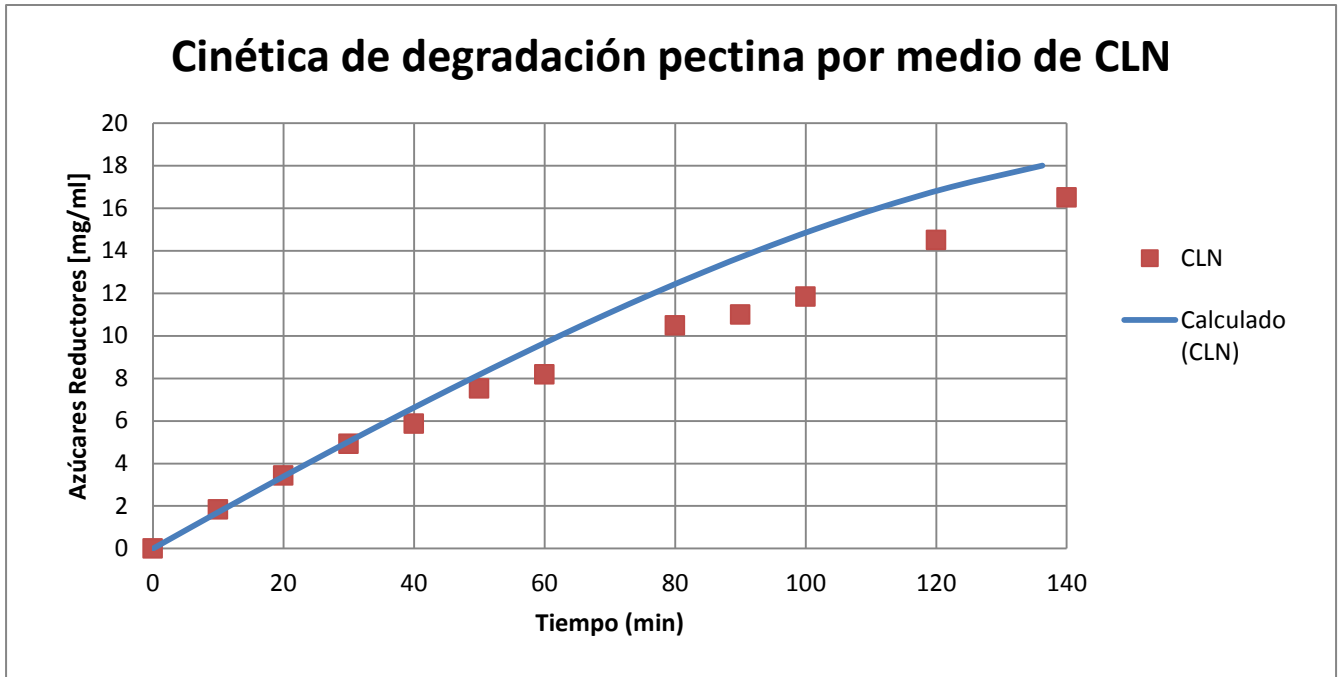


Figura 30: Comparación de la formación de producto experimental y teórica, calculada por medio de la ecuación integrada de Michaelis-Menten, de pectina con 67-71% de esterificación; con el concentrados enzimático CLN.

La cinética teórica del concentrado CLN, como se puede observar en la figura 30, empieza a separarse de la experimental a partir de los 40 minutos de reacción, aunque se sabe que no se está determinando la acción de una sola enzima, sabemos que puede o no existir sinergismo en la hidrólisis de pectina. Aunque experimentalmente a los 140 minutos de reacción, se obtuvo una concentración final de 16.5 mg/mL y teóricamente se debería de haber formado 18 mg/mL de producto, es decir ácido galacturónico.

La disminución en la actividad anterior, se puede deber a una saturación de las enzimas poligalacturonasas, que son las que además de disminuir la viscosidad de las soluciones de pectina, aumentan los sitios de acción de otras enzimas.

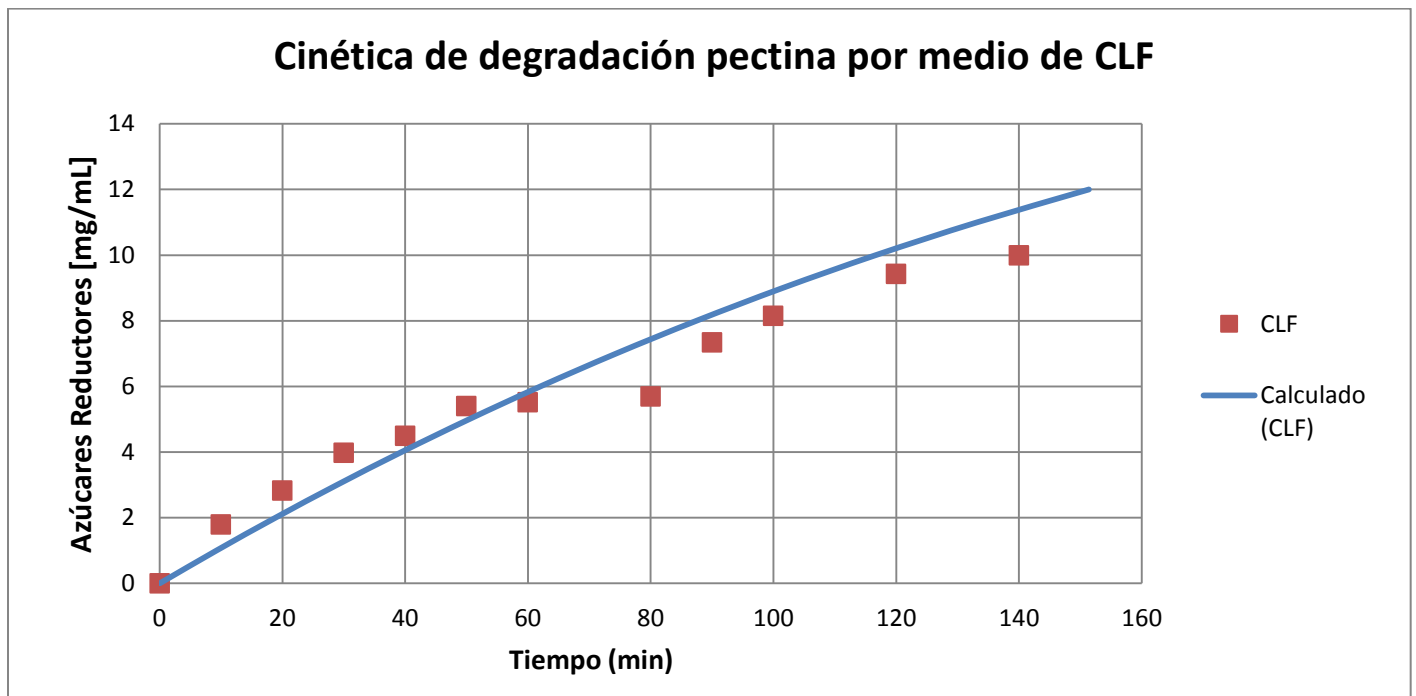


Figura 31: Comparación de la formación de producto experimental y teórica calculada por medio de la ecuación integrada de Michaelis-Menten, de pectina con 67-71% de esterificación; con el concentrado enzimático CLF.

La cinética de degradación de pectina del concentrado CLF, la actividad en la primera hora de reacción experimentalmente es mayor que la teórica, sin embargo después de este tiempo la actividad enzimática disminuye, como sucedió en el caso anterior donde se puede ver claramente el decaimiento de la actividad enzimática.

Como se mencionó anteriormente se puede deber a la saturación del grupo de enzimas, presentes en el concentrado enzimático. Sin embargo, la mayor diferencia en este caso en particular es que después de los 90 minutos la actividad no es tan francamente diferente al calculado teóricamente, como sucedió en el caso de CLN.

Tabla 2: Propiedades cinéticas aparentes de los filtrados enzimáticos OMN y OMF en la degradación de pectina con 67-71% de esterificación.

Propiedades Enzimáticas Aparentes	OMN	OMF
V _{máx} [mg/ml*min]	0.15	0.16
K _m [mg/mL]	4.3	14.2

La V_{máx} de OMN y de OMF no presentan diferencias significativas entre sí, lo que cabe recalcar es la diferencia que existe en los dos K_m de los concentrados enzimáticos, siendo la de OMF aproximadamente 3 veces la K_m de OMN, hecho que se ve claramente reflejado en las siguientes gráficas, ya que la afinidad en OMN es mayor que la de OMF.

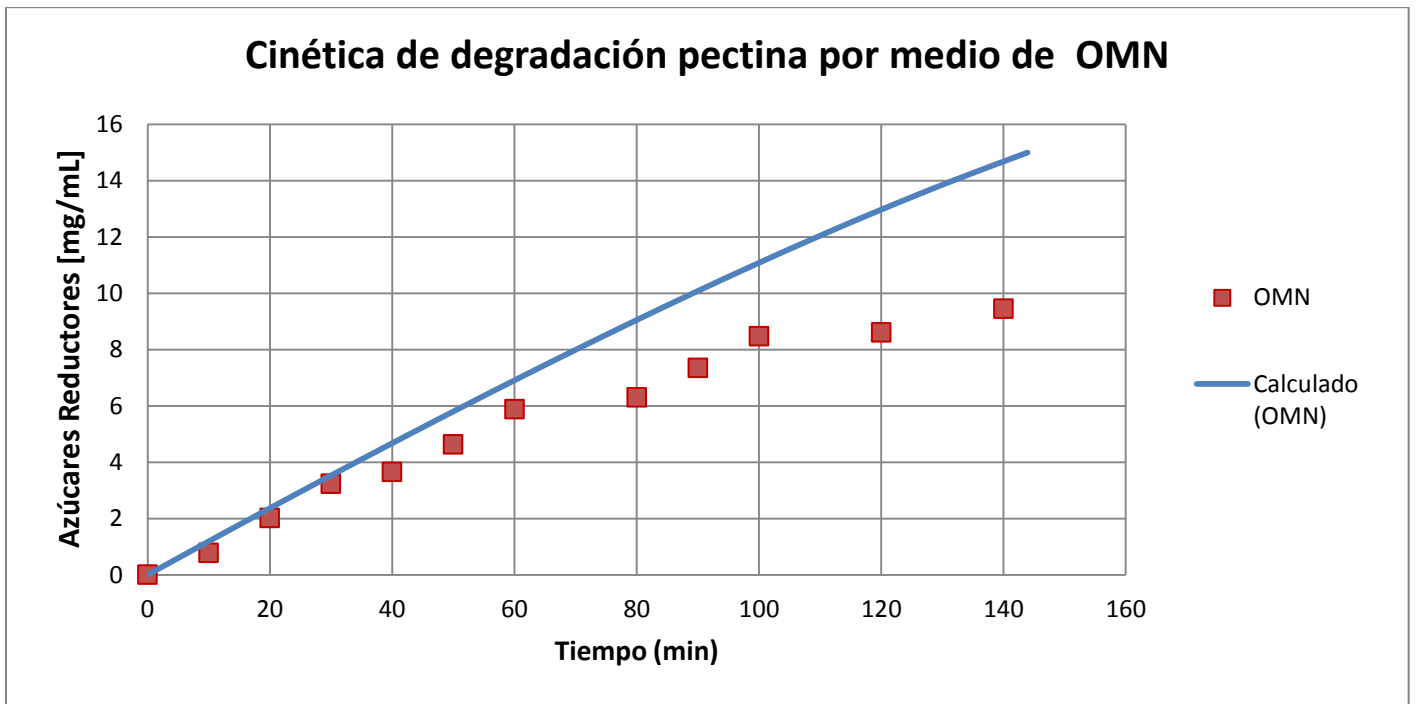


Figura 32: Comparación de la formación de producto experimental y teórica, calculada por medio de la ecuación integrada de Michaelis-Menten, de pectina con 67-71% de esterificación; con el concentrado enzimático OMN.

La cinética de degradación de pectina con el concentrado OMN, teóricamente da una reacción de orden cero, ya que a concentraciones de sustrato elevadas, la velocidad de reacción es independiente de la concentración del sustrato, y por tanto, la reacción es un proceso cinético de orden cero, sin embargo experimentalmente los datos sólo se relacionan hasta los 35 minutos de reacción, ya que experimentalmente se obtuvo también una reacción de orden cero, pero con diferente comportamiento; que se ve reflejado en la disminución de actividad enzimática del conjunto de enzimas del concentrado.

Los datos experimentales, casi en todos los puntos de muestreo a partir de los 80 minutos de reacción, se encuentran 3 unidades de concentración de producto (mg/mL) por debajo de los resultados teóricos, una posible explicación, es que el conjunto enzimático del filtrado OMN, sufren saturación a lo largo de la reacción atrasando la degradación de la pectina.

Otro factor, que podría haber influido en la reacción es que en el baño de agua, en el que se llevaron a cabo las reacciones, existe una zona que se encuentra más cerca a la fuente de calor, y aunque se trató de encontrar las zonas con temperatura más homogénea, el matraz más cercano a esta zona siempre se encontraba entre 0.6 y 1.5°C por arriba de la temperatura ideal, lo que pudo haber truncado la actividad enzimática, dando como resultado la diferencia en ambas curvas de degradación de pectina, la experimental y la teórica .

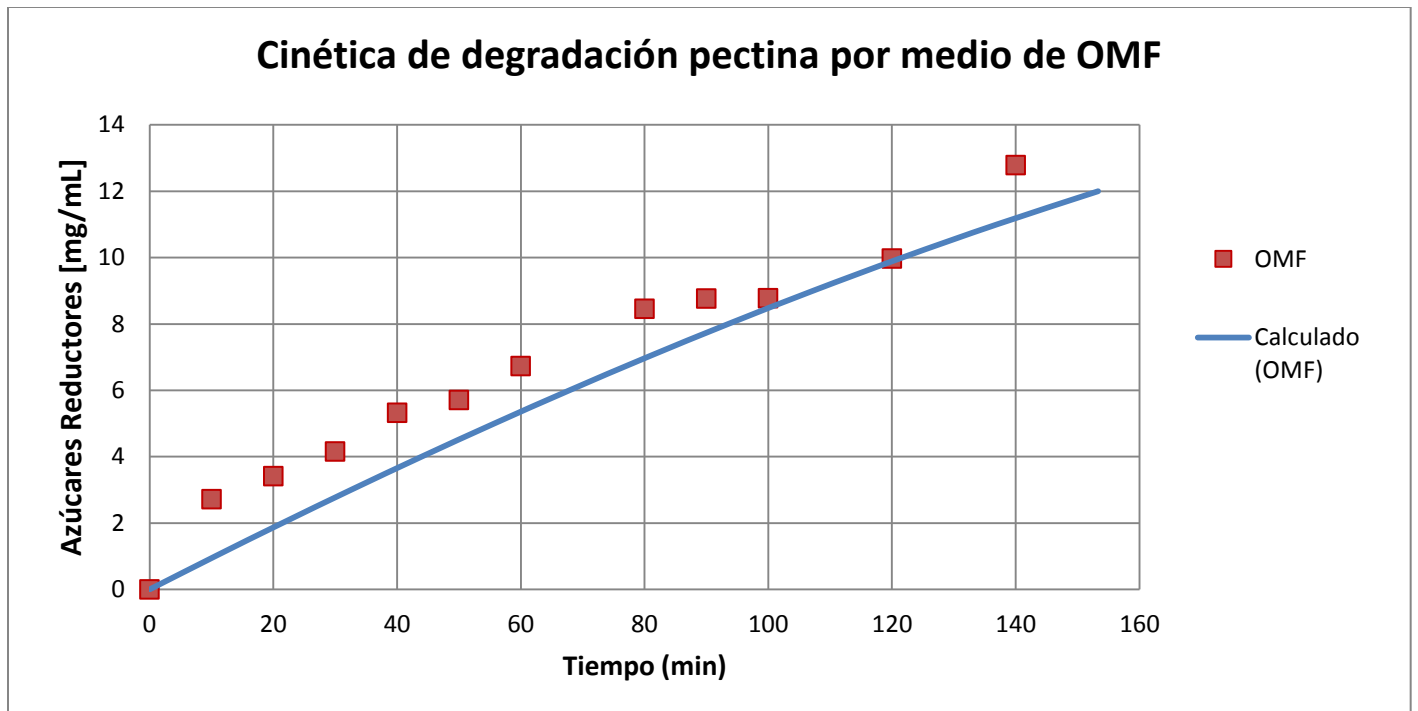


Figura 33: Comparación de la formación de producto experimental y teórica, calculada por medio de la ecuación integrada de Michaelis-Menten, de pectina con 67-71% de esterificación; con el concentrado enzimático OMF.

La degradación de la pectina por medio del concentrado OMF, en la reacción experimental prácticamente desde el inicio de la misma mostró una mayor formación de producto, que la esperada teóricamente con una diferencia de 2 mg/mL más que el teórico. Sin embargo para los 100 minutos de reacción empieza a disminuir la cantidad de producto formado, como sucedió en los casos anteriores, aunque en los 140 minutos de reacción volvió a aumentar la actividad del filtrado, aunque no con la misma velocidad que al principio de la reacción.

Las variaciones que se presentaron a lo largo de la degradación de pectina, en este caso en particular, se podría deber al sinergismo enzimático en el que la producción de nuevos sustratos y la acción de enzimas que actúan sobre estos, da la variación de formación de azúcares reductores.

5.7.2 Cinética de degradación de Xilano

El xilano elegido para determinar las cinéticas de degradación de este sustrato con los concentrados obtenidos, fue el xilano de abedul, ya que con este se presentó la mayor actividad con los mismos. Pero solo se analizaron las cinéticas de degradación de xilano con los concentrados procedentes de ambas cepas con olote de maíz como fuente de carbono, ya que estos fueron los que presentaron mayor actividad.

Tabla 3: Propiedades cinéticas aparentes de los filtrados enzimáticos OMN y OMF en la degradación de xilano de abedul.

Propiedades Enzimáticas Aparentes	OMN	OMF
V _{máx} [mg/ml*min]	0.72	0.4
K _m [mg/mL]	26.6	13.2

La velocidad máxima aparente, de OMN es 0.72 mg/mL*min, en cambio para OMF es 0.4 mg/mL*min, como se mencionó anteriormente, ésta es el valor de velocidad máximo al que tiende la curva experimental. Y se ve reflejado en la cantidad de producto formado al mismo tiempo, por ejemplo a los 80 minutos de reacción OMN, ha generado una mayor cantidad de azúcares reductores que OMF.

Se sabe que el K_m depende el pH, la temperatura, el tipo de sustrato, pero no de la concentración del mismo. El K_m de OMF es la mitad que la presentó el conjunto enzimático de OMN, por lo anterior, esto quiere decir que OMF son más afines al sustrato seleccionado, es decir xilano de abedul.

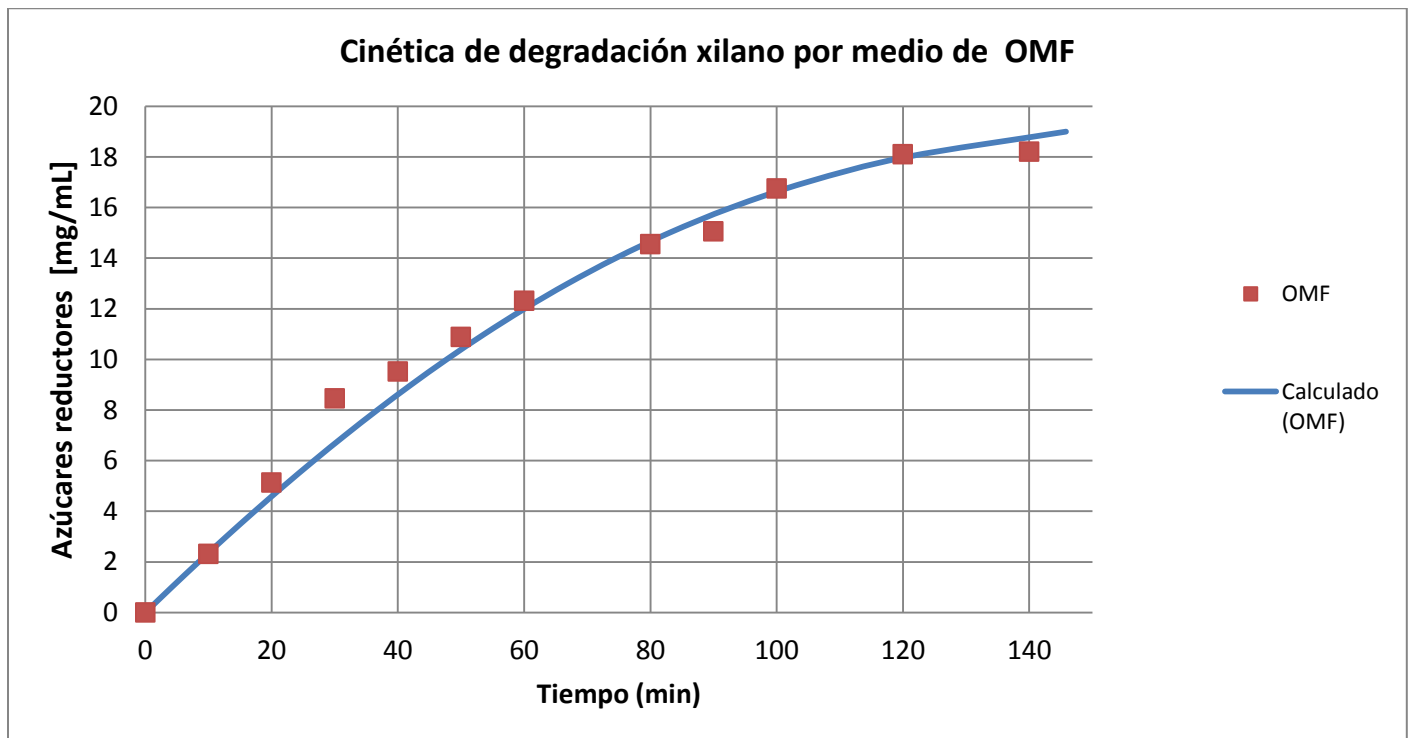


Figura 34: Comparación de la formación de producto experimental y teórica, calculada por medio de la ecuación integrada de Michaelis-Menten, de xilano de abedul; con el concentrado enzimático OMF.

La cinética de degradación de xilano de abedul experimental y la teórica se ajustan casi perfectamente, sólo entre los 20 y 50 minutos de reacción la formación de sustrato es mayor que la que se esperaba teóricamente, en el inicio de la reacción la velocidad ya que el número de “choques” es máximo y se ve reflejado en que la velocidad de producción es mayor, después disminuye como se ve que a partir de los 140 minutos de reacción empieza a hacerse asintótica, es decir que se empieza a llegar el final de la reacción ya que no habrá más formación de producto.

Otro factor que pudo haber aumentado la velocidad de formación del producto, fue el posible sinergismo de todas las enzimas que contenía el concentrado enzimático.

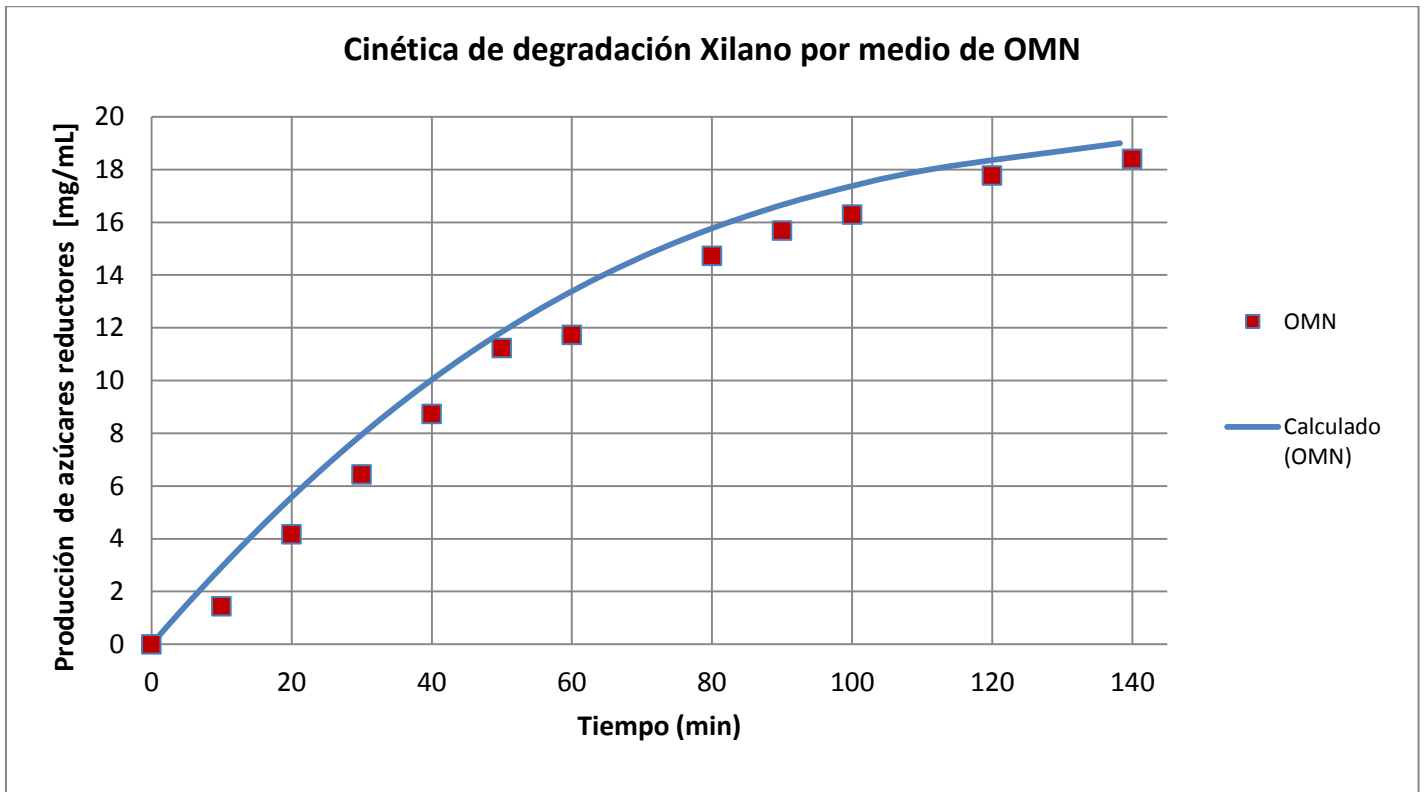


Figura 35: Comparación de la formación de producto experimental y la teórica, calculada por medio de la ecuación integrada de Michaelis-Menten, de xilano de abedul; con el concentrado enzimático OMN.

En este caso en particular, de la cinética de degradación de xilano de abedul con OMN, la formación de producto siempre se encontró por debajo del que se esperaba teóricamente. Experimentalmente se produjo una unidad de concentración (mg/mL) debajo de la teórica.

Cabe recalcar que al tiempo final, 140 minutos de reacción, la concentración de azúcares reductores en ambos caso de las degradaciones de xilano, fue mayor que las de pectina, en las cuales se produjo aproximadamente 15 mg/mL, y en la de xilano 19 mg/mL.

5.8 Liberación de pectina por efecto de tratamiento enzimático

La liberación de pectina se determinó comparando con el blanco, que era un matraz con las mismas condiciones, 100mL de solución de cáscara de limón persa al 3% en buffer de acetatos pH 5 y se incubó por 3 horas con agitación continua reciprocante, la única diferencia es que no se trató con concentrados enzimáticos. Pasado el tiempo de incubación se filtraron cada uno de los matraces se recuperó el sólido en papeles filtro y se llevó a peso constante.

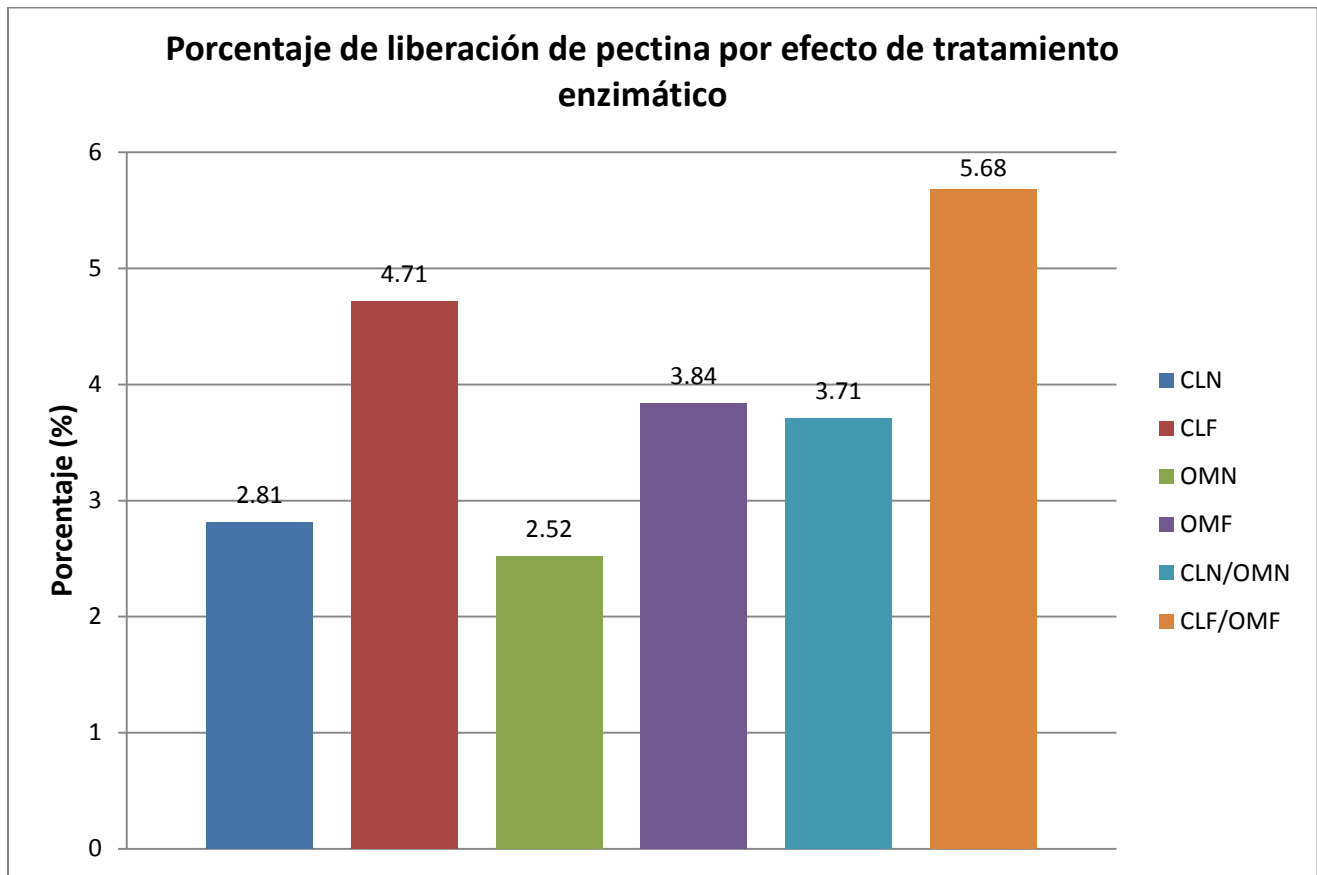


Figura 36: Porcentaje de a la perdida de peso de cáscara de limón por medio de liberación de pectina por medio de tratamiento enzimático.

Como se puede observar en la figura 36, se utilizaron los cuatro concentrados y además una mezcla de los dos concentrados de la misma cepa, es decir CLN/OMN y CLF/OMF, como se puede observar donde una mayor pérdida de peso fue en la mezcla de los concentrados de *A. flavus* CECT-2687, donde hubo una pérdida de 5.68% de peso con respecto al blanco, por lo que se puede decir que hubo sinergismo de la mezcla de los concentrados, ya que de los concentrados sin mezclar fueron los que obtuvieron una mayor pérdida de peso fueron CLF, con 4.7%, y OMF, con 3.84%, con respecto al blanco.

Los concentrados de *A. niger* N-402 fueron los que presentaron una menor actividad degradadora de pectina CLN con una pérdida de 2.81% y OMN con 2.52%. Aunque la mezcla de ambas presentó una mejor actividad degradadora con 3.73% de pérdida de peso con respecto al blanco.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

1. Las cepas *A. flavus* CECT-2687 y *A. niger* N-402 creciendo en pH 6 y con olote de maíz y cáscara de limón como fuentes de carbono, tienen mayor actividad tanto xilanólica como pectinolítica, que creciendo en salvado de trigo.
2. La actividad pectinolítica de la cepa *A. niger* N-402 en cáscara de limón es 1.3 veces mayor que la actividad de la cepa *A. flavus* CECT-2687. En el caso de olote de maíz la actividad pectinolítica de *A. niger* N-402 es 1.7 veces mayor que la actividad de la cepa *A. flavus* CECT-2687.
3. La actividad xilanólica de la cepa *A. niger* N-402 en cáscara de limón es 4.7 veces mayor que la actividad de la cepa *A. flavus* CECT-2687. En el caso de olote de maíz la actividad xilanólica de *A. niger* N-402 es 1.3 veces mayor que la actividad de la cepa *A. flavus* CECT-2687.
4. De las enzimas secretadas por la cepa *A. niger* N-402 creciendo en cascará de limón, se caracterizaron 2 enzimas especializadas en la degradación de xilano y 2 enzimas especializadas en la degradación de pectina. En cambio, creciendo en olote de maíz, se caracterizó una enzima especializada en la degradación de pectina. Por otro lado, para la cepa *A. flavus* CECT-2687 creciendo en cascará de limón y olote de maíz, se identificó una enzima especializada en la degradación de xilano.
5. Las enzimas secretadas por la cepa *A. niger* N-402 crecida en olote de maíz, presentan mayor actividad catalítica en pectina cítrica con 71-75 % esterificación y en xilano de madera de abedul. Y las enzimas secretadas por la misma cepa, pero crecida en cáscara de limón persa, presentan mayor actividad catalítica en pectina cítrica con 67-71 % esterificación y también en xilano de madera de abedul. Sugiriendo que en las dos fuentes de carbono se producen enzimas con diferentes propiedades catalíticas.

6. Las enzimas secretadas por la cepa *A. flavus* CECT-2687 crecida en olote de maíz, presentan mayor actividad catalítica en pectina cítrica con 52.3 % esterificación y en xilano de avena, en cambio, las enzimas secretadas por la misma cepa, pero crecida en cáscara de limón persa, presentan mayor actividad catalítica en pectina cítrica con 63-71% esterificación y también en xilano de avena.
7. Las constantes aparentes calculadas para la degradación de pectina y xilano, nos muestran que las $V_{m\acute{a}x}$ en la cinética de degradación de pectina los concentrados enzimáticos CLN, OMF y OMN, no presentan diferencia significativa, sin embargo el concentrado CLF, tiene la mayor $V_{m\acute{a}x}$. Los K_m de los concentrados de *A. niger* N-402 no presentan diferencia significativa, y las enzimas que componen los mismos son más afines que las de *A. flavus* CECT-2687. Para las cinéticas de degradación de xilano, el $V_{m\acute{a}x}$ mayor corresponde a OMN, y el menor K_m corresponde al concentrado enzimático OMF, además corresponde al doble del K_m del concentrado enzimático OMN. Por lo que, se concluye que cinéticamente las pectinasas producidas en estas condiciones por la cepa *A. flavus* CECT-2687, no parecen tener una ventaja catalítica sobre las de *A. niger* N-402. Sin embargo, en el caso de las xilanasas *A. flavus* CECT-2687 tiene una menor K_m que las enzimas de *A. flavus*, por lo que podría verse favorecido.
8. En el experimento en el que se determinó la extracción de pectina de la cáscara de limón persa tratado con los concentrados enzimáticos, en todos los casos se presenta mayor pérdida de peso respecto al control. Sin embargo, la mezcla de los concentrados de *A. flavus* CECT-2687, fue el que presentó mayor porcentaje de liberación de pectina.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Koc, H., Liu, F., & Tien, M. (2005). Fungal degradation of wood : initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate, 49-56. doi:10.1007/s00294-004-0550-4
- Albersheim, P. 1975. The Walls of Growing Plant Cells. *Science America*. 232: 81-95.
- Arunachalam, C., Asha, S. 2010. Pectinolytica Enzyme- A Review of New Studies. *Advanced Biotech Journal*. 561:631
- Badui, S., 2006. *Química de los alimentos*. 4º edición. México: Pearson. p.p. 75-107.
- Berk, A., Lodish, H., 2005. *Biología Celular y Molecular*. Madrid: Ed. Médica Panamericana. p.p. 233-240.
- Bhat, M., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18. 355-383.
- Brambl, R. (2009). Fungal physiology and the origins of molecular biology, 3799-3809. doi:10.1099/mic.0.035238-0
- Castilho, L., Medronho, R., Alves, T. 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 71. 45-50.
- de Vries, R. Visser J., 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65. 497-515.
- Fennema, O., 1993. *Química de los alimentos*. 2º edición. Madrid, España: Acribia. p.p. 126, 137-143, 295-260.

- Galagan, J. E., Henn, M. R., Ma, L.-jun, & Cuomo, C. A. (2005). Genomics of the fungal kingdom : Insights into eukaryotic biology *Genomics of the fungal kingdom : Insights into eukaryotic biology*, 1620-1631. doi:10.1101/gr.3767105
- Geiser, D. M. (2009). Sexual structures in *Aspergillus* : morphology, importance and genomics, 47(April 2008), 21-26. doi:10.1080/13693780802139859
- Ginocchio Balcázar, L. *La Agroindustria*. Piura. 2000
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., & Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer, 1677-1692. doi:10.1099/mic.0.2007/007641-0
- Jayani. R., Saxena, S., Gupta R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40. 2931-2944.
- Jiujiang, Y., Thomas, E., Cleveland, William, C., Nierman., Bennett. W. 2005. *Aspergillus flavus* genomics: Gateway to human and animal health, food safety and crop resistance to diseases. Review. *Revista Iberoamericana de Micología*. 22, 194-202.
- Kim, M.-jung H. N.-jong, & Yup, S. (2010). Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. doi:10.1007/s00294-010-0308-0
- Kim, Y., & Marten, M. R. (2008). The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*, 7(2). doi:10.1093/bfpg/elm031
- Lal, R. 1995. The role of residues management in sustainable agricultural system. *Journal of Sustainable Agriculture*. 5. 51–78.
- Lang, C., & Dörnenburg, H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(4), 366-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803890>

- Lei, Z., & Jiang, Q. (2011). Synthesis and properties of immobilized pectinase onto the macroporous polyacrylamide microspheres. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2592-9. doi:10.1021/jf103719t
- Luh, B.S., and H.J.Pha. 1951. Studies on polygalacturonase of certain yeast. *Arch. Biochem.Biophys.* 33:213-227.
- Luo, M., Brown, R. L., Chen, Z.-yuan, Menkir, A., Yu, J., & Bhatnagar, D. (2011). Transcriptional Profiles Uncover Aspergillus flavus-Induced Resistance in Maize Kernels, 766-786. doi:10.3390/toxins3070766
- Mellon, J. E., Cotty, P. J., & Dowd, M. K. (2007). Aspergillus flavus hydrolases : their roles in pathogenesis and substrate utilization, 497-504. doi:10.1007/s00253-007-1201-8
- Niture, S.K., Pant A. 2004. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*, *Microbiol. Res.* 159. Pp.305–314
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., et al. (2007). Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products, 53-66. doi:10.3114/sim.2007.59.07
- Ramanujam, N., Saritha, Palani subramani. 2008. Production of pectiniyase by solid-state fermentation of sugarcane bagasse using Aspergillus niger. *Advanced Biotech.* 30-33.
- Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewiez, Z., Paterson, R., Lima N., Venancio A., 2007. Identificacion and Characterization of Asperguillus flavus and aflatoxins. *Communicating Current Reserch and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* pp. 527-534.
- Samson, R., Hong. S., Frisvad, J. 2006. Old and new concepts of species differentiation in Aspergillus. *Medical Mycology.* 44. pp. 133-148.
- Samson R., Hoekstra E., Frisvad J. 2004. *Introduction to Food-and Airborne Fungi*, 7° edición: Utrecht. Centraalbureau voor Schimmelcultures.

- Shembekar, V., Dhorte, A., 2009. Studies of pectin degrading microorganisms from soil. *Journal of microbial world*. 11(2).216-222
- Showalter, A., 1993. Structure and function of plant cell wall. *American Society of plant physiologist*. 5. 9-23.
- Varki, R., Cummings, R., Esko, J., Freexe, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G., Etzler, M. 2009. Consortium of Glycobiology. San Diego, La Jolla, California.
- Wrather, A., Sweets, L., Bailey, W., Claxton, T., Sexten, J., Carlson, M. 2000. Aflatoxin in Corn. *Agricultural MU Guide*. pp. 1-4.

Sitios Web:

- Portal of the EU-SOL project. (2010, april 06). *Structural and functional genomics of tomato*. Retrieved from <[http://www.eu-sol.net/science/about-the-project/publications/publications-lectures-posters/?searchterm=cell wall](http://www.eu-sol.net/science/about-the-project/publications/publications-lectures-posters/?searchterm=cell%20wall)>
- <www.aspergillusflavus.org>. "Aspergillus flavus: About Aspergillus flavus." *Aspergillus flavus and aflatoxin*. 2005 Center for Integrated Fungal Research, 2005. Web. 16 Mar 2012.
- Alcalá, Luis. "Aspergillus y aspergilosis." *Control Calidad SEIMC*. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 2009. <<http://www.aspergillus.org>> 24 Apr 2012.
- Carrillo, L. *Los hongos de los alimentos y los forrajes*. 2003. Photograph. Universidad Nacional de Salta, Argentina. Web. 24 March 2012. <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>>.