UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

CIENCIAS BÁSICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



TESIS

Presentada en la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Unidad Iztapalapa para obtener el grado de Maestro en Biotecnología

PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN DE MANANASA PRODUCIDA MEDIANTE FERMENTACIÓN SÓLIDA POR *Aspergillus sp.*

Por

Alejandro Téllez Jurado
Ingeniero en Alimentos

Presentada el 26 de Marzo de 1998 ante el jurado compuesto por:

Asesores
Sergio Huerta Ochoa, Dr.
Gabriela Rodríguez Serrano, Dra.
Carlos Regalado González, Dr.
Leo D. Pyle, Professor

CONTENIDO

	Página
Contenido	i
Agradecimientos	iv
Dedicatorias	v
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	viii
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	5
2.1 Fermentación sólida	5
2.2 Hemicelulosas	7
2.3 Hemicelulasas	8
2.4 Modo de acción de la D-mananasa	12
2.5 Hongos filamentosos utilizados	12
2.6 Sustratos sólidos para la fermentación	16
2.7 Métodos de purificación para D-mananasa	17
3. Objetivos	18
4. Materiales y métodos	19
4.1 Microorganismos utilizados	19
4.1.1 Inóculo	19
4.2 Sustratos sólidos utilizados	20
4.3 Equipo de fermentación	20
4.4 Métodos analíticos	21
4.4.1 Densidad de empaque aparente	22
4.4.2 Métodos analíticos realizados al fermento	22
4.4.2.1 Actividad de agua	22
4.4.2.2 Humedad	22
4.4.3 Métodos analíticos realizados al extracto crudo	23
4.4.3.1 pH	23

Página

4.4.3.2 Determinación de proteína 23
4.4.3.3 Preparación del sustrato para actividad enzimática 24
4.4.3.4 Determinación de manosa 24
4.5 Cinéticas de fermentación 26
4.6 Diseño experimental 27
4.7 Preparación del extracto crudo 28
4.7.1 Extracción 28
4.7.2 Centrifugación 28
4.7.3 Ultrafiltración 29
4.7.4 Liofilización 29
4.8 Purificación parcial 29
4.8.1 Equipo utilizado 29
4.8.2 Exclusión molecular 29
4.8.3 Columna de intercambio aniónico 30
4.9 Caracterización 30
4.9.1 Electroforesis 30
4.9.1.1 Electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes 30
4.9.1.2 Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes 31
4.9.2 Zimografía 31
4.9.3 Peso molecular 32
4.9.4 Punto isoeléctrico 33
4.9.5 pH óptimo de actividad y estabilidad al pH 33
4.9.6 Temperatura óptima de actividad y estabilidad a la temperatura 34
4.9.7 Determinación de parámetros cinéticos 34

Página

5. Resultados y discusión

Diseño experimental 35
5.1 Cinéticas de fermentación 35
5.2 Análisis estadístico 39
5.3 Producción de la enzima 43
5.4 Purificación parcial 44
5.4.1 Filtración en gel 44
5.4.2 Columna de intercambio iónico 46
5.5 Caracterización 49
5.5.1 Peso molecular 50
5.5.2 Punto isoeléctrico 52
5.5.3 Temperatura óptima y estabilidad 53
5.5.4 pH óptimo y estabilidad 55
5.5.5 Cálculo de K_M y V_{MAX} 58

6. Conclusiones generales 62

7. Recomendaciones 63

8. Bibliografía 64

Anexos

Anexo 1 69
Anexo 2 75
Anexo 3 76
Anexo 4 78

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis el Dr. Sergio Huerta Ochoa y la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano por su invaluable guía y consejos siempre oportunos.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico. También deseo agradecer al Consejo Británico a través del cual fue posible la presencia del Profesor D. Leo Pyle como sindal en el examen de grado.

A mis amigos y compañeros de la planta piloto 4, Araceli, Rosario, Alejandro, Luciano, Marcos, Oscar, Roselia, Inés, Esteban, Yuri, Gabriel, Margarita, Juan, Cristobal, Gerardo, Tania, Martha y Jésus, por todo lo que me brindaron, soportaron, por sus palabras de apoyo y sobre todo por toda la amistad que me brindaron durante mi estancia en la planta. Gracias por todo.

A Román, Luz y Jaime por su amistad y consejos en momentos difíciles.

A la Dra. Arely Prado por sus palabras de aliento en todo momento y sobre todo por su amistad.

DEDICATORIAS

A mis padres por darme la vida, por soportar mis malos momentos y sobre todo por su invaluable guía y apoyo.

A Martha, Héctor, Guillermina, Guadalupe y Jose Luis, por creer en mi.

A Alejandra, Patricia, Omar y Karla por darme su amor y ganas de vivir.

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 2.1	Estructuras de algunos D-mananos (Dekker y col., 1979). *Manp = manopiranosa; Galp = galactopiranosa; Glcp = glucopiranosa*	9
Figura 4.1	Columna de fermentación.	21
Figura 4.2	Sistema de fermentación empleado .	22
Figura 5.1	Comportamiento de la humedad y actividad de agua (a_W) en el fermento para la fermentación *A. niger*-pasta de copra.	35
Figura 5.2	Desarrollo del pH y producción de proteína en el extracto crudo para la fermentación *A. niger*-pasta de copra.	36
Figura 5.3	Actividad específica en el extracto crudo para la fermentación *A. niger*-pasta de copra.	36
Figura 5.4	Desarrollo de la humedad y actividad de agua para la fermentación *A. oryzae*-bagazo de café en el fermento.	38
Figura 5.5	Producción de proteína y comportamiento del pH en el extracto crudo para la fermentación *A. oryzae*-bagazo de café.	38
Figura 5.6	Actividad específica durante la fermentación *A. oryzae*-bagazo de café.	39
Figura 5.7	Cantidad de proteína y actividad específica de las fracciones eluidas de la columna de filtración en el gel a partir del liofilizado.	45
Figura 5.8	Cromatograma de separación utilizando la columna de intercambio aniónico (mono Q).	46
Figura 5.9	Gel de electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes para el extracto crudo, centrifugación, ultrafiltración y liofilización. MPM = Marcador de Peso Molecular; F-IV = Fracción 4; F-V = Fracción 5.	50
Figura 5.10	Gel de electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes para la etapa de purificación con la columna de intercambio aniónico. MPM = Marcador de Peso Molecular, 1 = 166 KDa; 2= 84 KDa; 3 = 58 KDa; 4 = 45 KDa; 5 = 36.5 KDa; 6 = 26.6 KDa.	51

		Página
Figura 5.11	Gel de zimografía a partir de una electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes en donde aparecen las bandas de actividad de mananasa en *color amarillo.* F-4 = Fracción 4; F-5 = Fracción 5.	51
Figura 5.12	Gel de electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes.	52
Figura 5.13	Temperatura óptima para las fracciones 4 y 5.	54
Figura 5.14	Estabilidad y temperatura óptimas para las fracciones 4 y 5.	55
Figura 5.15	pH óptimo para las fracciones 4 y 5.	56
Figura 5.16	Estabilidad al pH de las fracciones 4 y 5.	56
Figura 5.17	Transformación de Hanus-Wolf para la fracción 4.	58
Figura 5.18	Ecuación de Hanus-Wolf para la fracción 5.	59
Figura 1A	Curva patrón de manosa.	69
Figura 2A	Curva patrón para calcular el contenido de proteína en las muestras.	70
Figura 3A	Curva patrón para determinar el peso molecular de las proteínas.	71
Figura 4A	Cinéticas de actividad volumétrica vs concentración de sustrato para la fracción 4.	72
Figura 5A	Gráfica donde se muestra la forma linearizada de Hanus-Wolf a partir de la ecuación de Michaelis-Menten.	73
Figura 6A	Cinéticas para determinar la velocidad de actividad enzimática para la fracción 5.	74
Figura 7A	Ecuación linearizada de Hanus-Wolf para el cálculo de K_M y V_{MAX} para la fracción 5.	74

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 2.1	Fuentes vegetales de polímeros de carbihidratos que contienen D-manano (Dekker y col., 1979).	9
Tabla 2.2	Organismos productores de D-mananasas (Dekker y col, 1976).	11
Tabla 2.3	Productos de degradación de la hidrólisis enzimática de D-mananasas (Dekker y col., 1976).	13
Tabla 2.4	Intervalos de actividades de agua (a_W) para el crecimiento de algunas especies de *Aspergillus* (Lacey y Magan, 1991).	14
Tabla 2.5	Intervalos de temperatura para el crecimiento de algunas especies de *Aspergillus* (Lacey y Magan, 1991).	15
Tabla 2.6	Metabolitos de interés industrial producidos por *A. niger* y *A. oryzae* (Smith, 1994).	16
Tabla 2.7	Análisis aproximado de los sustratos (Venégas, 1997).	16
Tabla 5.1	Resultados del diseño experimental.	40
Tabla 5.2	Información sobre clases y niveles del análisis estadístico. Número de onservaciones en el conjunto de datos = 24	40
Tabla 5.3	Tabla de análisis de varianza (ANOVA). Donde GL = Grados de Libertad; SS = Suma de Cuadrados; UENZ = Unidades de actividad enzimática.	41
Tabla 5.4	Análisis de interacciones (Tukey) para determinar el mejor tratamiento. Donde TRATA 1 = *A. niger*-bagazo de café-2.5 días; 2 = *A. niger*-bagazo de café-5 días; 3 = *A. oryzae*-bagazo de café-2.5 días; 4 = *A. oryzae*-bagazo de café-5 días; 5 = *A. niger*-pasta de copra-2.5 días; 6 = *A. niger*-pasta de copra-5 días; 7 = *A. oryzae*-pasta de copra-2.5 días; 8 = *A. oryzae*-pasta de copra-5 días; N = Repeticiones.	41

		Pagina
Tabla 5.5	Rendimientos en la preparación del extracto.	43
Tabla 5.6	Rendimientos obtenidos en cada etapa de purificación para las fracciones 4 y 5.	47
Tabla 5.7	Factores de purificación obtenidos para otras mananasas obtenidas por fermentación líquida.	49
Tabla 5.8	Valores de pH para cada fracción obtenidos del extracto crudo en el rotofor.	53
Tabla 5.9	Mananasas purificadas reportadas en bibliografía.	57
Tabla 5.10	Caracterización de las fracciones 4 y 5.	60
Tabla 1A	Diluciones realizadas para preparar la curva patrón de manosa.	69
Tabla 2A	Diluciones realizadas para la preparación de la curva patrón utilizando el método de Bradford (microensayo).	70
Tabla 3A	Pesos moleculares del marcador comercial utilizado.	71

1. INTRODUCCIÓN

Los desechos agrícolas y forestales representan una gran fuente de generación de energía, producción de fibras, químicos, alimentos y otros productos. Una de las principales características de estos materiales es que están formados de compuestos lignocelulósicos en sus paredes celulares. Así, los tres componentes estructurales de todo vegetal son la celulosa, hemicelulosa y lignina los cuales representan el total de los materiales lignocelulósicos. Se encuentran también materiales minoritarios que generalmente están dentro del tejido lignicelulósico y se pueden clasificar como sustancias vegetales solubles en algún solvente. Es posible encontrar en algunos casos polímeros dentro de la madera en pequeñas cantidades como el almidón y pectinas. También se encuentran moléculas de bajo peso molecular de muy diferentes clases como taninos, sustancias fenólicas, terpenos, ácidos grasos, esteroides, monosacáridos y polisacáridos entre otros (Saddler, 1993).

Los desechos sólidos de origen vegetal por sus propias características fisicoquímicas son difíciles de tratar artificialmente pero debido a su misma composición son susceptibles a una biodegradación natural o inducida por el hombre. Por otro lado, la creciente población humana provoca que cada vez sea necesario producir mas alimentos para su sustento por lo que la generación de desechos es cada vez mayor. Debido a las grandes cantidades de alimentos que se producen, se generan por consecuencia cantidades extraordinarias de desechos sólidos creando graves problemas de contaminación debido principalmente a su deficiente disposición. Estos desechos en algunos casos son destinados directamente para alimentación animal sin darles ningún tratamiento creando problemas de digestibilidad por su alto contenido de fibra cruda (McCleary y col., 1985), en otros casos se someten a algún proceso para hacerlos mas disponibles nutricionalmente como el composteo. Sin embargo, la mayor proporción son destinados como combustibles o simplemente vertidos a ríos o lagos provocando graves problemas de contaminación ambiental. Una alternativa biotecnológica es la de utilizar estos residuos para la producción de metabolitos de interés industrial y así darles un mayor valor comercial o para hacer a algunos procesos industriales mas eficientes para considerarlos ahora como subproductos con algún valor comercial.

En la actualidad, se han realizado una gran cantidad de investigaciones encaminadas para el aprovechamiento de estos residuos ya sea para su uso como alimento o para producir moléculas (vía fermentación sólida) de algún interés. Una buena parte de estos estudios se centran hacia la producción de enzimas capaces de hidrolizar

los enlaces lignocelulósicos para aprovechar los subproductos obtenidos (como azúcares fermentables) o para la generación de biomoléculas. De las moléculas mas estudiadas se encuentran las hemicelulasas que hidrolizan a las hemicelulosas y a los enlaces existentes entre la lignina y celulosa favoreciendo la delignificación y generando gran cantidad de polisacáridos.

La mananasa hidroliza al D-manano que es un polímero compuesto principalmente de D-manosa y cantidades considerables de D-galactosa, D-glucosa y D-fructosa. Muchos estudios de mananasas de bacterias, hongos y plantas han sido reportados (Dekker y Richards, 1976) pero aún no existe la suficiente información disponible acerca de sus aplicaciones industriales.

Las enzimas con actividad de mananasa pueden ser usadas para el tratamiento de pasta de copra, harina guar, para tratar alimentos con alto contenido de goma liberando la proteína enlazada a la misma, o para los que tienen alto contenido de fibra cruda para hacerlos mas digeribles (McCleary y col., 1985). Dentro de las posibles aplicaciones de las mananasas a nivel industrial se pueden mencionar las siguientes: (1) bioblanqueo de pulpa en donde se ha visto que la hidrólisis de hemicelulosas en el proceso kraft por hemicelulasas, especialmente por xilanasas y mananasas facilita la extracción de compuestos de lignina (Viikari y col, 1986, 1987; Kantelinen y col., 1988), (2) modificación de propiedades de fibras por hemicelulasas donde las modificaciones enzimáticas de las fibras permiten una disminución en el consumo de energía en la producción de pulpas obtenidas por molienda y calentamiento (pulpas termomecánicas), permitiendo también el reciclamiento de la pulpa, cambiar las propiedades de la pulpa y la producción de pulpas solubles.

Otra característica importante que se logra al modificar las propiedades de las fibras es que se obtienen pulpas mecánicas (pulpas obtenidas por molienda de la madera) de alto rendimiento debido a que la lignina y la mayor parte de las hemicelulosas son retenidas dentro de las fibras y no se pierden como sucede en el blanqueo químico (Jeffries y col., 1990). (3) las hemicelulosas juegan un papel importante en la hidrólisis completa de las hemicelulosas de sustratos aislados para la producción de azúcares monoméricos que pueden ser usados en la producción de químicos. Estos estudios se centran en la hirólisis de xilanos para la producción de por ejemplo xilitol (Onishi y col.,

1966; Hallborn y col., 1991) y ácido xilónico (Buchert y col., 1986). La hidrólisis de glucomananos no ha sido estudiada tan intensamente como la de xilanos siendo una fuente potencial muy importante de polisacáridos, sin embargo se ha estudiado el uso de algunas mananasas para la clarificación de jugos y frutas y procesamiento de desechos de café (Clark y col., 1990; Dekker, 1979). Cabe señalar que el uso de éste tipo de enzimas es cada vez mas amplio y la investigación ya no sólo se basa en la producción de las mismas sino que actualmente se buscan organismos que sean capaces de producirlas en grandes cantidades ya sea naturalmente o utilizando técnicas de biología molecular (Mendoza y col., 1995; Morris y col., 1995).

El objetivo del presente trabajo de tesis fue el de aprovechar algunos de los desechos generados por la agroindustria (borra de café o copra) para producir una enzima (mananasa) vía fermentación sólida. Esta enzima podría ser utilizada en alguno de los tres ejemplos anteriormente mencionados para hacerlos mas eficientes. Por ejemplo esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar al D-manano que cuando se encuentra en proporciones mayores del 0.5% aumenta la viscosidad considerablemente en soluciones (concentrados alimenticios, extractos como el café concentrado, etc.) que lo contengan, al ser hidrolizado vía enzimática esta viscosidad disminuye. Esta característica haría posible aplicarla a algunos procesos como el de la fabricación de café soluble donde el aumento de la viscosidad durante el proceso de evaporación-concentración es factor limitante del mismo. El uso de esta enzima beneficiaria a este proceso de secado haciéndolo mas eficiente. Por otra parte, se trató de darle a estos residuos agroindustriales una alternativa de uso ya que primeramente se buscó producir la enzima y el producto fermentado, después de la extracción de la enzima podría ser utilizado como complemento alimenticio ya que el contenido de proteínas es mayor por el crecimiento del microorganismo inoculado.

El presente trabajo consta de nueve capítulos, en el capítulo dos se presenta una revisión bibliográfica donde se mencionan las principales características de los sustratos utilizados, los microorganismos fermentadores, los modos de acción de la enzima a purificar y caracterizar y los métodos probados para la purificación de las mananasas. En el tercer capítulo se presentan los objetivos que se plantearon para el presente trabajo; en el capítulo cuatro aparecen los materiales y métodos utilizados durante el proceso de fermentación, producción, purificación y caracterización de la enzima; en el capítulo cinco se presentan los resultados obtenidos así como la discusión del los mismos. En el

capítulo seis se presentan las conclusiones a que se llegaron al final del trabajo experimental; en el capítulo siete aparecen las recomendaciones que acuerdo a los resultados del trabajo experimental; en el capítulo ocho se presentan las referencias consultadas durante el desarrollo del trabajo y finalmente en el capítulo nueve aparecen los anexos en donde se presentan las curvas estándares típicas para el cálculo de manosa, proteína, peso molecular de las enzimas, K_M y V_{MAX}, así como los procedimientos de preparación de los amortiguadores y el procedimiento seguido en la etapa de electroforesis.

2. *REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

2.1. Fermentación Sólida

Fermentación en estado sólido se refiere al crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos sin la presencia de líquido libre (Cannel y col., 1980). Hay que diferenciar que fermentación sólida no se refiere a la fermentación de sustratos sólidos en medio líquido sino al aprovechamiento del sustrato sólido que ha absorbido parte del líquido formando una matriz sólida (Cannel y col., 1980). Al definir fermentación en estado sólido se debe tener cuidado ya que en la práctica es difícil definir la frontera entre fermentación en estado sólido y fermentación líquida. El límite superior para la fermentación en estado sólido es mas una función de la absorbancia del material que del contenido de humedad, para muchos sustratos empieza a aparecer agua libre cuando se ha alcanzado el 80 % de humedad. En el otro extremo, muchos procesos biológicos cesan cuando el contenido de humedad esta cerca del 12 %, este nivel es el mínimo en el cual puede ocurrir la fermentación sólida. Hay que tomar en cuenta que entre menor sea el contenido de humedad, la actividad microbiológica se retarda mas (Cannel y col., 1980).

La fermentación en estado sólido es un sistema muy heterogéneo en el cual coexisten las fases sólida, líquida y gaseosa en diferentes proporciones. Este sistema se ha usado para la producción de diferentes metabolitos de interés comercial así como para tratar desechos agroindustriales haciéndolos mas disponibles nutricionalmente (Gowthaman y col., 1995; Hesseltine, 1977).

Este tipo de proceso tiene ventajas y desventajas, dependiendo de que se quiera producir o para que se quiera utilizar. Dentro de las ventajas se pueden mencionar las siguientes (Cannel y Moo-Young, 1980):

- Debido a que el agua libre existente en el medio de fermentación es muy limitada, se obtienen los siguientes beneficios:
  - -El espacio ocupado por el equipo de fermentación es pequeño en relación al rendimiento del producto.
  - -No se producen grandes cantidades de líquido de desecho.
  - -En muchos casos no hay necesidad de filtración y además el producto que se requiere esta concentrado.
  - -El sustrato puede ser utilizado directamente sin tratamiento previo.

-En algunos casos, el producto que se quiere se puede extraer sin el uso de solventes.

- Los problemas de contaminación bacteriana se reducen debido a los bajos niveles de humedad.
- El medio de fermentación es relativamente simple e inclusive, en algunos casos, no es necesario la adición de un medio sintético.
- La aireación no representa problemas cuando los volúmenes de trabajo son reducidos debido a que hay espacio suficiente entre las partículas del sustrato.
- La fermentación en estado sólido se ha utilizado como un proceso para conservar desechos sólidos (ensilado) ya que previene la contaminación por bacterias indeseables y por insectos, además de que el producto que se obtiene fisicoquímicamente es mas estable que el que se obtendría en una fermentación líquida.

Sin embargo, la fermentación en estado sólida tiene sus limitaciones, de hecho la búsqueda de microorganismos adecuados para realizarla es una de ellas. Así, cualquier proceso que utilice bacterias no sería posible llevarlo a cabo en una fermentación sólida ya que estas sólo crecen en medios líquido o semilíquidos (Hesseltine, 1977). Dentro de las desventajas de las fermentaciones sólidas se pueden mencionar las siguientes (Cannel y Moo-Young, 1980):

- El microorganismo para realizar la fermentación en estado sólido es limitante, sólo los hongos, algunas levaduras y estreptomices son capaces de crecer en medios con contenido de humedad bajo.
- A gran escala, el calor generado durante la fermentación es difícil de remover.
- La transferencia de masa en procesos a gran escala es difícil de controlar debido al tamaño heterogéneo de las partículas que forman el sustrato (sobre todo la transferencia de oxígeno) y al grado de empaque de las mismas.
- La medición de los niveles de humedad, pH, oxígeno, CO_2 y productos de la fermentación, es mas difícil en la fermentación en estado sólido.

Por otro lado, La fermentación en estado sólido ofrece grandes posibilidades cuando se utilizan hongos ya que estos crecen en la naturaleza sobre sustratos sólidos como maderas, semillas, troncos, raíces y desechos vegetales así como en partes de animales muertos (piel y

huesos) y materia fecal con baja humedad (Hesseltine, 1987). Aunque muchos de los productos de fermentación comerciales producidos en el mundo occidental se obtienen mediante cultivos sumergidos, los cultivos sólidos ofrecen ventajas potenciales. En Japón por ejemplo, el crecimiento de hongos sobre partículas sólidas (proceso koji) es importante para la producción de enzimas siendo el primer paso en la producción de sake. La fermentación en estado sólido ha sido utilizada para la producción de esporas fúngicas que son usadas como bioinsecticidas (Miller y col., 1983) o para producir a partir de hongos metabolitos de interés comercial como ácido cítrico, alcohol, antibióticos, enzimas y metanol.

Cuando los desechos vegetales para realizar la fermentación no se pueden utilizar directamente por su bajo contenido de nutrientes, es posible complementarlos para su total aprovechamiento (Chriesten y col., 1994). Debido a que los productos de fermentación sólida son más estables al pH, temperatura y fuerza iónica, se promueve actualmente el uso de soportes inertes. Los soportes mas comúnmente estudiados son la amberlita y la espuma de poliuretano los cuales tendrían la ventaja que al ser utilizados como soportes de la fermentación se podrían obtener extractos más limpios y por lo tanto productos más concentrados facilitándose su separación y posterior purificación (Zhu y col., 1995; Gutierrez - Rojas y col., 1995).

2.2. Hemicelulosas

Los compuestos químicos orgánicos de origen vegetal más abundantes en la biósfera lo forman tres grupos de polisacáridos que están clasificados de acuerdo a su abundancia siendo estos la celulosa, hemicelulosa y lignina. Las hemicelulosas, después de la celulosa son el segundo compuesto químico natural en el planeta, de hecho, algunas maderas blandas contienen hasta el 35 % de hemicelulosas. Comúnmente las hemicelulosas están presentes en todas las capas de las paredes celulares de las plantas, pero se encuentran en mayor concentración y fuertemente ligadas a la celulosa y lignina en la capa primaria y secundaria de la pared celular de los vegetales (Timell, 1967).

El término colectivo de hemicelulosa se refiere a un grupo de polisacáridos presentes en las paredes celulares de plantas que son solubles en álcali. Este término fue propuesto por Schulze en 1891 debido a su fuerte asociación de estos polisacáridos con la celulosa

presumiéndose también su papel como precursores de la misma. En la actualidad no se ha comprobado que las hemicelulosas estén involucradas en la síntesis de la celulosa (Hassid, 1969).

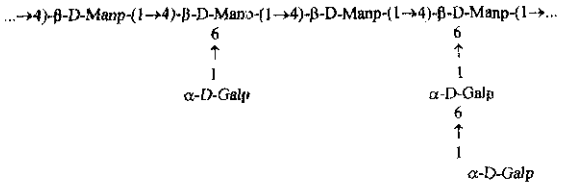
Las hemicelulosas representan a diferentes grupos de polisacáridos que están clasificados de acuerdo a su composición química y estructura, así el L-arabinano es un polimero compuesto de unidades de L-arabinosa, el D-galactano de unidades de D-galactosa, el D-manano por unidades de D-manosa y el D-xilano por unidades de D-xilosa. Sin embargo, en la naturaleza las hemicelulosas no están presentes como homopolisacáridos, es decir, basados en un sólo residuo de azúcar, normalmente se encuentran en forma de heteropolisacáridos compuestos por dos o hasta cuatro diferentes residuos de azúcar (Aspinall, 1959; 1960, Timell, 1964, 1965). Los D-mananos por ejemplo, presentan estructuras químicas muy variadas, algunas de las mas comunes se muestran en la figura 2.1.

Dependiendo del método de extracción de las hemicelulosas (ácido o básico), se obtienen dos fracciones con características fisicoquímicas diferentes, la hemicelulosa A que tiene alto peso molecular, es insoluble en agua y tiene bajo contenido de ácido glucurónico y de arabinosa. La hemicelulosa B en contraste, contiene moléculas fuertemente enlazadas entre si, son solubles en agua, tienen bajo peso molecular y alta concentración de ácido glucurónico y arabinosa.

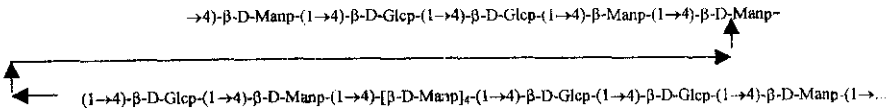
Existen fuentes muy variadas de D-mananos (tabla 2.1) y como se mencionó anteriormente hay varios métodos de extracción de hemicelulosas. Los D-mananos se extraen comunmente por métodos alcalinos, seguidos de lavados y precipitación con alcohol (Shcherbukhin, 1993).

2.3. Hemicelulasas

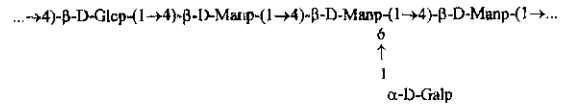
Las enzimas que son capaces de hidrolizar a las hemicelulosas son llamadas hemicelulasas y su clasificación se basa en el residuo de azúcar dominante del sustrato hemicelulósico, con una terminación final de -asa.



a). D-galacto-D-manano de algarrobo.



b). D-gluco-D-manano de tubérculo de konjac.



c). D-galacto-D-gluco-D-manano de gimnospermas

Figura 2.1. Estructuras de algunos D-mananos (Dekker y col., 1979).
Manp = manopiranosa; Galp = galactopiranosa; Glcp =glucopiranosa

Tabla 2.1. Fuentes vegetales de polímeros de carbohidratos que contienen D-manano (Dekker y col., 1979).

a. Galactomananos
• *Ceratonia siliqua*
• Grano de café
• Goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*)
• *Genista scoparia*
• *Gleditschia ferox*
• *Leucaena glauca*
• Alfalfa
• Soya
b: Glucomananos
• *Amorphophallus konjak*
• *Eremurus fuscus*
• *Phaseolus aureus*
• *Picea abies*
• *Pinus banksiana*
• *Tubera salep*
• *Coco*
c. (1→4)-β-D-manano
• Corozo
• *Orchis maculata*
• *Phoenix canariensis*
• *Phytelephas macrocarpa*
• *Tubera salep*

Las hemicelulasas mas comunes son la L-arabinasa, la D-galactanasa, la β-D-mananasa y la D-xilanasa. Cabe señalar que existen otras hemicelulasas que utilizan como sustrato otras fuentes como las paredes celulares de microorganismos o su origen no son vegetales sino bacterias, estas enzimas son la α-D-manasa y la α-D-mananasa. No se incluyen ciertas glucosidasas específicas tales como la α y la β-D-galactosidasa, la β-D-manosidasa, la α-L-arabinofuranosidasa y la β-D-xilosidasa debido a que estas son capaces de hidrolizar glucósidos de bajo peso molecular así como cadenas cortas de polisacáridos o monosacáridos pegados al esqueleto de la hemicelulosa (Dekker, 1975a).

Las hemicelulasas son producidas por una gran variedad de microorganismos tales como bacterias (rumen de bovinos y del tracto digestivo de insectos), protozoos, crustáceos y semillas de vegetales en proceso de germinación. Estas enzimas no se han encontrado en el tracto digestivo de vertebrados (incluyendo al hombre) por lo que la asimilación por el organismo de las hemicelulosas que se ingieren depende única y exclusivamente de la flora bacteriana del tracto digestivo.

Las D-mananasas son producidas por una gran variedad de organismos (tabla 2.2). Las D-mananasas son enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar los enlaces (1→4)-β-D-manopiranosil de los D-mananos y los D-galacto-D-mananos aunque también se ha reportado que enzimas producidas por *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger* son capaces de degradar D-gluco-D-mananos de konjac (*Amorphophallus konjac*) produciendo D-glucosa, D-manosa y una serie de mano y de glucomano-oligosacáridos. En general se han encontrado dos mecanismos por los cuales los polisacáridos son degradados enzimáticamente: (1) el mecanismo exo en el cual el polisacárido es degradado por remoción sucesiva del azúcar terminal o unidades de oligosacáridos de la cadena polimérica; las enzimas de tipo exo son difíciles de distinguir debido principalmente a que degradan oligosacáridos de grado de polimerización (dp) mayor a dos. Solo se ha probado la existencia de una enzima de tipo exo que es el caso de la exo-L-arabinanasa. Y, (2) las hemicelulasas de tipo endo son mas comunes, en este caso la cadena polisacárida es degradada aleatoriamente liberándose una mezcla de oligosacáridos por lo que si se quiere la hidrólisis total del polisacárido es necesario hidrolizarlo sucesivamente en varias etapas.

Tabla 2.2. Organismos productores de D-mananasas (Dekker y col., 1976).

Organismo	Especie
Bacterias	*Bacillus aroideae*
	mesenteraticus
	subtilis
	Sporocytophaga myxococcoides
Rumen bacteriano	*Streptococcus sp.*
Rumen de protozos	*consorcio*
Hongos	*Aspergillus awamori*
	fumigatus
	giganteus
	niger
	oryzae
	wentii
	Botrytis cinerea
	Chrysosporium lignorum
	Fusarium culmorum
	Penicillium chrysogenum
	expansum
	funiculosum
	isariiforme
	notatum
	paxillus
	piscarium
	Phellinus igniarus
	Polyporus betulinus
	Puccinia graminis
	Rhizopus niveus
	Sclerotium rolfsii
	Trametes versicolor
	Trichoderma viride
Plantas	
a) Terrestres	*Amorphophallus konjac* (tubérculo)
	Asparagus officinalis (semilla)
	Cyamopsis tetragonolobus (semilla)
	Leucaena glauca (semilla)
	Medicago sativa (semilla)
	Phoenix dactylifera (semilla)
b) Marinas (algas)	*Cladophora rupestris*
	Laminaria digitata
	Rhodymenia palmata
	Ulva lactuta
Animales (invertebrados)	*Astacus fluviatilis*
	Helix pomiata
	Homarus vulgaris M-E
	Gypsoma acariana
	Melasoma populi
	Melolotha vulgaris
	Polyphylla fullo
	Rhagium inquisitor L.
	Sciapteron tabaniformis

Por otra parte la actividad hidrolítica de las mananasas se ve influenciada por la cantidad de galactosa que se encuentra unida al esqueleto del (1→4)-β-D-manano. Se ha demostrado que los polisacáridos con alto número de galactosa sustituida afectan fuertemente la actividad de la β-D-mananasa; por ejemplo, la goma guar cuya relación galactosa:manosa es 1:2 y alfalfa cuya relación galactosa:manosa es 1:1, reducen sustancialmente la actividad enzimática. En estos casos es necesario un pretratamiento del galactomanano para eliminar la mayor parte de la galactosa y sea mas susceptible al ataque enzimático.

2.4 Modo de acción de la D-mananasa

Las D-mananasas de origen fúngico degradan el D-manano en forma aleatoria y son de tipo endo. Los productos de la degradación enzimática de varias D-mananasas se muestran en la tabla 3.3. En general los D-mananos son degradados produciendo una mezcla de mano-oligosacáridos con grados de polimerización ≥ 2 (dp ≥ 2) y mezclas de D-manosa con oligosacáridos que contienen D-galactosa (de galactomanano) o de D-glucosa (de glucomananos). La mezcla de oligosacáridos resultantes de la hidrólisis enzimática de galactoglucomananos contienen D-galactosa, D-glucosa y D-manosa. Algunas D-mananasas de *Aspergillus niger* (Eriksson y col., 1968) degradan mano-oligosacáridos con un dp ≥ 3 liberando D-manosa y manobiosas. Las D-mananasas de *Rhizopus niveus* degradan el galactomanano del grano de café liberando manobiosas, manotriosas, manotetrosas y manopentosas y una mezcla de oligosacáridos con un dp ≥ 7. Las características de las enzimas capaces de degradar mano-oligosacáridos con un dp ≤ 5 puede indicar que el número de sitios de enlace y por lo tanto los sitios activos de la enzima debe ser mayor a 5 para la formación efectiva del complejo enzima-sustrato y para una hidrólisis efectiva.

2.5 Hongos filamentosos utilizados.

Como ya se mencionó anteriormente, los microrganismos más idóneos para crecer en medios donde la cantidad de agua es mínima son los hongos. Las especies de *Aspergillus* han sido de los primeros hongos que han sido cultivados en medios artificiales y estudiados por sus propiedades bioquímicas y por encontrarse comunmente en el ambiente. Desde tiempos

ancestrales, algunas especies de *Aspergillus* han sido usadas en la fermentación de alimentos como en Japón y otros paises asiáticos. Sin embargo, en la actualidad juegan un papel biotecnológico importante por su capacidad de producir metabolitos de importancia comercial.

Tabla 2.3. Productos de degradación de la hidrólisis enzimática de D-mananasa (Dekker y col., 1976).

Fuente de D-mananasa	Fuente de D-manano	Productos de degradación
Aspergillus niger	*Goma guar*	M_2, M_3
A. niger van Tieghen	Soya	M_2-M_4
	Goma guar	M_1-M_4, mezcla de oligosacáridos
Rhizopus niveus	Café	M_1-M_3, mezcla de oligosacáridos, glucosa
Aspergillus wentii y *Polyporus schweinitzii*	Nuez de marfil	M_1, mano-oligosacáridos con un dp ≥ 2
	Frijol	M_1, mano-oligosacáridos con un dp ≥ 2, mezcla de oligosacáridos
	Goma guar	Mano-oligosacáridos con un dp ≥ 2, mezcla de oligosacaridos

M_1 = manopiranosa, M_2 = manobiosa, M_3 = manotriosa, M_4 = manotetrosa, dp = grado de polimerizacíon.

La primera descripción de *Aspergillus* data de 1727 cuando Micheli ilustró las características de este género; a la fecha el género *Aspergillus* contiene mas de 200 especies clasificadas (Samson, 1985). La estructura morfológica es la característica mas importante para la clasificación del género, las especies típicas producen conidiosporas con septos que terminan en vesículas o también pueden crecer células conidiógenas (filiades). Estas filiades producen conidias grandes y largas con diferente pigmentación y ornamentación. Estas estructuras pueden ser vistas con ayuda de un microscopio. En adición a la estructura típica de los *Aspergillus*, algunas especies pueden producir cuerpos fructíferos, células "Hulle" y "escloritias". Las colonias de *Aspergillus* presentan color y diamétro no específico característico del micelio vegetativo, tienen crecimiento superficial y producen pigmentos solubles (color en el agar alrededor de la colonia).

El género *Aspergillus* tiene una amplia variedad de habitats. Son comunes como saprófitos en el suelo, otros crecen en alimentos almacenados y productos alimenticios o en vegetación en vía de putrefacción (Domsch y col., 1980). Como los *Aspergillus* son hongos filamentosos, existen factores como el agua, temperatura, pH y composición de gas que tienen una profunda influencia en su crecimiento y biosíntesis de micotoxinas. Así, se reconoce que

los efectos de estos parámetros fisicoquímicos pueden proveer metodologías para prevenir su crecimiento y producción de micotoxinas en alimentos o para producir otros metabolitos de interés. Los requerimientos de actividad de agua (a_w) difieren en las diferentes especies de *Aspergillus* (tabla 2.4) y por lo tanto, la presencia de una especie en particular de un hongo un alimento o en algún otro soporte ofrece un buen indicio de la cantidad de agua que contiene cada una de ellos.

Tabla 2.4. Intervalos de Actividad de agua (a_w) para el crecimiento de algunas especies de *Aspergillus* (Lacey y Magan, 1991).

	Actividad de agua (a_w)	
Especie	**Mínima**	**Óptima**
A. penicillioides	0.76	0.91-0.93
A. candidus	0.74-0.79	0.98
A. ochraceus	0.76-0.84	
A. niger	0.74-0.85	0.98
A. wentii	0.73-0.84	0.94-0.96
A. nidulans	0.79-0.83	0.96-0.98
A. terreus	0.74-0.82	0.95-0.97
A. versicolor	0.71-0.79	
A. flavus	0.71-0.79	0.98
A. oryzae	0.74	
A. parasiticus	0.71	
A. fumigatus	0.84-0.86	0.97
A. melleus	0.86	

La mayor parte de los hongos son mesófilos, crecen a temperaturas dentro del intervalo de 10 a 40 °C. El género *Aspergillus* crece en temperaturas que van de 10 a 30 °C. Sin embargo, es conocido que algunas especies del mismo género crecen fuera de este intervalo. La tabla 2.5 enlista los intervalos de temperaturas de crecimiento de algunas especies de *Aspergillus* donde se muestran los intervalos donde es factible el crecimiento de cada género de hongo indicado.

Por lo que respecta al pH, es muy difícil controlarlo ya que algunos hongos son capaces de producir ácido, disminuyendo el pH del sustrato en el que estan creciendo. Sin embargo, cuando se cambia el pH del medio, éste afecta marcadamente los procesos metabólicos modificando los límites de a_w en el cual ocurre la germinación y crecimiento del hongo (Gottlieb, 1978).

Tabla 2.5. Intervalos de temperatura para el crecimiento de algunas especies de Aspergillus (Lacey y Magan, 1991).

	Temperatura (°C)	
Especie	**Intervalo**	**Óptimo**
A. clavatus	5-42	25
A. fumigatus	12-65	37-43
A. terreus	11-48	35-40
A. versicolor	4-40	21-30
A. candidus	3-44	25-32
A. ochraceus	12-37	27
A. flavus	6-45	25-37
A. niger	9-60	17-42
A. flavipes	6-40	26-29
A. oryzae	9-50	27-32
A. ustus	6-42	25-28

Aspergillus niger puede crecer en un intervalo de pH de 1.5-9.8, *A. candidus* de 2.1-7.7. Así se ha encontrado una gran variedad de intervalos óptimos de crecimiento para cada variedad de *Aspergillus*. Magan y Lacey (1984) encontraron que cuando se altera el pH de 6.5 a 4 el tiempo de germinación se alarga para un número importante de *Aspergillus* y *Penicillium*, incrementándose de 1-2 días a 6-7 días. El mismo cambio de pH también causa que la a_w mínima para la germinación se incremente 0.02 a 0.05 a temperaturas marginales.

El crecimiento de las especies de *Aspergillus* también puede ser alterada por cambios en las concentraciones de CO_2 y O_2. Para que cese la germinación y el crecimiento micelial los niveles de CO_2 se deben incrementar y los de O_2 disminuir. Sin embargo, estos efectos son mas marcados si la a_w y la temperatura interactuan a la vez. Magan y Lacey (1984) mostraron que la fase lag para la germinación puede incrementarse de 10-20 días a una a_w de 0.90-0.85 y a 1% de O_2, pero cuando el a_w aumenta a 0.98 en presencia del aire ambiental, ésta se reduce a pocos días.

La mayor parte de los hongos filamentosos crecen naturalmete en medios sólidos, este crecimiento puede ocurrir sobre la superficie o dentro del sustrato dependiendo de su porosidad. Las fermentaciones sólidas a nivel industrial se han desarrollado grandemente a partir de alimentos fermentados tradicionales, quesos, fermentaciones orientales, fermentaciones vegetales, carnes y otros productos dando pie a la moderna industria biotecnológica para la producción de antibióticos y enzimas. A escala industrial, la mayor parte

de las fermentaciones disminuyen costos del produto final. La tabla 2.6 muestra algunos usos a nivel industrial para *A. niger* y *A. oryzae* en la producción de metabolitos de interés industrial (Smith 1994).

Tabla 2.6. Metabolitos de interés industrial producidos por *A. niger* y *A. oryzae* (Smith, 1994).

	Aspergillus oryzae	***Aspergillus niger***
Metabolitos	Amilasas	Ácido cítrico
	Proteasas	Pectinasas
	Pectinasas	Alimento enriquecido
	Lipasas	

2.6 Sustratos sólidos para la fermentación sólida

Los soportes para realizar la fermentación sólida para la producción de la D-mananasa deben tener como característica la de ser ricas en algún derivado de D-manano. Estos sustratos con tales características son la copra y borra de café. Datos proporcionados por el INEGI indican que nuestro país ocupa el cuarto lugar a nivel mundial de producción de café. Se reporta también que en diciembre de 1995 se produjeron 1 306 toneladas de café soluble produciéndose por lo tanto grandes cantidades de desperdicios (bagazo de café). Los desechos sólidos generados en el proceso de obtención de café soluble tienen un alto contenido de hemicelulosas constituyendo cerca de la tercera parte del mismo (Potter y col., 1973). Por otra parte, México también es un importante productor de aceite de coco proceso del cual se generan cantidades considerables de pasta de copra la cual es considerada como desecho. Esta pasta contiene de 40 a 50% de galactomanano generándose anualmente 33 000 toneladas aproximadamente. En la tabla 2.7 se presenta el análisis bromatológico de los sustratos ricos en mananos.

Tabla 2.7. Análisis aproximado de los sustratos (Venégas, 1997).

	Bagazo de café (% en peso)	**Copra (% en peso)**
Grasa	28.58	5.48
Humedad	3.8	7.01
Proteína	16.8	20
Taninos	7.6	ND
Azúcares reductores	0.021	9.16
Ácido clorogénico	3.46	ND

2.7 Métodos de purificación para D-mananasa

Las D-mananasas ha sido purificadas por una gran variedad de métodos fisicoquímicos. Los mas comunes son los que utilizan precipitación con sales o solventes, filtración en gel o por columna de intercambio iónico acopladas entre si o utilizando una sola etapa de purificación. Dentro de los métodos mas comunes se pueden mencionar los siguientes: cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa (Sugiyama y col., 1973)) DEAE-Sephadex (Emi y col., 1972, Reese y col., 1965), Duolite A-2 (Emi y col., 1972) y SE-Sephadex (Emi y col., 1972); por cromatografía de permeación en gel o Bio-gel P-150 (Eriksson y col., 1968), Sephadex G-75 (Emi y col., 1972, Eriksson y col., 1968) y Sephadex G-100 (Sugiyama y col., 1973); por isoelectroenfoque (pH 3-10) en 1,2-etanodiol (75 %v/v) o sacarosa (50 % p/v) (Eriksson y col., 1969); por electroforesis en zona sobre Sephadex G-25, Sephadex G-75 o poliacrilamida (Emi y col., 1972). La cromatografía de afinidad (Emi y col., 1972) ha sido utilizada para remover α-amilasas de preparaciones de D-mananasas que estan presentes en preparaciones de almidón de maíz, las D-mananasas han sido cristalizadas con soluciones de sulfato de amonio y acetona (Hylin y col., 1964).

3. OBJETIVOS

Los objetivos planteados para el presente trabajo fueron los siguientes:

GENERAL.

- Mediante procedimientos fisicoquímicos purificar parcialmente y caracterizar la D-mananasa producida por fermentación sólida utilizando *Aspergillus sp.*

PARTICULARES.

- Seleccionar el microorganismo mas idóneo (*Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*), el mejor sustrato (copra o bagazo del café) así como el tiempo de fermentación en el cual se produce la mayor actividad enzimática.

- Purificar parcialmente la enzima mediante procedimientos separar y purificar parcialmente la D-mananasa utilizando separación por peso molecular (tamiz molecular) y cromatografía de intercambio iónico y/o aniónico (FPLC), determinando para cada etapa de separación: rendimiento, proteína, actividad enzimática y actividad específica.

- Caracterizar la D-mananasa parcialmente purificada determinando su estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura, peso molecular, punto isoeléctrico, y parámetros cinéticos (K_M y V_{MAX}).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos utilizados

Las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron las siguientes:

a). *Aspergillus niger*, cepa aislada de pasta de copra en la planta piloto 4 en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa la cual fue propagada en PDA (Bioxon®) a 30 °C y mantenida en el mismo medio en refrigeración a 4°C. Esta cepa fue resembrada cada mes en el medio anteriormente mencionado.

b) *Aspergillus oryzae*, cepa 2094 de la colección española de cultivos tipo. Esta cepa fue propagada en PDA a 30°C y mantenida en el mismo medio a 4°C, fue resembrada cada mes bajo las mismas condiciones que *A. niger*.

4.1.1 Inóculo

La preparación del inóculo fue la siguiente:

1. Se propagó el microorganismo en PDA utilizando matraces erlenmeyer de 250 ml en una incubadora (Felisa®) a 30°C durante 3 días para *Aspergillus niger* o 4 días para *Aspergillus oryzae*.

2. Se preparó una solución de Tween 80 (Sigma®) al 0.1% (v/v) para realizar la extracción de esporas.

3. Se agregó 50 ml de la solución anterior a los matraces que contenían al microorganismo y se agitó durante 15 minutos para realizar la extracción.

4. Terminada la extracción, se realizó una dilución 1:10 con la solución de tween 80 para el conteo de esporas.

5. El conteo de esporas se realizó utilizando una cámara de Neubauer (Boeco®) y un microscopio de fases (Zeizz®). De los 25 cuadros de la cámara Neubauer se tomaron al azar 10 contándose las esporas presentes en ellos para posteriormente obtener un promedio. El número de esporas por ml se calculó mediante la siguiente fórmula:

(Promedio) X (25) X (Dilución) X ($1x10^4$) = Número de esporas por ml

El número de esporas que se inocularon por gramo de materia seca fue de $2x10^7$

4.2 Sustratos sólidos utilizados

Los sustratos sólidos utilizados para realizar las fermentaciones fueron los siguientes:

a). Bagazo de café. Obtenido de la Compañía Nestle S.A. Se sometió a un secado a la intemperie para eliminar el exceso de agua. El contenido de agua al final de este proceso fue del 3%. La borra se conservó en bodega a temperatura ambiente.

b). Copra. Se obtuvo de la Compañia Hidrogenadora Nacional S.A. La copra se sometió a un molido (por aspas), posteriormente se tamizó utilizando mallas 20 y 30 el producto obtenido de entre estas mallas fue el que se utilizó para llevar a cabo las fermentaciones, se determinó el contenido de humedad que fue del 5% (ver sección 4.4.2.2). La copra y el producto tamizado se conservó en bodega a temperatura ambiente.

4.3 Equipo de fermentación

Para realizar las fermentaciones se utilizaron los siguientes equipos:

1. Columnas de vidrio con un diámetro de 2.5 cm y una altura de 20 cm (Raimbault, 1980)
2. Humidificadores de diámetro 2.5 cm y una altura de 10 cm (figura 4.1).
3. Pecera de 40 cm de altura x 40 cm de ancho x 60 cm de largo (figura 4.2).
4. Termostato (Heto®) con controlador de flujo de agua
5. Compresor de aire

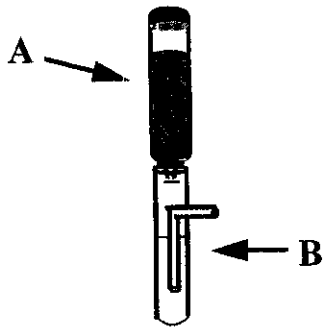


Figura 4.1 Columna de fermentación
A: Columna de fermentación; B: Humidificador.

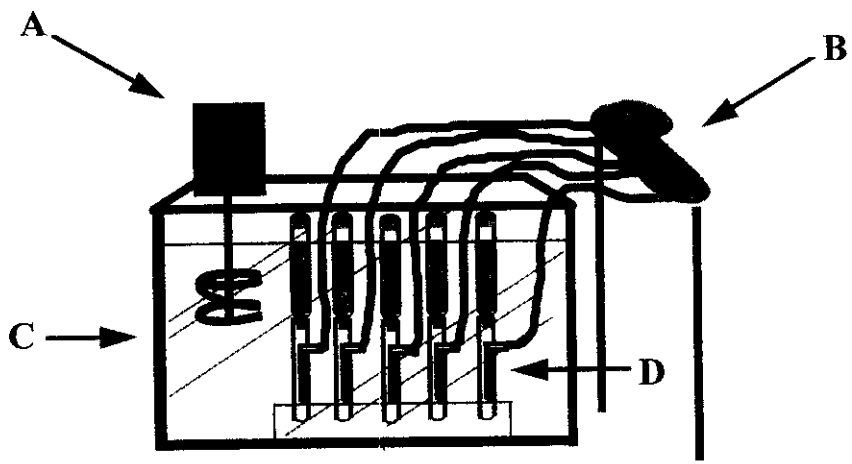


Figura 4.2. Sistema de fermentación empleado
A: Controlador de temperatura; B: Distribuidor de aire; C: Pecera; D: Columnas de fermentación.

4.4 Métodos analíticos

El producto de la fermentación que se obtuvo del diseño experimental se sometió a varios análisis para determinar el comportamiento de la fermentación a través del tiempo. Primeramente se determinó la densidad de empaque mas adecuada y

posteriormente al fermento se le midió la actividad de agua y humedad. A cada columna se le realizó una extracción y al extracto enzimático crudo se le determinó pH, proteína extracelular producida así como la actividad mananasa.

4.4.1. Densidad de empaque aparente

Para determinar la densidad de empaque aparente se realizaron pruebas de absorción de agua para cada uno de los sustratos investigados (bagazo de café y copra). Esta prueba consistió en adicionar diferentes cantidades de agua al sustrato para determinar la capacidad de retención del mismo sin que existiera escurrimiento de la misma. Una vez que se determinó la mejor relación agua-sustrato se procedió a calcular la densidad de empaque aparente. Esta prueba consistió en adicionar la mezcla agua-sustrato a las columnas de fermentación para seleccionar la densidad de empaque adecuada para llevar a cabo la fermentación permitiendo que el aire pasara libremente a través de toda la columna.

4.4.2 Métodos analíticos realizados al fermento

Durante y al final de la fermentación, el producto fermentado (fermento) se sometió a diferentes análisis para monitorear el comportamiento de la fermentación a través del tiempo

4.4.2.1 Actividad de agua

La actividad de agua se determinó por medio de un aparato AQUA-LAB® CX-2, tomando para cada análisis aproximadamente 2 g de fermento.

4.4.2.2 Humedad

La humedad se determinó mediante diferencia de peso. El procedimiento fue el siguiente:

a). Se pesaron de 2 a 3 g del fermento.

b). Se dejó secar en estufa (FELISA®) por espacio de 24 horas a 60 °C.

c). Por diferencia de peso se determinó el por ciento de humedad de la muestra (fermento).

4.4.3 Métodos analiticos realizados al extracto crudo

El fermento se sometió a una extracción con agua destilada utilizando presión hidráulica (ver punto 4.7.1). El extracto crudo se analizó determinando pH, proteína y actividad enzimática.

4.4.3.1 pH

Se utilizaron 20 g del fermento y se adicionó 20 ml de agua destilada. Se agitó durante 5 minutos, se determinó el pH haciendo uso de un potenciómetro (Conductronic® pH 20).

4.4.3.2 Determinación de proteína

Para determinar el contenido de proteína se realizó la técnica de *Bradford* (1976) utilizando el Kit comercial de BIO-RAD® (microensayo). La metodología que se siguió tanto para la preparación de la curva patrón como para el análisis de las muestras fue la siguiente:

1. Se pipeteó 800 µl de muestra en tubos de prueba.
2. Se adicionó 200 µl de reactivo concentrado y se mezcló.
3. Se incubó a temperatura ambiente por espacio de 5 minutos.
4. Pasado el tiempo de incubación se leyó a 595 nm (Shimadzu®, UV-160A).

Para la preparación de la curva patrón se utilizó una solución de albúmina sérica de bovino (Sigma®) como solución patrón con una concentración de 1 mg/ml. Se realizó una dilución lo suficientemente pequeña para estar dentro del intervalo de sensibilidad de

la prueba (2 - 11 µg de proteína/ml). La curva patrón característica se muestra en la figura 2A del anexo 1.

4.4.3.3 Preparación del sustrato para actividad enzimática

Para preparar el sustrato necesario para realizar las prueba de actividad enzimática se utilizó goma de algarrobo de Sigma® a una concentración de 0.5 %. El procedimiento de preparación del sustrato fue el siguiente:

1. Se pesó 0.5 gramos de harina de algarrobo.
2. Se adicionó a 100 ml de agua destilada a 80 °C.
3. Se llevó a ebullición.
4. La solución se dejó en agitación por 24 horas a temperatura ambiente.
5. Se centifugó para eliminar la goma no disuelta.
6. El sobrenadante se conservó en refrigeración a 4°C.

Esta solución fue preparada cada mes.

4.4.3.4 Determinación de manosa

Para la determinación de manosa se utilizó el método de Sinner (1978). El procedimiento fue el siguiente:

Se prepararon cuatro diferentes celdas por muestra (blanco para calibración, blanco para sustrato, blanco para celda y muestra) con un volumen total de 50 µl para cada una. La preparación de los tubos de prueba fue la siguiente:

1. Blanco de calibración: 50 µl de agua destilada.

2. Blanco de sustrato: 25 µl de solución de sustrato de goma de algarrobo y 25 µl de agua destilada.

3. Blanco caldo: 25 µl de caldo y 25 µl de agua destilada.

4. Muestra: 25 µl de caldo y 25 µl de solución de sustrato (harina de algarrobo).

Los blancos y las muestras se incubaron durante 10 minutos a 50 °C, pasado este tiempo se adicionó a cada tubo de prueba 1 ml de una mezcla de soluciones A y B.

Las soluciones A y B se prepararon de la siguiente manera:

Reactivo A:

4.4' - Dicarboxi-2,2'-biquinolina (Sigma®).	0.65g.
Carbonato sódico anhídro (Baker®).	0.36g.
Agua destilada	500 ml.

Reactivo B:

Solución 1:	Ácido aspártico (Sigma®).	3.7g.
	Carbonato sódico anhídro(Baker®).	5.0g.
	Agua destilada	100 ml.
Solución 2:	Sulfato de cobre (II) (Baker®).	3.7g
	Agua destilada.	40 ml.

El reactivo B se prepara mezclando las soluciones 1 y 2 y se lleva hasta un volumen final de 150 ml con agua destilada. Posteriormente las soluciones A y B se mezclan en una proporción de 23:1 respectivamente.

Adicionada la mezcla de los reactivos A y B, los tubos de prueba se incubaron 10 minutos a 80 °C, al término de este tiempo los tubos se enfriaron en a 4 °C. La absorbancia se determinó a 562 nm (Shimadzu®, UV-160A).

La absorbancia que se obtiene determina la cantidad de azúcares reductores producidos por la hidrólisis enzimática por lo que la actividad enzimática se mide en

unidades de actividad. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que causa la liberación de 1 μmol de D-manosa por minuto bajo condiciones definidas de temperatura (50 °C), fuerza iónica (fosfatos, 25 mM) y pH (7.6).

Con anterioridad se preparó una curva estándar con D-manosa (Sigma®) con una concentración de 1 g/l para poder correlacionar la absorbancia con los azúcares reductores producidos por la hidrólisis enzimática. La curva patrón característica se muestra en la figura 1A del anexo 1.

4.5 Cinéticas de fermentación

Se realizaron dos cinéticas para determinar el tiempo de producción de la enzima. Solo se varió el microorganismo y el sustrato.

Las condiciones a las cuales se llevaron a cabo las fermentaciones fueron las siguientes:

Densidad de empaque: 0.6 g/cm^3
Flujo de aire: 10 ml/min
Temperatura de fermentación: 30 °C
Número de esporas/g de materia seca: 2 x 10^7
Sustrato: Bagazo de café o copra
Microorganismo: *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*
Humedad inicial: 60%
Tiempo de fermentación: 5 días

Se analizaron columnas cada 12 horas (por duplicado). Cuando el sustrato utilizado fue bagazo de café se agregó de un medio salino cuya composición fue la siguiente: 0.5 g/l de CaCl, 0.01 g/l de $FeSO_4$ $7H_2O$, 7.57 g/l de K_2HPO_4, 2.32 g/l de KH_2PO_4, 0.20 g/l de $(NH_4)_2SO_4$ y 5 g/l de extracto de levadura.

4.6 Diseño experimental.

Una vez que se obtuvo el tiempo de producción de la enzima, se diseñó un experimento factorial 2^2 para determinar la interacción mas adecuada para la producción de enzima entre *Aspergillus niger-Aspergillus oryzae* y Bagazo de café-Copra. La densidad de empaque, flujo de aire, temperatura de fermentación, humedad inicial y número de esporas por gramo de materia seca fueron similares a las de las cinéticas de fermentación, únicamente se cambiaron algunas variables que fueron los siguientes:

Tiempo de fermentación = 2.5 y 5 días
Variables respuesta = Actividad enzimática (específica).
Unidad experimental = Fermentadores (24).
Tratamientos = Dos (bagazo de café y copra).
Repeticiones = Tres por fermentador.
Microorganismos = Dos (*Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*).

Por el tipo de experimento se realizaron 4 diferentes fermentaciones probándose las interacciones *Aspergillus niger*-bagazo de café, *Aspergillus niger*-Copra, *Aspergillus oryzae*-bagazo de café y *Aspergillus oryzae*-Copra a dos diferentes tiempos (2.5 y 5 días) con tres repeticiones haciendo un total de 24 experimentos.

Las hipótesis a probar o rechazar fueron las siguientes:

Ho : La producción de enzima no se ve influenciada por el tipo de sustrato utilizado (bagazo de café y copra) ni por el microorganismo (*A. oryzae* y *A. niger*) durante la fermentación sólida.

Ha : El tipo de sustrato y microorganismo si tiene influencia sobre la producción de enzima (mananasa).

Donde **Ho** representa a la hipótesis nula y **Ha** la hipótesis alternativa.

Para la toma de decisión fue necesario someter los datos a un análisis estadístico, para esto se utilizó el paquete SAS cuyo listado aparece en el anexo 3.

4.7 Preparación del extracto crudo

Terminada la fermentación, el fermento se sometió a una extracción, centrifugación, ultrafiltración hasta obtener un liofilizado que sería utilizado para la purificación de la enzima. Este punto tenía como objetivo tener un mismo lote de extracto y no hacer fermentaciones cada vez que se terminara éste, disminuyendo así las posibles variaciones en el método de purificación.

4.7.1. Extracción

Se agregó al fermento una cantidad de amortiguador en una relación 1:1 es decir, terminado el tiempo de fermentación se pesó la muestra fermentada y se agregó una cantidad igual de amortiguador, se mezcló perfectamente y la extracción se realizó mediante prensado hidraúlico (ERKCO® modelo PH-51T) a 2000 psi.

4.7.2 Centrifugación

El extracto se centrifugó a 12000 x g a 4 °C por 15 minutos utilizando una centrífuga Beckman. Se decantó para eliminar las células y materia orgánica.

4.7.3 Ultrafiltración

El extracto se concentró utilizando un sistema de ultrafiltración Minitan® (Millipore®) con membranas Minitan® (Minitan® Plates, Millipore®) de un tamaño de corte de 10000 Daltons. La ultrafiltración se llevó a cabo por 16 horas en cuarto frío a 4°C.

4.7.4 Liofilización

El volumen obtenido de la ultrafiltración se congeló con una mezcla hielo seco-acetona, posteriormente se liofilizó en un liofilizador Heto®. El producto final se mantuvo en desecadores.

4.8 Purificación parcial

Una vez que se obtuvo el liofilizado se procedió a la purificación parcial de la enzima. Primeramente se hizo una separación por peso molecular y posteriormente una separación por intercambio iónico

4.8.1 Equipo utilizado

Para realizar la purificación de la enzima se utilizó un equipo FPLC (Fast Performance Liquid Cromatography) de la marca BIO-RAD® Biologic LP® acoplado a columnas de exclusión molecular P6 (BIO-RAD®) o de intercambio iónico Mono Q (BIO-RAD®).

4.8.2 Exclusión molecular

La purificación se inició a partir del liofilizado obtenido en el punto 4.7.4, tomando cantidades conocidas del mismo (0.5-0.6 g de liofilizado). A este liofilizado se le adicionaron 5 ml de amortiguador de fosfatos (25 mM, pH 7.6, anexo 2) para resuspenderlo y se mantuvo a 4°C. El liofilizado resuspendido se filtró utilizando una membrana de 0.45 µm (Phenomenex®). Del filtrado se tomaron 1.5 ml los cuales se inyectaron en un FPLC conectado a una de columna exclusión molecular para eliminar las sales del amortiguador y realizar a la vez una separación parcial por peso molecular. La velocidad de flujo fue de 0.2 ml/min. Se obtuvieron diferentes fracciones a las cuales se les determinó proteína y actividad enzimática.

4.8.3 Columna de intercambio aniónico

Las fracciones que presentaron actividad obtenidas en el punto anterior se mezclaron y se tomaron muestras de 1.5 ml las cuales se inyectaron a un FPLC conectado a una columna de intercambio aniónico previamente estabilizada con el mismo amortiguador. La D-mananasa fue recuperada de la columna por aplicación de un gradiente escalonado con concentraciones de 0-5, 5-9 y 9-20% de NaCl. La velocidad de

flujo utilizada para esta separación fue de 2 ml/min. A cada una de las fracciones obtenidas se les determinó proteína y actividad enzimática.

4.9 Caracterización

Terminada la purificación parcial se procedió a la caracterización de la enzima la cual consistió en determinar el peso molecular, punto isoeléctrico, pH de estabilidad óptimo y su estabilidad al pH, temperatura de estabilidad óptima y la estabilidad a diferentes temperaturas, y finalmente la determinación de varibles cinéticas como K_M y V_{MAX}.

4.9.1 Electroforesis

La electroforesis tuvo dos objetivos, el primero fue el de determinar el peso molecular aparente de la enzima para lo cual se realizó una electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y el segundo objetivo fue el de monitorear el proceso de separación relacionándolo con la actividad enzimática. Para esto se realizó una electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes acoplada a una técnica de zimografía.

4.9.1.1 Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes

Se realizó una electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) propuesto por Laemmli (1970). Se tomaron 20 µl de muestra los cuales tenían una concentración de proteína de 1-2 mg/ml. El gel de acrilamida-bisacrilamida utilizado para realizar la electroforesis fue del 12 %. La preparación de las soluciones utilizadas y el procedimiento seguido se presenta en el anexo 4.

4.9.1.2 Electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes

Esta electroforesis se realizó con el fin de no desnaturalizar la enzima y acoplarla a una técnica de zimografía para determinar la actividad enzimática durante el proceso de purificación.

Para realizar esta técnica se preparó un gel acrilamida-bisacrilamida al 12 % siguiendo los procedimientos propuestos por Reisfeld (1962) y Rothe (1986). Se tomaron 20 µl de muestra con una cantidad de proteína de 1-2 mg/ml. El procedimiento seguido se muestra en el anexo 4.

4.9.2 Zimografía

Se modificó la técnica reportada por Beguin (1983) y se acopló a la técnica de electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes. El objetivo de esta técnica fue la de determinar la actividad enzimática presente en las proteínas separadas durante la purificación parcial. La metodología que se siguió para esta técnica fue la siguiente

Se prepararon tres geles, los dos primeros de acrilamida-bisacrilamida al 12 % y el tercero (réplica) se preparó con agar al 2% y con el sustrato (harina de algarrobo) al 0.1 %. Con los dos primeros geles se corrió una electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes por lo que utilizaron los reactivos y las condiciones del punto 4.10.1.2. El procedimiento para la preparación de los geles de acrilamida-bisacrilamida es el reportado en la sección 4.9.1.2. La preparación del gel réplica fue el siguiente:

Agar bacteriológico (Baker®)	0.4 g
Harina de algarrobo (Sigma®)	0.1 g
H_2O	20 ml

La solución del gel réplica se vació entre dos placas de vidrio separadas aproximadamente 0.8 mm. Para prevenir la formación de burbujas durante la gelificación las placas ensambladas fueron colocadas en agua caliente (80°C) hasta que desaparecieron las burbujas, posteriormente las placas de vidrio se sacaron del agua

caliente y se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta gelificación. El gel fue mantenido en refrigeración a 4 °C.

Con los geles de acrilamida-bisacrilamida se corrió una electroforesis a 150 V constantes durante una hora, después uno de los geles se sometió a revelado y el otro se secó en una estufa a 60 °C durante 5 minutos para eliminar el exceso de agua y evitar la difusión de las proteínas. Éste gel se pegó con el gel réplica (previamente seco a las mismas condiciones que el gel anterior) incubándose a 50 °C durante dos horas. Pasado este tiempo el gel réplica se tiñó con una solución de rojo congo (BIO-RAD®) al 0.1 % durante 5 minutos; posteriormente el gel se lavó con una solución de NaCl (Baker®) 1 M para eliminar el exceso de colorante presente en la bandas activas. Por último el gel se lavó con una solución de ácido acético (Baker®) al 5% para fijar el colorante.

4.9.3 Peso molecular

El peso molecular se determinó a partir de la electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes. Primeramente se generó una curva patrón con proteínas de peso molecular conocido (Sigma®) bajo condiciones desnaturalizantes y posteriormente el peso molecular de la proteína de interés se obtuvo mediante extrapolación con esta curva. La curva patrón se presenta en el anexo 1. El procedimiento fue el siguiente:

1. Después de la electroforesis y teñido se midió la distancia de migración de las proteínas así como la distancia del frente de migración. La distancia de migración se midió desde donde empieza el gel de separación hasta del frente de migración.

2. Se calculó el valor R_f mediante la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración de las proteínas}}{\text{distancia del frente de migración}}$$

3. Se graficó el $\log_{10}$ de los pesos moleculares de las proteínas contra su respectivo valor de R_f obteniéndose la curva patrón.

4: Para calcular el peso molecular aparente de las proteínas de interés, se calculó el valor de R_f para cada una de ellas interpolándose con los valores R_f de la curva estándar.

4.9.4 Punto isoeléctrico

Para esta técnica se utilizó un equipo Rotofor (BIO-RAD®) inyectando el extracto crudo.

4.9.5 pH óptimo y estabilidad.

El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima fue medido en un intervalo de pH de 2 a 10 usando un amortiguador universal de concentración 25 mM (anexo 2); para ajustar cada pH se utilizaron soluciones de NaOH (Baker®) y HCl (Baker®) 1N. Para realizar esta prueba, se tomaron 100 µl de muestra y se incubaron 12 horas a la temperatura en que se realizó la prueba de actividad enzimática (50°C). Pasado el tiempo de incubación, se determinó la actividad enzimática.

Para determinar el pH óptimo se probó un intervalo de pH de 2 a 10. En cada caso se realizó la prueba de actividad enzimática siguiendo el protocolo original cambiando únicamente el pH. El sistema amortiguador utilizado fue el mismo que se utilizó para la prueba de estabilidad a una fuerza iónica constante durante todos los experimentos.

4.9.6 Temperatura óptima y estabilidad.

Para realizar la prueba de temperatura óptima se probó un intervalo de temperaturas de 20-90 °C. Para cada caso la muestra de enzima se enfrió a temperatura ambiente y se determinó la actividad. La cantidad de proteína utilizada para cada prueba estuvo en el orden de 20 a 30 µg/ml.

Para la prueba de estabilidad, se tomaron muestras de 200 µl los cuales se incubaron por espacio de una hora a las temperaturas probadas en el punto anterior.

Pasado el tiempo de incubación, las muestras se enfriaron y se determinó la actividad enzimática. La cantidad de proteína para cada análisis estuvo en el orden de 20 a 30 µg/ml.

4.9.7 Determinación de parámetros cinéticos

Los valores de K_M y V_{MAX} fueron determinados por la ecuación de Hanus-Wolff probando el efecto de la concentración de sustrato en un intervalo de concentraciones 0.1 a 1 % de harina de algarrobo sobre la actividad de D-mananasa. Para la obtención de los parámetros cinéticos se realizaron 10 cinéticas bajo las condiciones de la prueba estándar de actividad (50°C, 10 minutos). Para cada caso se tomó muestra cada minuto por triplicado durante 10 minutos determinando la actividad enzimática a cada tubo. Posteriormente los resultados se graficaron obtiniéndose una pendiente para cada concentración inicial de sustrato, las pendientes obtenidas a su vez se graficaron utilizando la ecuación de Hanus-Wolff para obtener los valores de K_M y V_{MAX} (ver anexo 1)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó en la sección 4.1, se utilizaron dos microorganismos para llevar a cabo la fermentación en medio sólido utilizando como sustratos bagazo de café y pasta de copra. El tiempo óptimo para la obtención de esporas para la preparación del inóculo fue de 72 y 96 horas para *A. niger* y *A. oryzae* repectivamente. Las condiciones se señalan en la sección 4.1.1. Una vez que se tuvo listo el inóculo, éste se adicionó a los respectivos sustratos. La pasta de copra únicamente fue sometida a un proceso de secado (sección 4.2) no así el bagazo de café el cual aparte del proceso de secado se complementó con un medio salino (sección 4.5) debido a que procede de un proceso en el cual se le extraen la mayoría de los compuestos solubles y por lo tanto es un medio deficiente en sales minerales.

5.1 CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN

Se realizaron cinéticas previas con el objetivo de determinar el mejor tiempo de fermentación para la obtención de mananasa, las condiciones y procedimiento seguido se indican en la sección 4.1 de materiales y métodos. Se realizaron dos cinéticas probando como sustratos pasta de copra y bagazo de café y como microrganismos *A. niger* y *A. oryzae*. Los resultados de la primera cinética (*Aspergillus niger*-pasta de copra) se presentan en las figuras 5.1-5.3.

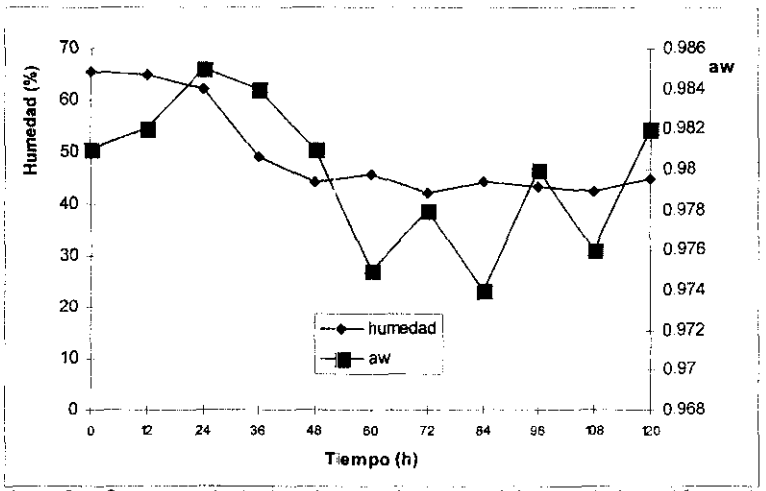


Figura 5.1. Comportamiento de la humedad y actividad de agua (a_w) en el fermento para la fermentación *A. niger*-pasta de copra.

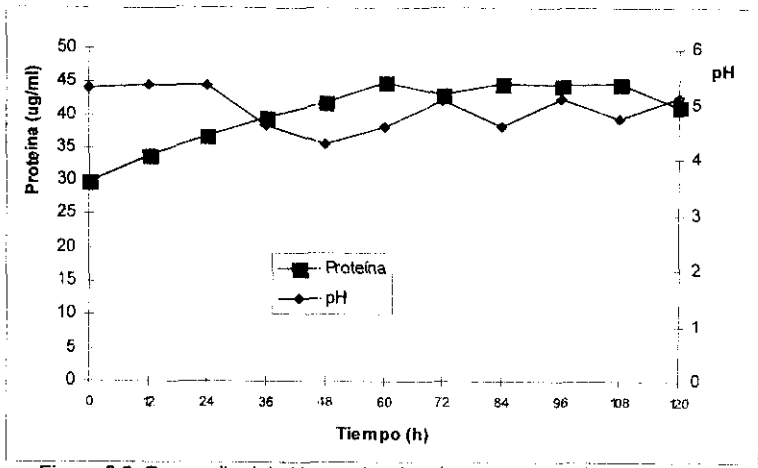


Figura 5.2. Desarrollo del pH y producción de proteína en el extracto crudo para la fermentación *A. niger*-pasta de copra.

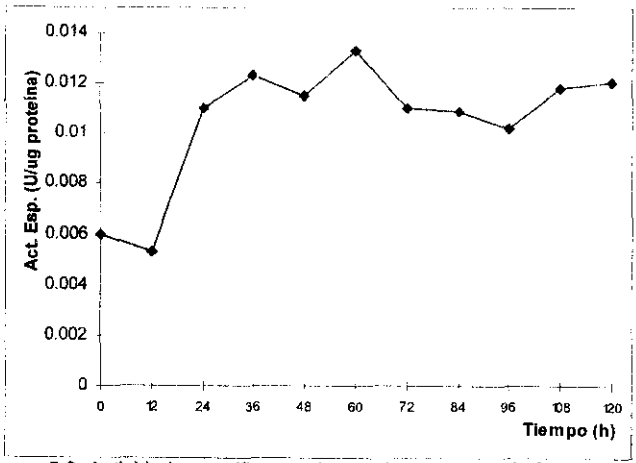


Figura 5.3. Actividad específica en el extracto crudo para la fermentación *A. niger*-pasta de copra.

Los resultados de esta primera cinética muestran comportamientos poco dispersos por lo que respecta a la humedad, pH y proteína. En la figura 5.2 se observa que al tiempo t =0 se detecta proteína que posiblemente sea la proteína soluble del sustrato. La producción de proteína durante la fermentación muestra un comportamiento creciente desde el inicio de la fermentación hasta las 60 h; a partir de este tiempo la producción de proteína se mantiene constante hasta el final de la fermentación donde empieza a disminuir. Hay muchos factores que pueder ser la causa de la disminución de proteína en

el extracto, uno de ellos y quiza el mas importante es la presencia de proteasas en el extracto ya que como se sabe, el género *Aspergillus* es importante productor de proteasas (Smith, 1994). En la misma figura el a_w tiene un comportamiento disperso y es probable que este comportamiento se deba a que la distribución de la humedad a través de la columna de fermentación es muy heterogenea debido principalmente al crecimiento microbiano que impide una distribución homogénea de la humedad a lo largo de la columna creando zonas preferenciales de aireación y evitando en otras una aireación adecuada. Por otra parte, la caída de a_w coincide con la baja de humedad de fermento (fig 5.1). Se observa que a partir de las 24 h de fermentación tanto la humedad y a_w tienden a bajar ésto puede deberse al crecimiento microbiano y a la evaporación del agua en el medio por la aireación aplicada, aunque la a_w no mantiene un comportamiento constante se observa que nunca baja de 0.97. Lacey y Magan (1991) indican que el a_w para el crecimiento de *Aspergillus* esta dentro de un intervalo de 0.71-0.98 por lo que el resultado obtenido no es un factor que pudiera a afectar el crecimiento del hongo. En la figura 5.2 se observa un comportamiento mas o menos constante del pH que oscila entre 5.2 y 4.3 que estan dentro de los reportados por Magan y Lacey (1984) para el crecimiento de *Aspergillus*. La proteína alcanza su máxima producción a las 60 h de fermentación y coincide (fig 5.3) con el máximo de actividad específica. Por ello, bajo las condiciones probadas a este tiempo, se obtiene la máxima producción de enzima (mananasa). Cabe señálar que al igual que para la proteína, a t = 0 se detecta actividad específica de mananasa, posiblemente los azúcares presentes inicialmente en el sustrato sean la causa de este hecho ya que la pasta de copra contiene un alto contenido de azúcares y como la prueba de actividad volumétrica dectecta azúcares reductores cabe la posibilidad de interferencia al inicio de los análisis de actividad enzimática. Es necesario señalar que no necesariamente a las 60 h se tiene solo mananasa, es obvio que en este tiempo se tiene una mezcla compleja de proteínas y/o enzimas que también llegan a afectar el cálculo de la actividad específica. Los resultados de la segunda cinética realizada (*Aspergillus oryzae*-bagazo de café) se presentan en las figuras 5.4-5.6. Al igual que en la fermentación de *A. niger*-pasta de copra, se observa que la humedad y a_w presentan la misma tendencia ya que cuando la a_w baja (fig. 5.4) la humedad también baja y viceversa. En la figura 5.5 se observa que la producción de proteína durante la fermentación se mantiene constante observándose máximos a las 24 y 120 h de fermentación, estos máximos no coinciden con los máximos de actividad específica. En la figura 5.6 se

observan dos máximos de actividad especifica de mananasa (60 y 90 h), esto prodría ser un indicativo de la presencia de mas de una mananasa.

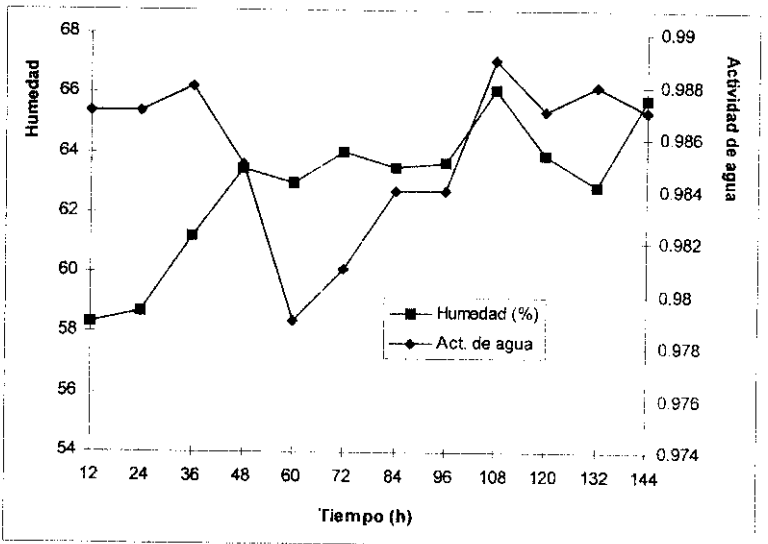


Figura 5.4. Desarrollo de la humedad y actividad de agua para la fermentación *A. oryzae*-bagazo de café en el fermento.

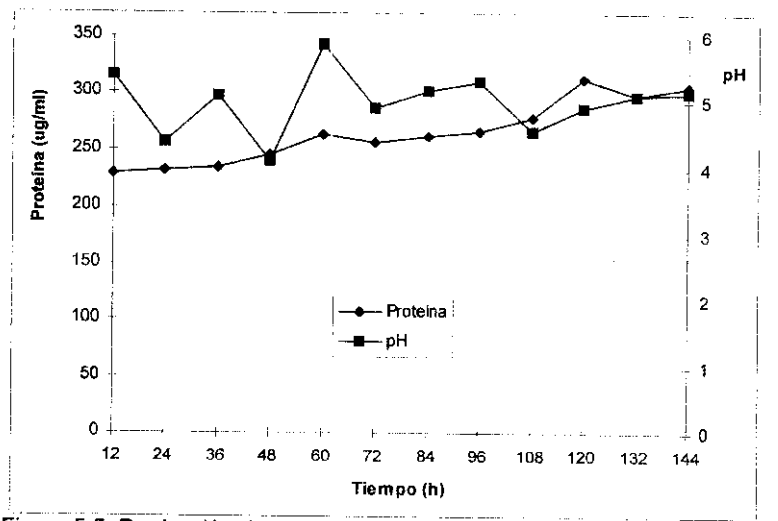


Figura 5.5. Producción de proteína y comportamiento del pH en el extracto crudo para la fermentación *A. oryzae*-bagazo de café.

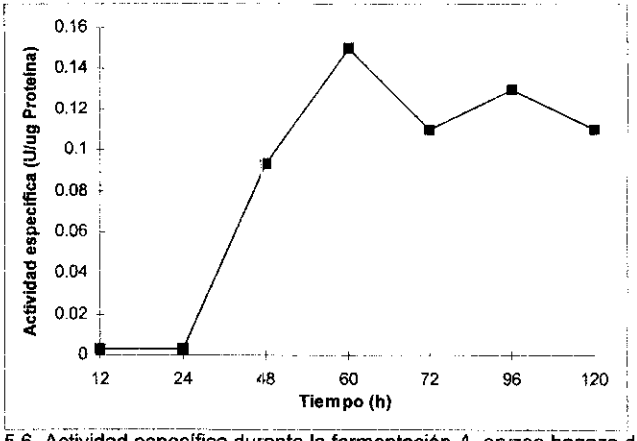


Figura 5.6. Actividad específica durante la fermentación *A. oryzae*-bagazo de café

Si se comparan las figuras 5.3 y 5.6 se observa que *A. oryzae* es mejor productor de mananasa ya que a las 60 h tiene una actividad específica total de 0.15 U/μg prot. mientras que *A. niger* de 0.0131 U/μg prot. de actividad total, hay que tomar en cuenta que como se realizaron análisis del extracto crudo es muy probable que también se esté cuantificando a la par proteína soluble de ambos sustratos u otro tipo de enzimas por lo que la actividad específica es muy baja y no es un indicativo de la actividad específica real para cada fermentación, sin embargo, para fines de la determinación del mejor tiempo de producción de mananasa este resultado fue de gran ayuda.

5.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en las cinéticas previas, mostraron que el tiempo de máxima producción de enzima era de 2.5 días por lo que se procedió a desarrollar el diseño experimental para la producción de la enzima. Las condiciones de fermentación estan indicadas en la sección 4.4 de materiales y métodos.

Los resultados que se obtuvieron de las fermentaciones se muestran en la tabla 5.1. Los resultados del diseño factorial 2^2 propuesto que se sometieron a un análisis

estadístico para determinar las condiciones que condujeran a una mayor actividad de D-mananasa producida.

Tabla 5.1. Resultados del diseño experimental

		Actividad específica (U/μg proteína)					
		BAGAZO DE CAFÉ			PASTA DE COPRA		
Microorganismo	**Días**	**Promedio**	**Des. Est.**	**C.V.**	**Promedio**	**Des. Est.**	**C.V.**
Aspergillus niger	2.5	0.90	0.20	22.20	1.22	0.45	36.99
	5	0.85	0.09	10.72	0.46	0.10	20.96
Aspergillus oryzae	2.5	0.67	0.07	9.66	0.39	0.06	14.71
	5	0.23	0.01	2.55	0.22	0.02	6.84

Promedio = Promedio de las actividades obtenidas por columna (triplicado);
Des. Est. = Desviación Estándar; C.V. = Coeficiente de Variación.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico para de esta manera determinar la mejor elección entre microorganismo, sustrato y tiempo que conduzcan a una alta producción de D-mananasa. Se utilizó el paquete estadístico SAS para el análisis de los datos. Los resultados del análisis se muestran en las tablas 5.2 y 5.3.

Tabla 5.2. Información sobre clases y niveles del análisis estadístico.

SAS			
Procedimiento Modelo General Lineal			
Infomación Niveles-Clases			
Clases	**Niveles**	**Valores**	
A	2	1	2
B	2	1	2
C	2	2.5	5

Número de observaciones en el conjunto de datos = 24

Donde:

Clase A: 1 = *Aspergillus niger* y 2 = *Aspergillus oryzae*

Clase B: 1 = Bagazo de café y 2 = Pasta de copra

Clase C: 1 = 2.5 días y 2 = 5 días

El análisis estadístico indicó que: (1) la interacción microorganismo-sustrato-tiempo si tiene influencia en la producción de la enzima y, (2) la mejor interacción para la producción de la enzima fue *A. niger*-pasta de copra-2.5 días. Estos resultados parecen ser contradictorios si se comparan con los obtenidos en las fermentaciones previas en donde se determinó el tiempo de máxima producción de la enzima. Hay que tomar en cuenta que las cinéticas de fermentación se determinaron con un lote de bagazo de café diferente al utilizado para el desarrollo del diseño experimental por lo que pudo afectar los resultados obtenidos de actividad enzimática para esta interacción, pero de acuerdo a la bibliografía consultada era de esperarse que con la pasta de copra se obtuvieran mejores resultados.

En los análisis del café obtenidos de bibliografía (Venegas, 1997) no se menciona la presencia de alguna sustancia que podría inhibir el crecimiento de microorganismos debido principalmente a lo lavado del bagazo de café por eso se tuvo la necesidad de adicionar un medio salino para complementarlo.

Caso contrario sucede con la copra, este residuo agroindustrial tiene un considerable contenido de proteína y de azúcares siendo por lo tanto un excelente sustrato para el crecimiento de microorganismos y no hay necesidad de adicionar ningún tipo de complemento ni de darle tratamiento previo. Otro factor que se tiene que tomar en cuenta es lo mencionado por Dekker (1976) que indica que la galactosa unida al esqueleto del D-manano afecta fuertemente la actividad de D-mananasa disminuyéndola.

En la tabla 3.1 se muestran las fuentes de D-manano, el grano de café es una fuente de galactomanano en el que la relación de manosa-galactosa es de 3:1 (McCleary, 1979), en esta misma tabla se observa que el coco es una fuente de glucomanano pero algunos otros autores (Park y col., 1993) indican que el coco posiblemente sea también una fuente de galactomanano pero en una proporción mayor teniendo una la relación manosa-galactosa de 1:1, por lo que tomando en cuenta lo dicho anteriormente, era de esperarse que se obtuvieran mejores resultados utilizando como sustrato pasta de copra. Cabe señalar que también es factor importante determinar el tipo de grano de café ya que dependiendo de la especie de grano será el contenido del galactomanano y por lo tanto la relación manosa-galactosa variará. También existe la posibilidad de que el extracto crudo

Tabla 5.3. Tabla de ANOVA

SAS					
Procedimiento Modelo General Lineal					
Variable Dependiente: UENZ					
CLASE	**GL**	**Tipo III SS**	**Fuentes**	**Valor-F**	**Pr > F**
A	1	1.34900	1.34900	40.53	0.0001
B	1	0.04420	0.04420	1.33	0.2661
A*B	1	0.01550	0.01550	0.47	0.5047
C	1	0.77400	0.77400	23.25	0.0002
A*C	1	0.01260	0.01260	0.38	0.5470
B*C	1	0.07150	0.07150	2.15	0.1621
A*B*C	1	0.35837	0.35837	10.60	0.0050

Donde: GL = Grados de Libertad, SS = Suma de Cuadrados
UENZ = Unidades de actividad enzimática.

Los resultados indicaron que hay diferencia significativa (0.005) en la interacción A*B*C, es decir microorganismo-sustrato-tiempo, pero hasta este punto aún no se determinaba que interacción era la mas adecuada por lo que se procedió a realizar otro análisis estadístico (tabla 5.4) para determinar que tratamiento era el mejor. El resultado se muestra a continuación:

Tabla 5.4. Análisis de interacciones (Tukey) para determinar el mejor tratamiento.

Grupo Tukey		Media	N	TRATA
	A	1.217	3	5
B	A	0.900	3	1
B	A	0.847	3	2
B	C	0.673	3	3
B	C	0.460	3	6
B	C	0.403	3	7
	C	0.227	3	4
	C	0.223	3	8

Donde TRATA 1 = *A. niger*-bagazo de café-2.5 días; 2 = *A. niger*-bagazo de café-5 días; 3 = *A. oryzae*-bagazo de café-2.5 días; 4 = *A. oryzae*-bagazo de café-5 días; 5 = *A. niger*-pasta de copra-2.5 días; 6 = *A. niger*-pasta de copra-5 días; 7 = *A. oryzae*-pasta de copra-2.5 días; 8 = *A. oryze*-pasta de copra-5 días; N = repeticiones.

El análisis Tukey (tabla 5.4) mostró que el tratamiento 5 (*Aspergillus niger*-copra-2.5 días) era significativamente diferente a los demás por lo que se seleccionó este tratamiento para la etapa de producción de la enzima. Con la información obtenida del análisis de interacciones (prueda deTukey) y de la tabla del análisis de varianza (tabla de anova, tabla 5.3) se determinó que en sí existía diferencia significativa (0.005) en por lo menos uno de los ocho tratamientos realizados por lo que la hipótesis nula se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa (ver sección 4.6).

que se obtiene de la fermentación del bagazo de café haya una mayor cantidad de mananasa pero debido al tipo de manano del cual está constituido (bagazo de café) en donde la proporción de galactosa es mayor disminuya la actividad mananasa presente. Esto puede darse aún cuando la prueba de actividad se realize con harina de algarrobo en donde la proporción de galactosa unida al esqueleto del D-manano es menor (4:1 relación manosa:galactosa).

5.3 Producción de la enzima.

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas de fermentación se montó una fermentación con las condiciones del tratamiento 5 del análisis estadístico, es decir, se utilizó la interacción *Aspergillus niger*-copra-2.5 días. La producción de la enzima constó de la fermentación, extracción, centrifugación ultraflitración y liofilización. En la tabla 5.5 se presentan los rendimientos obtenidos en cada etapa.

Tabla 5.5. Rendimientos en la preparación del extracto.

ETAPA	CANTIDAD	MANANASA (U)	RENDIMIENTO DE ACTIVIDAD (%)	PROTEÍNA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/μg proteína)
CENTRIFUGACIÓN	1680 ml	6345	100	8445 μg/l	0.75
ULTRAFILTRACIÓN	660 ml	3168	50	10340 μg/l	0.27
LIOFILIZADO	36.554 g	3162	49.8	17526 μg	0.18

Se observa que durante la etapa de ultrafiltración hay una pérdida considerable de enzima, las unidades de mananasa en esta etapa disminuyen en un 50% tomando como base las unidades obtenidas de la centrifugación. No pasa lo mismo en la etapa de liofilización ya que las unidades de actividad de mananasa se mantienen casi iguales. Es muy probable que durante la ultrafiltración haya proteasas activas que esten hidrolizando a las proteínas presentes (incluyendo a las mananasas) y esto cause la disminución de actividad de mananasa. Cabe señalar que al extracto crudo no se le adicionó ningún inhibidor de proteasas. Tambien hay que tomar en cuenta el esfuerzo cortante a la que son sometidas las proteínas durante esta etapa, esto podría ser un factor de importancia

que afecte la disminución de actividad manansa ya que podría desnaturalizarse parte de las enzimas presentes en el extracto o bien, es posible que la membrana utilizada durante la ultrafiltración no se acondicionó adecuadamente y que parte de las enzimas quedaron pegadas a la misma.

Para la etapa de ultrafiltración se utilizó una membrana de poro de 10 000 Daltons, esto permitió la concentración del extracto con moléculas mayores de este tamaño de poro. Una vez terminada la ultrafiltración se procedió a la liofilización, para evitar la pérdida de actividad durante este proceso, se adicionó un agente crioprotector ya que cuando se liofilizó sin él, la pérdida de actividad fue muy grande. El agente crioprotector utilizado fue dextrosa (1%) el cual mostró su eficiencia ya que las unidades de actividad mananasa se mantuvieron sin alteración importante.

5.4 Purificación parcial

El objetivo de este punto fue el tener una enzima parcialmente purificada para su posterior caracterización. La purificación consistió de dos etapas, en la primera etapa el extracto crudo se sometió a una filtración en gel con el fin de separar las proteínas presentes en éste por su peso molecular, las fracciones que presentaron actividad se mezclaron y se separaron en una segunda etapa haciendo uso de su carga eléctrica, para este caso se utilizó una columna de intercambio aniónico.

5.4.1 Filtración en gel

En la sección 4.8.2 se indica el procedimiento para la preparación de la muestra para esta etapa de purificación. Preparada la muestra, se inyectó a un FPLC, se obtuvieron 10 fracciones de 1 ml cada una, estas fracciones se analizaron presentando sólo cuatro de ellas actividad importante por lo que se mezclaron para seguir con la siguiente etapa de purificación. Los resultados de la filtración en gel se muestran en la figura 5.7.

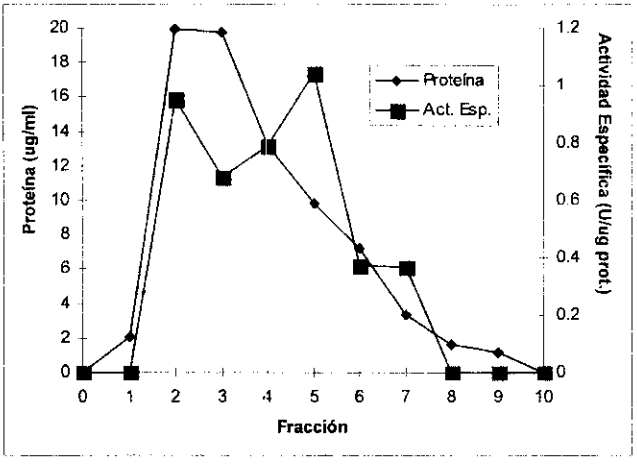


Figura 5.7. Cantidad de proteína y actividad específica de las fracciones eluidas de la columna de filtración en gel a partir del liofilizado.

En la figura 5.7, se aprecia que las fracciones 2, 3, 4 y 5 muestran la mayor actividad específica (cerca del 82% de la actividad total), mientras que en las fracciones 6 y 7 esta actividad es menor (aproximadamente el 18% del total de actividad de mananasa). Las fracciones 1, 8, 9 y 10 contienen proteína pero no presentaron actividad mananasa por lo que se desecharon. Se mezclaron por lo tanto las fracciones 2, 3, 4 y 5 para proseguir con la separación en columna de intercambio aniónico. En esta columna de filtración en gel se separaron las proteínas por su peso molecular a la vez se eliminaron las sales presentes en el extracto.

Al presentar mas de una fracción recolectada, actividad mananasa, es posible que haya mas de una enzima presente en el extracto, por lo tanto, al elegir las fracciones 2, 3, 4 y 5 se estan eligiendo mananasas de peso molecular de alto a intermedio y al desechar las fracciones 6 y 7 se eliminan posiblemente mananasas con peso molecular pequeño (< 6 KDa). Con estos resultados preliminares, se puede considerar que *A. niger* utilizando como sustrato pasta de copra es capaz de producir un complejo enzimático con actividad de mananasas.

5.4.2. Columna de intercambio aniónico

Las fracciones que mostraron mayor actividad (2, 3, 4 y 5) se mezclaron obteniéndose 4 ml totales dos de los cuales se inyectaron al FPLC bajo las condiciones indicadas en la sección 4.7.3 de materiales y métodos. En la figura 5.8 se muestra un cromatograma típico obtenido de la columna de intercambio aniónico (columna monoQ).

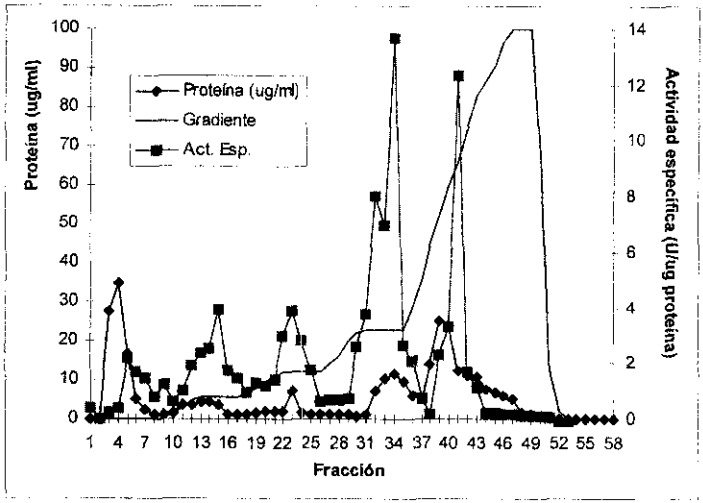


Figura 5.8. Cromatograma de separación utilizando la columna de intercambio aniónico (mono Q), utilizando como eluyente amortiguador de fosfatos 25mM, pH 7.6, a una velocidad de flujo de 2 ml/min, con gradientes escalonados de NaCl (5 %, 9% y 20 %).

En el cromatograma de la figura 5.8 se observan tres escalones del gradiente de NaCl utilizado. Estos escalones corresponden a 5%, 9% y 20% de NaCl. Para llegar a este cromatograma final de separación fue necesario probar un gradiente lineal de NaCl (0-1 M, en amortiguador de fosfatos 25 mM, pH 7.6), diferentes escalones con concentraciones de NaCl, hasta llegar a los escalones de gradiente salino óptimos para la separación de las mananasas presentes.

Como se aprecia en el cromatograma final de separación, hay cinco fracciones (picos). A cada fracción se le realizó análisis de actividad enzimática presentando todas ellas actividad mananasa. Los análisis mostraron que las fracciones 4 y 5 presentaban

aproximadamente el 73 % de la actividad específica total, mientras que las fracciones 1, 2 y 3 presentaron el 27 % restante de la actividad específica total, por lo que se decidió caracterizar únicamente las fracciones 4 y 5. Cabe señalar que es común encontrar sistemas enzimáticos múltiples. Johnson y col. (1990), Araujo y col. (1990), Stalbrand y col. (1993) y Hossain y col. (1996) reportaron sistemas enzimáticos múltiples de mananasa aún sin definirse las causas exactas de este comportamiento. Posiblemente el desarrollo de estos sistemas enzimáticos se debe a la complejidad del sustrato, es decir, a los monosacáridos que están unidos al esqueleto principal del D-manano, que como se sabe, dentro de las mismas mananasas hay gluco, galacto y hasta fructomananasas por lo que posiblemente el hongo tenga la necesidad de producir un complejo enzimático para el aprovechamiento total del sustrato en el cual crece.

Sería importante determinar qué tipo de mananasas produce *A. niger* cuantificando los productos de la hidrólisis enzimática por medio de cromatografía de líquidos, con el fin de clasificar a las mananasas por medio de los productos que liberan. Por otra parte, el tipo de D-manano que contiene el sustrato a fermentar, es decir, su composición de azúcares, podría ser un indicativo de las enzimas que necesita producir el microorganismo para hidrolizarlo y poder metabolizar mas eficientemente el sustrato.

El rendimiento obtenido de las fracciones 4 y 5 en cada etapa de purificación se resumen en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. Rendimientos obtenidos para cada etapa de purificación para las fracciones 4 y 5.

ETAPA DE PURIFICACIÓN	MANANASA (U)	RENDIMIENTO (%)	PROT. (μg)	ACT. ESP.	FACT. PUR.
EXTRACTO CRUDO	700.4	100	28	14.3	1
FILTRACIÓN EN GEL	286	71	20	14.3	1
CROMATOGRAFÍA INTERCAMBIO IÓNICO	F-4 220.4	55	1	220	15
	F-5 279.0	69	6	46.5	3.2

Act. Esp. = Actividad Específica (U/μg Proteína)

En la tabla 5.7 se muestran los factores de purificación obtenidos para diferentes mananasas. Comparando el rendimiento de purificación obtenido por otros autores con el que se obtuvo en el presente trabajo se puede decir que el proceso de purificación no es suficiente, es decir, es necesario agregar una etapa extra de purificación o en su defecto,

optimizar todo el proceso de purificación para eliminar las pérdidas de actividad en las etapas que se utilizaron. Es importante señalar que el objetivo del trabajo fue la de purificación parcial de la enzima y tampoco se contemplo la optimización de alguna etapa de producción o purificación de la enzima.

La mayoría de las referencias aplican mas de dos etapas de purificación por esto obtienen factores de purificación altos. Aún asi, los factores de purificación obtenidos resultan ser muy buenos aún con las limitantes mencionadas anteriormente. Por otra parte, la mayoría de las referencias consultadas indican que purifican la enzima hasta homogeneidad, por lo que los rendimientos que ellos obtienen (sumado a mas etapas de purificación) aumenta considerablemente. No es posible comparar los resultados obtenidos por lo que respecta al factor de purificación y rendimientos debido principalmente a que en el presente trabajo no se llegó a la purificación hasta homogeneidad y además las etapas de purificación utilizadas fueron mínimas a comparación a las reportadas por otros autores.

Cabe mencionar que en la mayor parte de las referencias consultadas, obtienen la enzima mediante fermentación líquida por lo que su comportamiento es muy diferente a las enzimas obtenidas por fermentación sólida (Acuña-Arguelles y col., 1995) esto hace necesario estudiar mas a fondo el comportamiento de las enzimas obtenidas para facilitar la optimización de alguna etapa donde se detecte alguna pérdida importante de actividad o de proteína.

El rendimiento obtenido para la fracción 4 es muy similar por el reportado por Arisan y col. (1993) y por Johnson y col. (1990). Con lo que respecta a la fracción 5, el factor de purificación que se obtiene es muy bajo (3.5). Probablemente esta enzima es mas sensible a los factores como temperatura, pH, esfuerzo cortante, etc.

Es de suma importancia optimizar todo el proceso de purificación para aumentar el factor de purificación sobre todo debido a que el tipo de enzimas que se obtienen por fermentación sólida no estan suficientemente estudiadas y no hay la información suficiente para compararlas ya que como se mencionó anteriormente su comportamiento es muy diferente.

Tabla 5.7. Factores de purificación obtenidos para otras mananasas obtenidas por fermentación líquida

Microorganismo	Factor de purificación	Etapas de purificación	Referencia
Oerskovia xanthineolytica	44	Phenyl sheparose CL-4B DEAE-Sephacel Sephacryl S-300	Saeky y col. 1990
Trichoderma reesei	18	Precipitación con etanol Cromatoenfoque Mono Q	Arisan y col. 1993
Bacillus sp KK01	F1 33.5 F2 28.5 F3 22.5 F4 32.5	Precipitación con isopropanol 30-65% DEAE	Hossain y col. 1996
Polyporus versicolor	A 112.6 B 165.5 C 143.7 2A 19.9	DEAE Bio-Gel Sephadex G-100 TSK DEAE Phenyl-5-PW	Johnson y col. 1990
Pomacea insularus	170	DEAE sepharose (dos etapas) Toyopearl HW-SSF	Yamamura y col. 1993
Bacillus subtilis	240	Precipitación con sulfato de amonio DEAE toyopearl (dos etapas) Sephacryl	Mendoza y col. 1994

5.5 Caracterización

Como se mencionó en el punto 5.3.2, la caracterización se realizó sólo para las fracciones 4 y 5 ya que presentaron la mayor actividad enzimática. La caracterización consistió en determinar para cada fracción el peso molecular, punto isoeléctrico, temperatura óptima y estabilidad a diferentes temperaturas, pH óptimo y estabilidad al pH y variables cinéticas (K_M y V_{MAX}).

5.5.1 Peso molecular.

El peso molecular de las fracciones 4 y 5 se estimó a partir de una electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes. La curva patrón utilizada para el cálculo del peso molecular se muestra en el anexo 1. Primeramente se realizó una electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes en donde se obtuvo el peso molecular aparente para cada una de las fracciones. En el gel de electroforesis que se muestra en la figura 5.9. aparecen las bandas de proteína (mananasas) correspondientes a las fracciones 4 y 5 (F-IV y F-V respectivamente). El primer y último carril de la electroforesis corresponden a los marcadores de peso molecular, el segundo carril corresponde al extracto crudo sin nungún tratamiento y los demás carriles corresponden a las etapas de centrifugación, ultrafiltración y liofilización respectivamente.

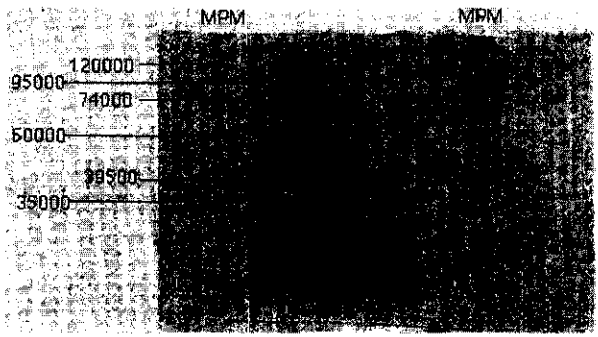


Figura 5.9. Gel de electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes para el extracto crudo, centrifugación, ultrafiltración y liofilización. MPM = Marcador de Peso Molecular; F-IV = Fracción 4; F-V = Fracción 5.

En la figura 5.10 se presenta el gel de electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes correspondiente a la última etapa de purificación parcial, es decir, a la etapa de cromatografía de intercambio iónico. Con este gel se reafirmaron los pesos moleculares obtenidos en el gel anterior para las fracciones 4 y 5. En este gel hay la presencia de dos bandas de proteína que corresponden a las fracciones 4 y 5. El marcador de peso molecular es el mismo que se utilizó en la figura 5.9.

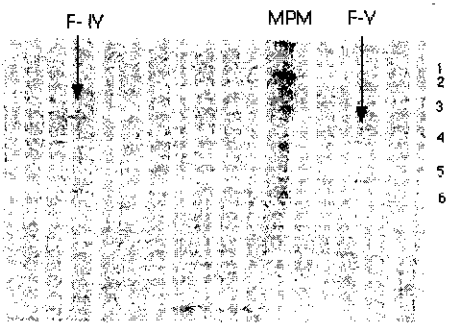


Figura 5.10. Gel de electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes para la etapa de purificación con la columna de intercambio aniónico. MPM = Marcador de Peso Molecular; 1 = 166 Kda; 2 = 84 Kda; 3 = 58 Kda; 4 = 45 Kda; 5 = 36.5 Kda; 6 = 26.6 KDa.

Para corroborar que bandas presentaban actividad de mananasa, la electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes se acopló a una técnica de zimografía. El gel obtenido se presenta en la figura 5.10. las bandas que presentaron actividad de mananasa mostraron un color amarillo debido a la reacción del rojo congo con los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática.

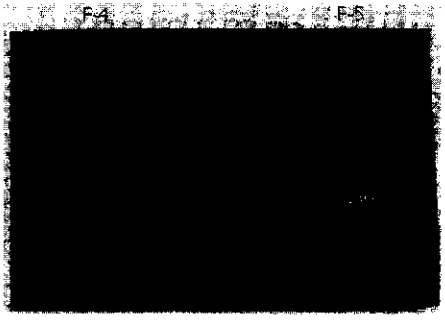


Figura 5.11. Gel de zimografía a partir de una electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes en donde aparecen las bandas con actividad de mananasa de color claro F-4 = Fracción 4; F-5 = Fracción 5.

Los pesos moleculares aparentes obtenidos para cada fracción indican que para la fracción 4 su peso fue de 56200 Da. y para la fracción 5 fue de 33800 Da. El peso

molecular obtenido para la fracción cuatro concuerda con el obtenido para la fracción 3 de *Thielavia terrestris* (Araujo y col., 1990), para la fracción 3 de *Polyporus versicolor* (Johnson y col., 1990), para las fracciones 2 y 3 de *Bacillus subtilis* (Hossain y col., 1996), y la de *Basidiomicetes* (McCleary, 1979). Por lo que respecta a la fracción 5, el peso molecular obtenido es similar a los reportados para mananasas de *Thielavia terrestris* (fracción 2) (Araujo y col., 1990), *Polypurus versicolor* (fracción 4) (Johnson y col., 1990), *Bacillus subtilis* (Mendoza y col., 1994), intestino de caracol (McCleary, 1979) y *Bacillus subtilis* (McCleary, 1979). Todos estos pesos aparecen en la tabla 5.11.

Al realizar una electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (figura 5.12) se observa que para la fracción 5 hay la presencia de dos bandas lo que indica que esta proteína probablemente esta conformada por dos subunidades ya que al sumar los pesos moleculares de ambas bandas el resultado correspondió aproximadamente al valor obtenido en la electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes (banda 1 = 16800 Da y banda 2 = 15000 Da). Al parecer, la fracción 4 no esta formada por subunidades y el peso molecular corresponde al que se obtuvo bajo condiciones no desnaturalizantes. Para un trabajo posterior sería recomendable realizar una electroforesis pero utilizando tinción con plata para determinar si la enzima ha sido purificada hasta homogeneidad.

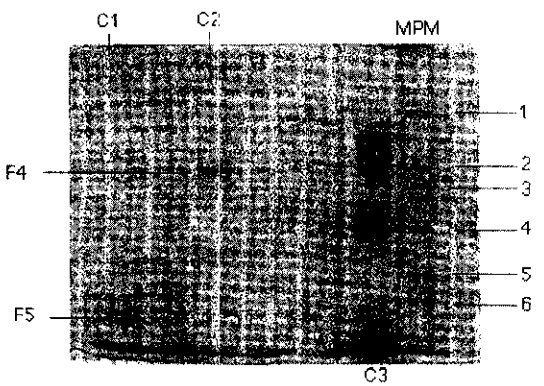


Figura 5.12. Gel de electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes; MPM = Marcador de Peso Molecular; 1 = 120 KDa; 2 = 95 KDa; 3 = 74 KDa; 4 = 50 KDa; 5 = 39.5 KDa; 6 = 35 KDa; C1 = Carril 1;C2 = Carril 2; C3 = Carril 3; F4 = Fracción 4; F5 = Fracción 5.

5.5.2. Punto isoeléctrico

Para conocer el punto isoeléctrico (pI) de cada fracción se utilizó un Rotofor (BIO-RAD®) obteniéndose los resultados que se presentan el la tabla 5.8. Para obtener el punto isoeléctrico de las enzimas se utilizó el extracto crudo obtenido de la fermentación.

Tabla 5.8. Valores de pH para cada fracción obtenidos del extracto crudo en el Rotofor

Fracción	pH	Actividad volumétrica
1	12.8	0
2	12.57	0
3	10.76	0
4	9.29	0
5	8.60	0
6	7.14	0
7	6.48	0
8	6.31	0
9	5.94	0
10	5.67	0
11	5.24	0
12	4.94	12.9
13	4.58	0
14	4.28	9.9
15	3.82	41.44
16	3.62	10.7
17	3.27	8.9
18	2.73	0
19	2.02	0
20	1.35	0

Las fracciones 4 y 5 mostraron un pI preliminar de acuerdo a la tabla de 4.94 y 3.82 respectivamente. Ahora bien, los puntos isoeléctricos concuerdan con los que reportan otros autores (tabla 5.10) en donde van desde 3.7 para la fracción 4 de *Polipurus versicolor* (Araujo y col., 1990) hasta 7.7 para la mananasa del intestino de caracol (McCleary, 1979).

Como se observa, los valores de actividad volumétrica son muy altos pero hay que tomar en cuenta que éstos son obtenidos a partir del extracto crudo y por lo tanto es posible que la enzima (D-mananasa) no se vea tan afectada por factores como temperatura, acción de proteasas, etc.

5.5.3. Temperatura óptima de actividad y estabilidad a la temperatura.

Para determinar la temperatura óptima de las fracciones 4 y 5 se probaron intervalos de temperaturas de 20 a 90 °C. El procedimiento que se siguió se indica en la sección 4.8.6 de materiales y métodos. En las figura 5.13 se muestran los resultados obtenidos.

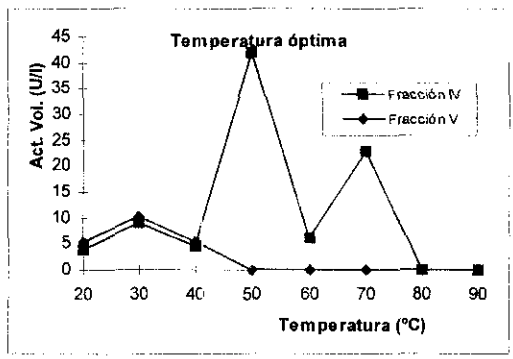


Figura 5.13. Temperatura óptima para las fracciones 4 y 5

Las temperaturas óptimas para las fracciones 4 y 5 fueron 50 y 60 °C respectivamente. Ambas temperaturas caen dentro de las reportadas en bibliografía a excepción de la mananasa de *Themotoga neapolitana* 5068 (McCutchen y col., 1996) cuya temperatura óptima es de 92 °C. En la figura 5.13 se observa la presencia de un segundo pico que corresponde a una temperatura de 70 °C, es posible que este pico se deba a la presencia de una isoenzima, no se puede considerar como otra mananasa debido a que en la zimografía no se detecto banda de actividad, además como ya se sabe la enzima no fue purificada hasta homogeneidad. Ahora bien, era de esperarse que las enzimas purificadas tuvieran una mayor temperatura óptima debido a que las enzimas obtenidas por fermentación sólida son mas estables que las que se obtienen por fermentación líquida debido probablemente al grado de glicosilación de la proteína (Acuña-Arguelles y col., 1995).

La estabilidad para las fracciones 4 y 5 se muestran en la figura 5.14. El intervalo de temperatura que se analizó fue de 20 a 90 °C para cada fracción. Se aprecia (fig. 5.14) que ambas fracciones presentan actividad hasta los 70 °C y esto es sólo comparable por

la reportada por Araujo y col. (1990) y Hossain y col., (1996). Al analizar el intervalo de estabilidad de ambas fracciones (20-90 °C) es indicativo que ambas fracciones son más estables que las enzimas reportadas por otros autores que son obtenidas mediante fermentación líquida, Esta estabilidad posiblemente se debe al grado de glicosilación de la proteína que las hace mas resistentes a cambios de temperatura y pH (Acuña-Arguelles y col., 1995; Minjares-Carrasco y col., 1997; Solis-Pereira y col., 1993).

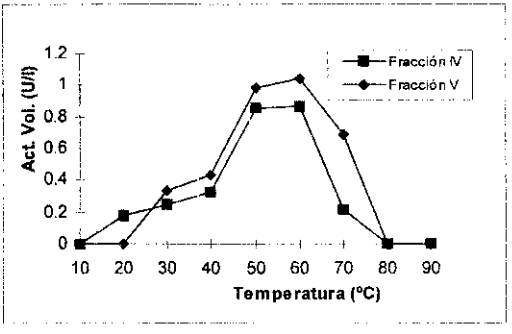


Figura 5.14. Estabilidad a la temperatura de las fracciones 4 y 5.

La estabilidad para la fracción 4 (20-70 °C) y para la fracción 5 (30-70 °C) son parecidos a los obtenidos para la mananasa de *Bacillus sp* KK01 (Hossain y col., 1996) cuya estabilidad es de 30-78 °C y a la reportada para *Thielavia terrestris* (Araujo y col., 1990) cuyo intervalo de estabilidad es de 50-70 °C.

Es importante señalar que a excepción de la enzima reportada por Yamamura y col., (1993) de *Pomacea insularus*, ningún otro autor reporta actividad de mananasa por debajo de 30 °C, por lo que la fracción 4 purificada en este trabajo presenta un buen intervalo de actividad lo que la hace muy versátil y podría utilizarce en una amplia variedad de procesos industriales.

5.5.4. pH óptimo de actividad y estabilidad al pH.

Para determinar el pH óptimo de las fracciones 4 y 5, se analizaron en un intervalo de pH de 2 a 10. Los resultados aparecen en las figura 5.15. Los resultados mostraron

que el pH óptimo para las fracciones 4 y 5 son 3 y 5 respectivamente. Estos pH son parecidos a los obtenidos por Araujo y col., (1990) para la mananasa producida por *Thielavia terrestris*, la reportada por Stalbrand y col. (1993) para la mananasa de *Trichoderma ressei*, para las mananasas producidas por *Basidiomicetes sp*, *A. niger* caracol gut y la semilla de alfalfa reportadas por McCleary, (1979) y la reportada por Mendoza y col., (1994) para la mananasa de *Basillus subtilis*.

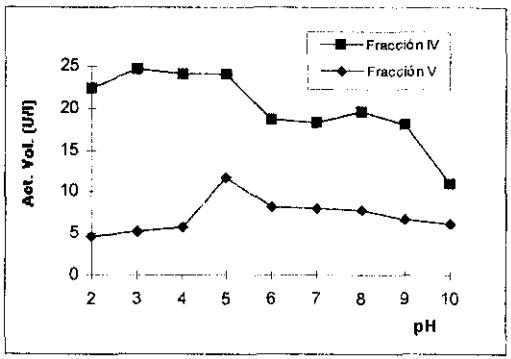


Figura 5.15. pH óptimo para las fracciones 4 y 5.

Para determinar la estabilidad al pH el intervalo de pH que se analizó fue 2 a 10. Los resultados se muestran en la figura 5.16.

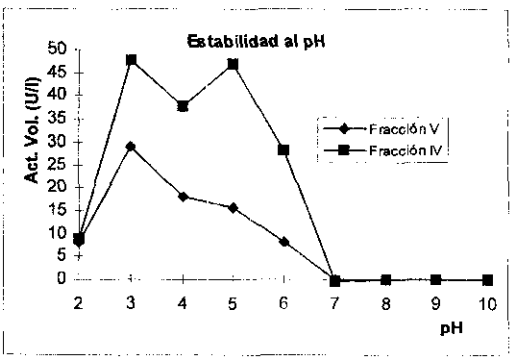


Figura 5.16. Estabilidad al pH de las fracciones 4 y 5.

Tabla 5.9. Mananasas purificadas reportadas en bibliografía

Mananasa	PM (kDa)	pI	K_M	V_{MAX}	pH ópt.	Tem. ópt	Estabilidad pH	Estabilidad Tem. (°C)	Referencia
Thielavia terrestris	52 30 55 89				5 4.5 5.5 5	65 70 75 75		50-70 " " "	Araujo y col. 1990
Polypurus versicolor	44.7 43.6 57.5 33.9	4.6 4.5 4.2 3.7							Johnson y col. 1990
Trichoderma reesei	53 51	5.4 4.6			3.5-4 3.5-4		3.5-6 4-7		Stalbrand y col. 1993
Bacillus subtilis	38	4.8			5	55	4-9	<55	Mendoza y col. 1994
***Bacillus sp.* KK01**	60 55 55 50					5-10 30-40 " "	5.5-8.5 " " "	30-78 " " "	Hossain y col. 1996
Oerskovia xanthinoelyticia	116				7-8	50	6-8.5	40-55	Soeki y col. 1990
Trichosporum cutancum	49.9		2.7 mg/ml	10.6 U/mgP.	5.3	38	7.6-9	30-45	Oda y col. 1996
Pomacea insularus	46	5.2	1.5 mg/l	24 U/mgP	5.5	50	5-10.5	10-48	Yamamura y col. 1993
Semilla de alfalfa	41	4.5	0.09 %(p/v)	2160 nkat/g	4.5		4-8	<50	McCleary 1979
Basidiomicetes sp.	53	5	0.03 %(p/v)	987 nkat/g	3		3-8	<60	McClaery 1979
Aspergillus niger	45	4	0.001 %(p/v)	500 nkat/g	3		3-8	<70	McCleary 1979
Intestino de caracol	37	7.7	0.03 %(p/v)	733 nkat/g	4.5 5.5		5-8	<50	McCleary 1979
Bacillus subtilis	37	5.1	0.11 %(p/v)	8600 nkat/g	5.6 6.0		5-8	<50	McCleary 1979
***Trichoderma reesei* C-30**	46	5.2	1.5 mg/l	24 U/mgP	5	75	3-6	<55	Arisan y col. 1993
***Thermotoga neapolitana* 5068**	55				7.1	92			McCutchen y col. 1996

Ambas fracciones mostraron ser estables en el mismo intervalo de 2 a 6. En todas las manansas reportadas, ninguna muestra ser estable a pH de 2, es importante señalar que ninguna de las enzimas reportadas fueron obtenidas por fermentación sólida, esto es

un factor importante ya que se ha reportado que las enzimas obtenidas por fermentación sólida el grado de glicosilación es mayor haciéndolas mas estables tanto al pH como a la temperatura. (Acuña-Arguelles y col., 1995; Minjares-Carrasco y col., 1997; Solis-Pereira y col., 1993).

5.5.5. Cálculo de variables cinéticas

Para llevar a cabo el cálculo de las variables cinéticas se utilizó un intervalo de concentración de sustrato (harina de algarrobo) de 0.1 a 1 %. Para cada caso se realizaron cinéticas de 10 minutos cada una. Los análisis detallados de cada cinética se muestran en el anexo 4. Para el cálculo de las variables cinéticas se utilizó la transformación de Hanes-Wolff que se muestra a continuación.

$$\frac{S}{V} = \frac{1}{V_{MAX}} S + \frac{K_M}{V_{MAX}}$$

El cálculo de cada una de las variables que forman a esta ecuación se muestran en el anexo 4. Las figuras 5.17 y 5.18 indican las variables linearizadas necesarias para el cálculo de K_M y V_{MAX}.

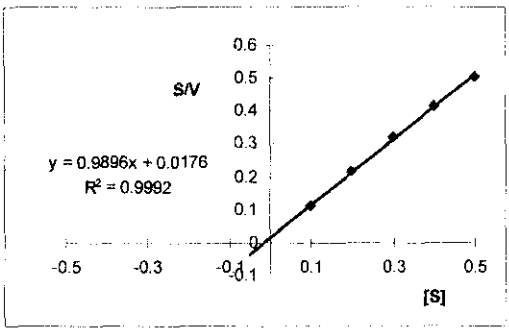


Figura 5.17. Transformación de Hanes-Wolff para la fracción 4.

El valor de K_M se calcula a partir del valor de la pendiente. Los cálculos son los siguientes:

$$m = \frac{1}{V_{MAX}} \Rightarrow V_{MAX} = \frac{1}{m} \Rightarrow V_{MAX} = \frac{1}{0.9896} = 1.010 \text{ U/l}$$

$$V_{MAX} = 1.010 \text{ U/l}$$

A partir del valor de la ordenada al origen se calculó el valor de V_{MAX}:

$$0.0176 = \frac{K_M}{V_{MAX}} \Rightarrow K_M = V_{MAX}(0.0176) = 1.010(0.0176) = 0.0177 \text{ mg/l}$$

$$K_M = 0.0177 \text{ mg/l}$$

En la figura 5.18 se observa la gráfica de la transformación de Hanes-Wolff y a partir de esta se realizarón los cálculos para conocer las variables cinéticas de la fracción 5.

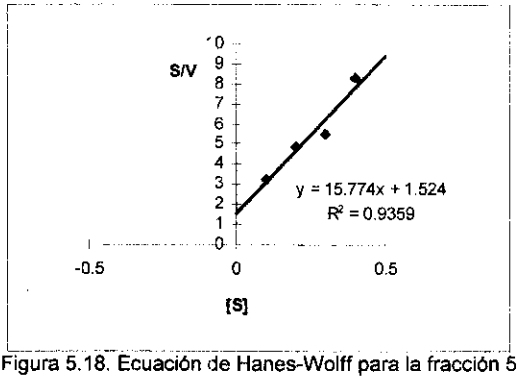


Figura 5.18. Ecuación de Hanes-Wolff para la fracción 5

Para este caso, como la pendiente representa a $1/V_{MAX}$ despejando V_{MAX} se obtiene el valor correspondiente

$$m = \frac{1}{V_{MAX}} \Rightarrow V_{MAX} = \frac{1}{m} \Rightarrow V_{MAX} = \frac{1}{15.774}$$

$$V_{MAX} = 0.0633 \text{ U/l}$$

La ordenada al origen tiene un valor de 1.524 y a la vez esta representada por el valor de K_M/V_{MAX}, a partir de esta relación es posible conocer el valor de K_M.

$$1.524 = \frac{K_M}{V_{MAX}} \Rightarrow K_M = V_{MAX}(1.524) = 0.0633(1.524) = 0.964 \text{ mg/l}$$

$$K_M = 0.0964 \text{ mg/l}$$

Todos los resultados obtenidos de la caracterización de las fracciones 4 y 5 se resumen el la tabla 5.11.

Tabla 5.11. Caracterización de las fracciones 4 y 5

FRACCIÓN	EST.T °C	EST.pH	T óp.	pH óp.	K_M (mg/l)	V_{MAX} (U/l)	PM (Da)	pI
4	20-70	2-6	50 °C	3	0.0177	1.0101	56200	4.94
5	20-70	2-6	60 °C	5	0.0964	0.0633	33800	3.82

A valores pequeños de K_M la enzima consigue eficiencia catalítica (K_M/V_{MAX}) máxima a bajas concentraciones de sustrato. Comparando los valores de K_M obtenidos de las fracciones 4 y 5, resulta que es mas eficiente la primera fracción debido al valor de K_M obtenido. La V_{MAX} es un indicativo de la velocidad máxima de catálisis de la enzima cuando la concentración de sustrato es saturante, se observa que la fracción 4 alcanza más rápidamente su velocidad máxima a concentraciones de sustrato más bajas. De acuerdo a estos resultados, la fracción 4 tendría una eficiencia catalítica mayor que la fracción 5 ya que que ésta última necesitaría mayor cantidad de sustrato para alcanzar su máxima velocidad de catálisis.

Al comparar los valores de K_M y V_{MAX} obtenidos con los que reportan otros autores (tabla 5.10), se puede determinar que las fracciones 4 y 5 producidas por *A. niger* vía fermentación sólida usando como sustrato copra son muy eficientes debido a que necesitan pequeñas concentraciones de sustrato para llegar a su máxima eficiencia

catalítica. Es difícil comparar los valores obtenidos de K_M y V_{MAX} debido a que en las referencias utilizan otras unidades pero aún así, el valor de K_M obtenido para la fracción 4 es parecido al reportado por Yamamura y col., (1993) para la enzima del crustáceo *Pomacea insularus* que tiene una K_M de 1.5 mg/l y el reportado por Arisan y col., (1993) de la enzima producida por *Trichoderma reesei* C-30. Es importante señalar que debido al tipo de sustrato con que se realizaba la prueba de actividad enzimática (harina de algarrobo) la viscosidad después de que se llegaba a una concentración mayor del 0.5 % (p/v) aumentaba considerablemente por lo que era muy difícil trabajar a concentraciones mayores de esta concentración. Esto es un factor que influye fuertemente para que se vean afectados los valores de K_M y V_{MAX} debido a que los problemas de difusión aumentan durante la prueba conforme aumenta la concentración de goma aunado a esto, éstos valores se ven aún mas afectados debido a los volúmenes tan pequeños que se utilizan para la prueba enzimática (25 µl). Sin embargo, los resultados obtenidos no estan muy lejanos de los reportados en literatura por lo que si se optimizara para este caso el método de determinación de éstos valores, K_M y V_{MAX} serían mas aproximados a los óptimos para ambas fracciones. Por otra parte, como se dijo al inicio de esta discusión, ambas fracciones alcanzan rápidamente su velocidad máxima de catálisis, pero para la fracción 4 es necesario la presencia de concentraciones mas altas de sustrato para que alcanze su velocidad máxima. No pasa lo mismo para la fracción 5 la cual necesita una menor concentración de sustrato en el medio de catálisis para alcanzar su velocidad máxima. Estas características de ambas enzimas podrían ser de mucha utilidad ya que al actuar ambas en un mismo medio de hidrólisis pueden actuar sinérgicamente por lo que ambas se complementarían para una hidrólisis mas efectiva del sustrato.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se llegan a las siguientes conclusiones generales:

1. El diseño experimental indicó que la interacción *Aspergillus niger*-copra-2.5 días era la mas apropiada para producir la enzima (mananasa).

2. *Aspergillus niger* es capaz de producir un complejo enzimático con actividad D-mananasa. Esto se comprobó con los cromatográmas obtenidos al pasar el extracto por una columna de intercambio catiónico, corroborándose con los geles de electroforesis y zimogramas.

3. Los factores de purificación obtenidos para las fracciones parcialmente purificadas son similares a los reportados por otros autores aún cuando la purificación no llegó hasta homogeneidad.

4. La mayor parte de los resultados obtenidos (PM, pH, temperatura, K_M y V_{MAX}) estan dentro de lo que se reporta en bibliografía por lo que estas isoenzimas (obtenidas por fermentación sólida) no difieren mucho en comportamiento a las que se obtienen vía fermentación líquida. Debe señalarse que aparentemente la fracción 4 es mas estable al pH que las reportadas en las referencias. Por lo que respecta a la temperatura, la fracción 4 presenta un buen intervalo de estabilidad a la temperatura (20-70°C) que sólo es comparable a la reportada por Araujo y col. (1990) no así la fracción 5 que es mas sensible a la temperatura.

5. La eficiencia catalítica (K_M/V_{MAX}) de las dos isoenzimas de D-mananasa parcialmente purificadas son similares a las reportadas por otros autores. Hay que tomar en cuenta que sólo fue una purificación parcial por lo que si se optimizara todo el proceso los valores obtenidos de la caracterización serían mas aproximados ya que puede existir interferencia de alguna otra isoenzima.

7. RECOMENDACIONES

Durante la etapa de fermentación para la producción de la enzima no se realizó ninguna optimización del medio ni se monitoreó la producción de CO_2, factores importantes para una óptima producción de la enzima, por lo tanto la primera recomendación si se desea la máxima producción de la enzima sería optimizar el medio de fermentación realizando un análisis fisicoquímico y/o bromatológico del sustrato para determinar si hay la necesidad de adicionar algún complemento adicional o si necesita algún tratamiento especial y por último, determinar con mas precisión en que punto se produce la mayor cantidad de enzima con actividad de mananasa realizando para esto cinéticas con puntos mas pequeños para la toma de muestra.

La segunda recomendación que se sugiere es la de agregar un agente inhibidor de proteasas para evitar la digestión de las proteína y/o enzimas presentes durante las etapas de preparación del extracto y caracterización.

Una tercera recomendación surge de la necesidad de determinar lo mas cercano posible las temperaturas y pH óptimos de trabajo para cada enzima eligiendo por lo tanto intervalos mas pequeños para el análisis. También es importante que para determinar con mas exactitud los valores de K_M y V_{MAX} es necesario trabajar con concetraciones de goma menores de 0.5 % (p/v).

La cuarta recomendación es la de purificar en su totalidad al complejo enzimático que produce *A. niger* para su caracterización total. También sería ideal el determinar qué tipos de mananasas produce este hongo filamentoso, es decir, si son galactomananasas, glucomananasas, etc., por medio de HPLC determinando los residuos de oligosacáridos resultantes de la hidrólisis enzimática.

Por último, la quinta recomendación que está muy ligada a la anterior, es la de optimizar el proceso de purificación agregando, si es posible alguna etapa extra de purificación como precipitación ya sea con acetona o con sulfato de amonio para obtener una enzima mas pura para un paso posterior de purificación.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acuña-Arguelles, M.E., Gutierrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., (1995), Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation, Appl Microbiol Biotechnol, 43:808-814.

Araujo, A., Ward, O.P., (1990), Purification and some properties of the mannanases from *Thielavia terrestris*, Journal of Industrial Microbiology, 6:269-274.

Arisan-Atac, Y., Hodits, R., Kristufek, D., Kubicek, C., (1993), Purification and Characterization of a β--mannase of *Trichoderma reseei* C-30, Appl Microbiol Biotechnol, 39:58-62.

Aspinall, G.O., (1959), Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 14:429-468.

Beguin, P., (1983), Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels usin congo red-stained agar replicas, Bio. Biochem., 134:333-336.

Bradford, M.M., (1976), A rapid sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 72:248-254.

Buchert, J., Viikari, L., Linko, M.,Markkanen, P., (1986), Production of xylonic acid by *Pseudomonas fragi*, Biotech. Letter, 8:541-546.

Cannel, E., Moo-Young, M., (1980), Solid-State Fermentation Systems, Process Biochemistry, June/July, 2-7.

Clark, T.A., McDonald, A.G., Senior, D.J., Mayer, P.R., (1990), Mannanase and xylanase treatments of chemical pulp; effects of pulp properties and bleach ability in biotechnology in pulp and paper manufacture, eds. Kirk K, and Chang H.H.M., 153-167.

Christen, P., Villegas, E., Revah, S., (1994), Growth and aroma production by *Ceratocytis frambrata* in various fermentation media, Biotechnol Letters, 11:1183-1188.

Dekker, R.F., Richards, G.N., (1975a), Hemicellulases: their occurence, purification, properties and mode of action, Carbohydr. Res., 42:107-123.

Dekker, R.F., Richards, G.N., (1976),), Hemicellulases: their occurence, purification, properties and mode of action, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32:277-352.

Dekker, R.F.H., (1979), The hemicellulase group of enzymes in polysaccharides in food, ed. Blanchard, J.M.V. and Mitchel, J.R., Science, 120:404-427.

Domsch, K.H., Goms, W., Anderson, T.H., (*1980*), Compendium of soil fungi, Academic Press, London.

Emi, S., Yamamoto, T., (1972), Crystallitation and some properties of mannanase, Agric. Biol. Chem., 36:991-1001.

Ericksson, K.E., Reedowski, W., (1969) Acta Biochem Biophys, 124:683-688.

Erikson, K.E., Winell, M., (1968), Purification and characterization of a fungal β-mannanase, Acta Chemica Scandinavica, 22:1924-1934.

Gottlieb, D., (1978), The germination of fungus spores, Meadowfield Press, Durban.

Gowthaman, M.K., Rao, S.M., Ghildyal, N.P., Karanth, N.G., (1995), Estimation of K_{La} in Solid-State fermentation using a packed-bed bioreactor, Process Biochemn 29:9-15.

Gutierrez-Rojas, M., Córdova, J.A., Revah, S., Favela-Torres, E., (1995), Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support, Biotechnol. Letters, 17:219-224.

Hallborn, J., Walfridsson, J., Airaksinen, U., Ojamo, H., Penttila, M., Keranen, S., (1991), Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cereviseae*, Bio. Tech., 9:1090-1095.

Hassidd, W.Z., (1969), Science, 165:137-144.

Hesseltine, C.W., (1977a), Solid State Fermentation-Part1, Process Biocchemistry, July/August, 24-27.

Hossain, M.Z., Jun-Ichi, A., Susumu, H., (1996), Multiple forms of β-mannanase from *Bacillus sp.* KK01, Enzyme Microbial Technology, 18:95-98.

Hylin, J.W., Sawai, K., (1964), J. Biol, Chem , 239:990-992.

Jeffries, T., Lins, C. N., (1990), Effects of *Aureobasidium pullulans* xylanase on properties of aspen thermomechanical and kraft pulps. In Kirk, K.T., Chang, H. M. (eds.), Biotechnology in pulp and paper manufacture, U.S.A., pp 191-202.

Johnson, K:G:, Ross, N.W., Schneider, H., (1996), Purification and some properties of β-mannanase from *Polyporus versicolor*, 6:245-254.

Kantelinen, A., Ratto, M., Sundquist, J., Ranura, M., Viikari, L., Linko, M., (1988), Hemicellulases and their potential role in bleaching, International Pulp Bleaching Conference, Tappi Proceedings, 1-9.

Lacey, J., Magan, N., (1991), Fungi in cereal grains; Their ocurrence and water and temperature relationships, in cereal grain micotoxins, fungi and quality in drying and storage, eds. J. Chelkowski, Elsevier, 77-118.

Laemmli, U.K., (1970), Cleave of structural proteins during assembly of head of bactiophage T4, Nature, 227:680-685.

Magan, N., Lacey, J., (1984), The effect of temperature and pH on the water relations of field and storage fungi, Tran. Br. Mycol. Soc., 82:71-81.

McCleary, B.V., Clark, A.H., Dea, I.C.M., Rees, D.A., (1985), the fine structure of carob and guar galactomannans, Carbohydrate Research, 139:237-260.

McCleary, V.B., (1979), Modes of action of β-mannanase enzymes of diverse origin of legume seed galactomannans, Phytochemistry, 18:757-763.

McCutchen, M.C., Duffaud, G., Leduc, P., Petersen, A., Tagal, A., Khan, S., Kelly, R., (1996), Characterization of extremely thermostable enzymatic breakers (α-1,6-galactosidase and β-1,4-mannanase) from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for hydrolisis of guar gum, Biotechnology and Bioengineering, 52:332-339.

Mendoza, N.S., Arai, M., Kawaguchi, T., M. Joson, L., (1994), Purification and properties of mannanas from *Bacillus subtilis*, 10:551-555.

Mendoza, S.N., Arai, M., Sugimoto, K., Ueda, M., Kawaguchi, T., Joson, L., (1995), Cloning and sequencing of β-mannase gene from *Bacillus subtilis* NM-39, Biochemica et Biophysica Acta, 1243:552-554.

Minjares-Carranco, A., Trejo-Aguilar, B., Viniegra-González, G., (1997), Physiological comparison between pectinase-producing mutans of *Aspergillus niger* adapted esther to solid-state fermentation on submerged fermentation, Enzyme and Microbial Technology, 21:25-31.

Oda, Y., Tonomura, K., (1996) Characterization of β-mannanase and β-mannosidase secreted from the yeast *Trichosporum cutaneum* JCM 2947, Letters in applied Microbiology, 22:173-178.

Park, Gwi-Gun, Hak-Gil, Chang, (1993), The preparation of cristalline mannobiose from brown copra meal using the enzyme system and yeast fermentation, Journal of Microbiology and Biotechnology, 3 (3):194-198.

Potter, N., La ciencia de los alimentos, EDUTEX, México, 584-595.

Raimbault, M., Alazard, D., (1980), Culture method to study fungal growth in the fermentation, Eur. J. Appl. Microbiol, 9:199-209.

Reese, E.T., Shibata, Y., (1965), β-mannanases of fungi, Can. J. Microbiol, 11:167-183.

Saddler, J.N., (1993), Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues, CAB International, U.K.

Saeki, K., Migashita, Y., Watanabe, Y., Tamai, Y., (1990), Purification and properties of mannanase from *Oerskovia xanthineolytica*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 70:215-221.

Shcherbukhin, V. D.,(1993), Galactomannans of native flora (Review), Applied Biochemistry and Microbiology, 26 (6):599-606.

Sinner, M.P., (1978), Non-corrosive dye reagents for detection of reducing sugars in borate complex ion-exchange chromatography, J. Chromatog., 156:197-204.

Smith, J.E., (1994), *Aspergillus*, Plenum Press, New York.

Solis-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Gutierrez-Rojas, M., (1993), Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations, Appl. Microbiol Biotechnol, 39:36-41.

Stalbrand, H., (1993), Purification and Characterization of two β-mannanases from *Trichoderma ressei*, Journal of Biotechnology, 29:229-242.

Stauffer, C., (1989), Enzyme Assays for Food Scientists, Chap. 4, 61-67, New York.

Sugiyama, N., Simahara, H., Andoh, T., Takemoto, M., (1973), Agr. Biol. Chem., 37:9-17.

Timell, T.E., (1964), Wood hemicelluloses I, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 19:247-295.

Timell, T.E., (1965), Wood hemicelluloses II, Adv. Carbohydrate. Chem., 20:409-483.

Venegas, B. L.M., Regalado, G. C., Huerta, O., S., (1997), Obtención, purificación y caracterización parcial de mananasas por fermentación sólida de bagazo de café y pasta de copra con A. oryzae, Tesis de Maestría, UAQ-UAM.

Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Linko, M., Sundquist, J., (1986) Bleaching with enzymes, Biotechnology in the pulp and paper industry, Proc. 3erd. Int. Conf., pp 67-69.

Yamamura, Y., Matsumoto, J., (1993), Purification and some properties of endo-1,4-β-D-mannanase from a mud snail, *Pomacea insularus* (de ordigny), Biosci. Biotech. Biochem., 57(8):1316-1319.

Zhu, Y., Knol, W., Smits, J.P., Bol, J., (1996), Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillun citrinum* in solid-state fermentation using polyuretane foam as inert carrier, Process Biochem, 18.108-112.

ANEXO 1

I. CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE MANOSA LIBERADA.

La metodología para la preparación de la curva patrón para determinar manosa fue la reportada por Sinner (1978). Se partió de una solución patrón de manosa con una concentración de 1 g/l. Las diluciones que se realizaron cada vez que se preparó la curva patrón de manosa aparecen en la tabla 1A.

Tabla 1A. Diluciones realizadas para preparar la curva patrón de manosa

Solución patrón de manosa (µl) (1)	Agua (µl) (2)	Volumen de análisis Mezcla de 1 + 2 (µl).	Concentración final de manosa (µmol/ml)
100	900	50	1
200	800	50	2
300	700	50	3
400	600	50	4
500	500	50	5
600	400	50	6
700	300	50	7
800	200	50	8

La metodología esta indicada en la sección 4.4.3.4 de materiales y métodos. La curva patrón característica se presenta en la figura 1A. Se leyó a una absorbancia fue de 562 nm.

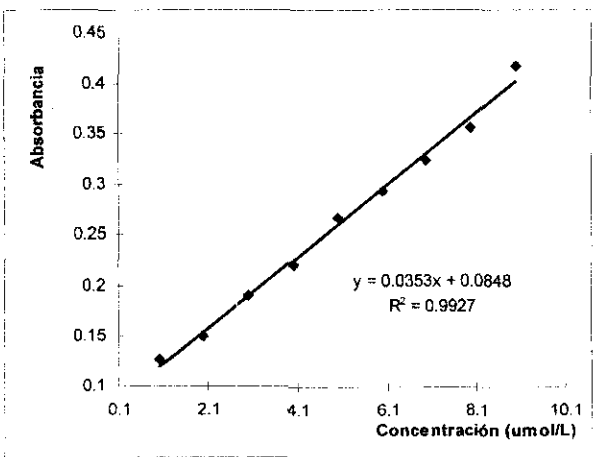


Figura 1A. Curva patrón de manosa

II. CURVA ESTÁNDAR PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE PROTEÍNA.

El método utilizado para conocer el contenido de proteína tanto en el extracto como en los pasos de purificación fue el de Bradford (1976). El procedimiento se menciona en la sección 4.4.3.2 de materiales y métodos. Se utilizó el kit comercial de Bio-Rad® partiéndose de una solución de BSA (Seroalbúmina bovina, fracción IV) con una concentración de 1g/l. Se realizaron diluciones de tal forma que la concentración máxima de proteína no excediera los 11 µg/ml. La curva característica se muestra en la figura 2A. En la tabla 2A se muestran las diluciones realizadas para la preparación de la curva patrón de proteína.

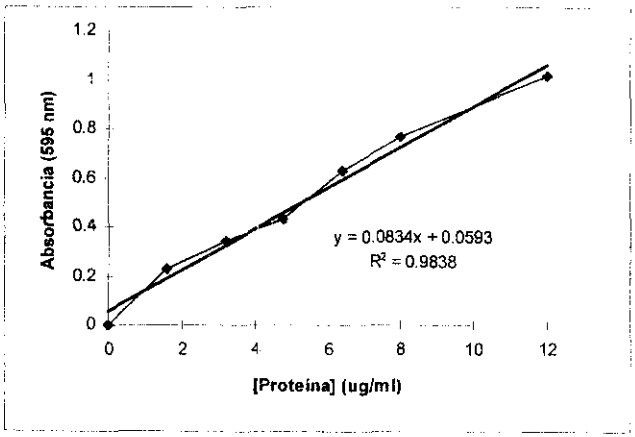


Figura 2A . Curva patrón para calcular el contenido de proteína en la muestras.

Tabla 2A. Diluciones realizadas para la preparación de la curva patrón utilizando el método de Bradford (microensayo).

Solución patrón (10µg/ml) (A)	Agua (µl) (B)	Volumen de análisis (A+B) (µl)	Concentracón de proteína/tubo (µg/ml)
0	1000	800	0
200	800	800	1.6
400	600	800	3.2
600	400	800	4.8
800	200	800	6.5
1000	0	800	8.0

III. CURVA PATRÓN PARA DETERMINAR EL PESO MOLECULAR DE LAS ENZIMAS.

Para determinar el peso molecular de las enzimas se utilizó un marcador de peso molecular de la casa comercial Sigma®. Esta solución de proteínas de peso molecular conocido determina pesos moleculares de 25 KDa a 127 Kda. En la tabla 3A aparecen los pesos moleculares para cada proteína.

Tabla 3A. Pesos moleculares del marcador comercial utilizado

Marcador	Proteína	Peso molecular de la proteína nativa (KDa)	Peso molecular aparente de la proteína preteñida (KDa)
1	β-Galactosidasa (*E. coli*)	116	120
2	Fructosa-6-Cinasa (músculo de conejo)	84	95
3	Purivato Cinasa (músculo de pollo)	58	74
4	Ovalbúmova (huevo de gallina)	45	50
5	Deshidrogenasa Láctica	36.5	39.5
6	Triosafosfato Isomerasa	26.6	35

La curva patrón obtenida al realizar una electroforesis con los marcadores de peso molecular se presenta en la figura 3A.

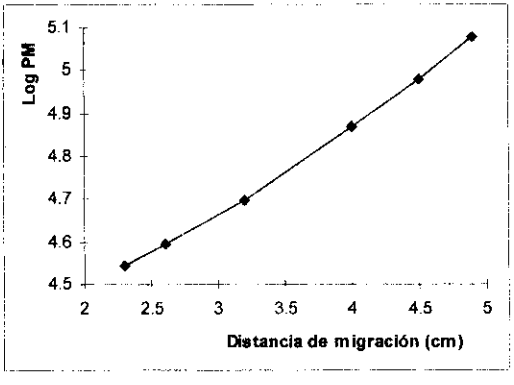


Figura 3A. Curva patrón para determinar el peso molecular delas proteínas.

IV CINÉTICAS PARA DETERMINAR LOS VALORES DE K_M Y V_{MAX}.

Para obtener los valores de K_M y V_{MAX} fue necesario realizar cinéticas de velocidad de actividad de mananasa con diferentes concentraciones de sustrato (0.1-1 %). Las cinéticas fueron de 10 minutos tomando muestra cada minuto. Posteriormente los resultados se graficaron para obtener las pendientes de cada recta y estas se graficaron para obtener la recta de donde se obtuvieron los valores correspondientes de K_M y V_{MAX}.

IV.1 K_M y V_{MAX} para la fracción 4.

Las cinéticas se muestran en la figura 4A donde se presentan los puntos en donde la cinética es aproximadamente lineal. No se presentan las cinéticas correspondientes para las concentraciones de sustrato de 0.6 a 1 debido a la variabilidad que se presento en el método.

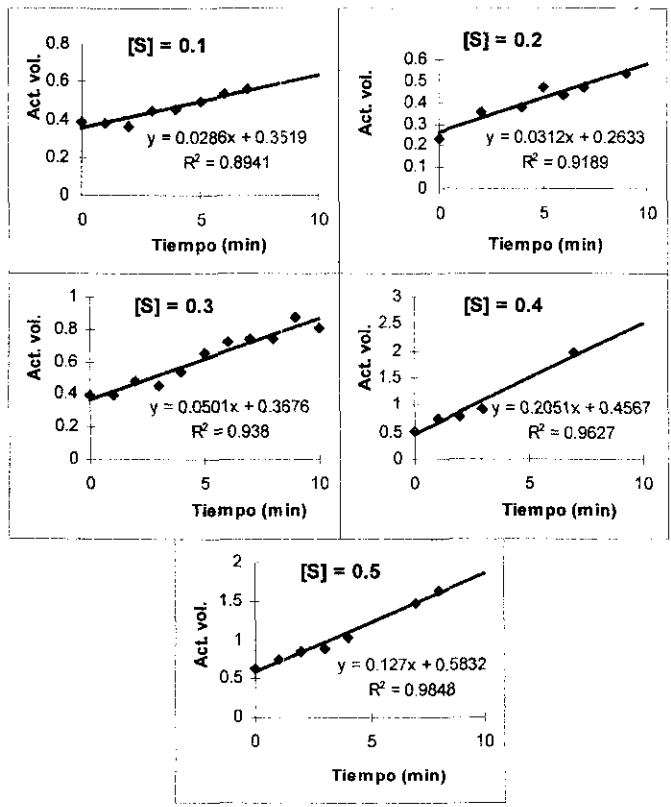


Figura 4A. Cinéticas de actividad volumétrica vs concentración de sustrato.

En la figura 4A sólo se muestran las cinéticas hasta cuando la concentración de sustrato es del 0.5 % (p/v). Las demás cinéticas no se presentan debido a la dispersión de puntos. De los resultados anteriores, se graficaron las respectivas pendientes para obtener los valores de K_M y V_{MAX}. En la figura 5A se presenta la gráfica correspondiente a la ecuación linearizada de Hanes-Wolff con la cual se determinaron los valores de K_M y V_{MAX}.

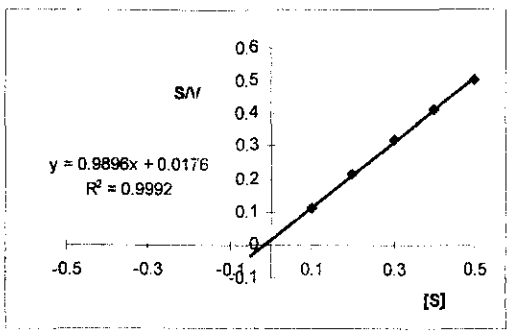


Figura 5A. Gráfica donde se muestra la forma linearizada de Hanes-Wolff a partir de la ecuación de Michaelis-Menten.

Apartir de la ecuación obtenida, se calcularon los valores de K_M y V_{MAX} que se presentan en la sección 5.4.5.

IV.2. K_M y V_{MAX} para la fracción 5.

Al igual que para la fracción 4, se realizaron 10 cinéticas de actividad enzimática probando para cada cinética concentraciones diferentes de sustrato que fueron de 0.1 a 1 % (p/v). Cada cinética fue de 10 minutos, determinando cada minuto la actividad de mananasa. Estos resultados se graficaron y las pendientes respectivas (que representan la velocidad) se graficarón utilizando la forma linearizada de Hanes-Woff. A partir de la ecuación obtenida, se calcularon los valores de K_M y V_{MAX}. Los cálculos se presentas en la sección 5.4.5. Las cinéticas y de la ecuación linearizada de Hanes-Wolf se presentan en las figuras 6A y 7A respectivamente.

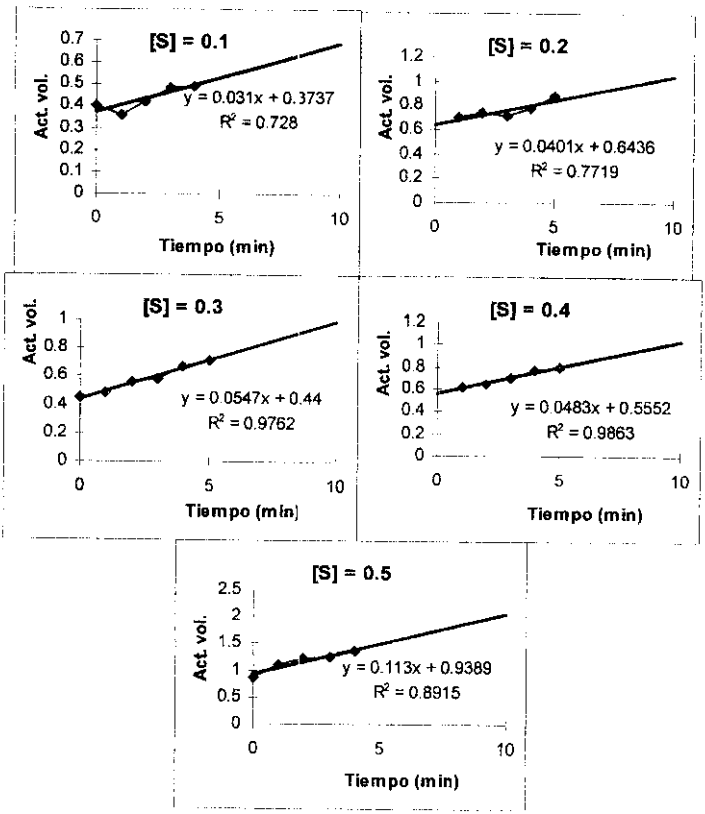


Figura 6A. Cinéticas para determinar la velocidad de actividad enzimática.

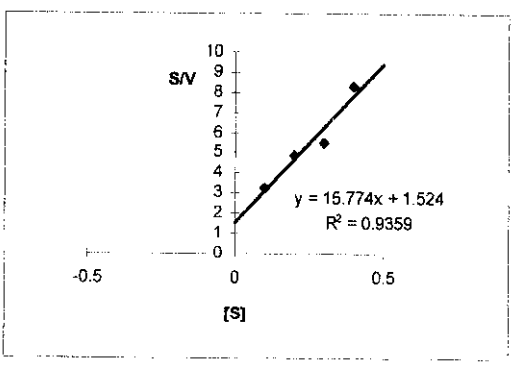


Figura 7A. Ecuación linearizada de Hanes-Wolf para el cálculo de K_M y V_{MAX} para la fracción 5.

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE AMORTIGUADORES

Para la extracción de la proteina del fermento y purificación parcial se utilizó un amortiguador de fosfatos 25 mM, pH 7.6. usando KH_2PO_4 25 mM (x) y NaOH 25 mM (y) en las siguientes proporciones:

Para x = 50.0 %

Para y = 42.4 %

Adicionándo el resto de agua para completar el 100 %.

Para la caracterización de las enzimas se utilizó un amortiguador universal (Stauffer, 1989) con la siguiente composición:

1. Ácido Acético 25 mM
2. Ácido Bórico 25 mM
3. Ácido Fosfórico 25 mM
4. Hidróxido de sodio 25 mM (para ajustar el pH)

Se prepararon volumenes iguales de las soluciones 1,2 y 3, se mezclaron y con la solución de NaOH se ajusto al pH deseado.

ANEXO 3

Para poder determinar cual era el mejor tratamiento de entre *A. niger* y *A. oryzae* utilizado como sustratos borra de café y copra fue necesario utilizar el paquete estadístico SAS cuyo programa aparece a continuación.

```
DATA DisExp;
Input Trata A B C Uenz;
Cards;
1 1 1 2.5 0.9
1 1 1 2.5 0.7
1 1 1 2.5 1.1
2 1 1 5   0.78
2 1 1 5   0.95
2 1 1 5   0.81
3 2 1 2.5 0.67
3 2 1 2.5 0.74
3 2 1 2.5 0.61
4 2 1 5   0.23
4 2 1 5   0.23
4 2 1 5   0.22
5 1 2 2.5 0.77
5 1 2 2.5 1.67
5 1 2 2.5 1.21
6 1 2 5   0.53
6 1 2 5   0.35
6 1 2 5   0.50
7 2 2 2.5 0.37
7 2 2 2.5 0.39
7 2 2 2.5 0.45
8 2 2 5   0.24
8 2 2 5   0.21
8 2 2 5   0.22
PROC GLM;
CLASSES A B C;
MODEL Uenz= A B A*B C A*C B*C A*B*C;
```

```
PROC ANOVA;
CLASSES TRATA;
MODEL Uenz=TRATA;
MEANS TRATA/TUKEY;
RUN;
```

Donde A corresponde a microorganismo (*A. niger* y *A. oryzae*), B a sustrato (borra de café y copra), C a tiempo (2.5 y 5 días) y TRATA a los tratamientos realizados (8). La variable respuesta fue Uenz (unidades de actividad enzimática). Los resultados aparecen en la sección correspondiente de resultados y discusión.

ANEXO 4

TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS

4.1 Electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes

Preparación de soluciones

Solución A (30 % acrilamida, 0.8 % Bis-acrilamida)

30 g de acrilamida (BIO-RAD®)

0.8 g de bis-acrilamida (BIO-RAD®)

Se adicionó agua destilada hasta marcar 100 ml, se agitó hasta la completa disolución.

Solución B. 1.5 M Tris-Cl (pH 8.8) (4x Buffer de separación)

18.2 g de Tris (BIO-RAD®) en 40 ml de agua

Se adicionó HCl (Sigma®) hasta tener el pH de 8.8

Se adicionó agua hasta tener 100 ml

Solución C 0.5 M Tris (pH 6.8) (Buffer concentrador)

6.0 g de Tris en 40 ml de agua

Se adicionó HCl hasta tener un pH de 6.8

Solución D Persulfato de amonio

0.5 g de persulfato de amonio (BIO-RAD®)

5 ml de agua

Solución E. Buffer de electroforesis

3 g de Tris

14.4 g de glicina (BIO-RAD®)

agua suficiente para 1 litro

Solución F. Buffer de muestra 5x

3.1 ml 1M de Tris-Cl (pH 6.8)

5 ml de glicerol (Sigma®)

0.5 ml de azúl de bromofenol (BIO-RAD®) al 1 %.
1.4 ml de agua

Solución G. Solución de Azúl de Coomassie (teñidora)
1 g de Azúl de Coomassie R-250 (BIO-RAD®)
450 ml de metanol (Sigma®)
450 ml de agua
100 ml de ácido acético glacial (Sigma®)

Solución H. Solución de Azul de Coomassie (desteñidora)
100 ml de metanol
100 ml de ácido acético glacial
800 ml de agua

La preparación del gel de separación fue como sigue:

Solución A	x/3 ml
Solución B	2.5 ml
H_2O	(7.5 - x/3) ml
Persulfato de amonio al 10 %	50 µl
TEMED (BIO-RAD®)	5 µl
Volumen total	10 ml

Para este caso x = 12 %

Se mezclaron las soluciones A y B mas el agua, se desgasificó por espacio de cinco minutos, posteriormente se adicionó La solución de persulfato y el TEMED. Esta solución se vació a una cámara de electroforesis (BIO-RAD®, Mini-Protean Gel Electrophoresis Cell) la cual se armó según especificaciones del fabricante. Se dejó polimerizar 30 minutos y se procedió a preparar el gel concentrador según las siguientes especificaciones:

Solución A	0.67 ml
Solución C	1.00 ml
H_2O	2.3 ml
Persulfato de amonio al 10 %	30 µl
TEMED	5 µl
Volumen total	4 ml

Se mezclaron las soluciones A y C mas el agua, se desgasificó por cinco minutos, posteriormente se adicionó la solución de persulfato de amonio y el TEMED, Esta mezcla se adicionó a la cámara de electroforesis insertando cuidadosamente el peine formador de carriles, Se dejó polimerizar cerca de 30 minutos.

Formados los geles, estos se ensamblaron con el electrodo y se insertaron en el tanque de electroforesis, se adicionó el buffer de electroforesis dentro y fuera del reservorio.

La preparación de la muestra fue como sigue:

Se combinó 20 µl de muestra mas 5 µl de buffer de muestra 5x, esta mezcla se introdujo hacia los carriles usando una jeringa Hamilton. Para el caso de los marcadores de peso molecular se utilizo 5 µl de buffer de muestra mas 10 µl de marcador de peso molecular (Sigma®).

El gel se corrió a 150 V constantes por espacio de 1 hora aproximadamente.

Terminado este tiempo, los geles se lavaron con agua destilada y se procedió a teñirlos con la solución de azul de Coomassie. Los geles estuvieron en contacto con esta solución durante 5 minutos después se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Por último, los geles se destiñeron con la solución desteñidora durante toda la noche, pasado este tiempo se secaron en un secador de geles (BIO-RAD®).

4.2 Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes.

Las soluciones utilizadas para esta electroforesis fueron las siguientes:

Solución A. (Solución Stock de acrilamida)
29.2 g de acrilamida (BIO-RAD)
0.8 g de bis-acrilamida (BIO-RAD)

Solución B. (Buffer de separación 4x)
75 ml de Tris-HCl 2 M (pH 8.8)
4 ml de SDS al 10 %
21 ml de H_2O

Solución C. (Buffer concentrador 4x)
50 ml de Tris-HCl 1 M (pH 6.8)
4 ml de SDS al 10 %
46 ml de H_2O

Solución D. (Persulfato de amonio al 10 %)
0.5 g de persulfato de amonio
5 ml de H2O

Solución E. (Buffer de electroforesis)
3 g de Tris
14.4 g de glicina
1 g de SDS
Agua hasta y litro

Solución F. (Buffer de muestra 5x)
0.6 ml de Tris-HCl (pH 6.8) 1 M
5 ml de glicerol al 50 %
2 ml de SDS al 10 %
0.5 ml de 2-mercaptoetanol
1 ml de Azul de Bromofenol al 1 %

0.9 ml de H_2O

Solución G. (Azúl de Coomassie-teñidora)
1 g de Azúl de Coomassie R-250
450 ml de metanol
450 ml H_2O
1000 ml de ácido acético glacial

Solución H. (Azul de Coomassie-desteñidora)
100 ml de metanol
100 ml de ácido acético glacial
800 ml de H_2O

La preparación del gel de separación fue la siguiente:

Solución A	x/3 ml
Solución B	2.5 ml
H_2O	(7.5 - x/3) ml
Persulfato de amonio al 10 %	50 µl
TEMED	5 µl
Volumen total	10 ml

Para este caso x = 12

Se mezclaron las soluciones A y B y el agua. Esta mezcla se desgasificó durante 5 minutos, posteriormente se adicionó la solución de Persulfato de Amonio y el TEMED. Esta solución se adicionó a una Cámara de electroforesis la cual se armó según especificaciones del fabricante. Se dejó polimerizar durante 30 minutos. Pasado este tiempo se procedió a preparar el gel concentrador de acuerdo a la siguiente tabla:

Solución A	0.670 ml
Solución C	1 ml
H_2O	2.3 ml

Persulfato de amonio al 10 %	30 µl
TEMED	5 µl
Volumen final	4 ml

Se combinaron las soluciones A, C y el agua: La solución resultante se desgasificó durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó la solución de Persulfato y el TEMED. La mezcla se vació a la cámara de electroforesis insertando cuidadosamente el peine para formar los carriles donde se adicionará la mezcla a separar. El gel se dejó polimerizar durante 30 minutos. Después se removió cuidadosamente el peine y los geles se ensamblaron con el electrodo y se colocaron dentro de la cámara de electroforesis, se adicionó el buffer de electroforesis dentro y fuera de la cámara. La muestra a ser sometida a la electroforesis se preparo de la siguiente manera:

Se tomo 20 µl de muestra mas 5 µl de solución F, se mezclaron y centrifugaron. Para la preparación de los marcadores de peso molecular se tomaron 5 µl de solución F mas 10 µl de marcador de peso molecular (Sigma®). Estas dos mezclas se introdujeron a los carriles de electroforesis con ayuda de una jeringa Hamilton. El gel se corrió a 150 v constantes durante una hora aproximadamente. Pasado este tiempo se procedió a desteñir el gel de la siguiente manera:

El gel se puso en contacto con la solución G durante cinco minutos posteriormente se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, después el gel se lavó repetidas veces con la solución H para desteñir, por último el gel se dejó toda la noche con la solución H. Pasado este tiempo el gel se secó en un secador de geles.