

Producción de Pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en Cultivo Alimentado

Aurora Martínez-Trujillo¹, Juan S. Aranda², Guillermo Aguilar-Osorio^{3*}

¹Laboratorio de Catálisis enzimática. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Av. Tecnológico esq. Av. Carlos Hank González. Ecatepec, Estado de México, CP 55210

²Departamento de Bioingeniería. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. Av. Acueducto s/n, Col. La Laguna Ticoman, D.F. México, CP 07340

³Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Conj. E, Química. D.F., México, CP 04510, Tel: 56 22 53 05, E-mail: gao@unam.mx

RESUMEN

La producción de pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 con diferentes fuentes de carbono y condiciones de pH del medio fue analizada utilizando el sistema de cultivo alimentado. Para el estudio del efecto de la fuente de carbono la alimentación se realizó alternando pectina y glucosa en la corriente de alimentación, por diferentes periodos de tiempo. En la corriente de alimentación se alternaron las fuentes de carbono en dos formas pectina-glucosa-pectina y glucosa-pectina-glucosa para identificar el efecto inductor/represor cuando se alimentan alternadamente y en concentraciones limitantes sobre la producción de las pectinasas producidas por este hongo. El efecto del pH fue analizado utilizando únicamente pectina en la corriente de alimentación. Los resultados obtenidos indicaron que la producción de exopectinasas es fundamentalmente constitutiva, pero se induce por la presencia de sustancias pécticas y puede sufrir un efecto represor de la glucosa que al parecer es transitorio. Las endopectinasas, cuya producción también es inducida por la pectina, presentan una fuerte represión por glucosa. *A. flavipes* FP-500 produce exopectinasas en un intervalo de pH entre 2.6 y 5.0, mientras que la producción de endopectinasas se restringe a valores de pH entre 3.5 y 5.0.

Palabras clave: pectinasas, cultivo alimentado, *Aspergillus flavipes* FP-500

ABSTRACT

The production of pectinases by *Aspergillus flavipes* FP-500 was analyzed using fed-batch cultures at different pH values and carbon source. To study the effect of carbon source the feeding was made by alternating pectin and glucose in the feeding stream, for different periods of time. The feeding was either pectin-glucose-pectin or glucose-pectin-glucose in order to identify the effect as inductors/repressors of pectin and glucose at limiting concentration on the different pectinolitic activities produced by this fungus. The effect of pH was analyzed using pectin as the only carbon source in the feeding stream. Our results showed that exo-pectinases were produced in constitutive fashion. However, the production of this activity was stimulated in the presence of pectic substances and repressed by the presence of glucose in a transient fashion. Meanwhile, endo-pectinases were clearly induced by pectin and it showed to be strongly repressed by glucose. Exo-pectinases produced by *A. flavipes* FP-500 were favored at pH values between 2.6 and 5.0 while endo-pectinases were only produced in a narrower range of 3.5-5.0.

Key words: Pectinases, fed-batch culture, *Aspergillus flavipes* FP-500

INTRODUCCIÓN

La pectina y las pectinasas

La pared celular de los materiales cítricos está conformada en su mayoría por tres polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y pectina (de Vries & Visser, 2001). La pectina forma parte de la pared celular primaria, y su función es estabilizar a las microfibrillas de celulosa, así como a otros polímeros y proteínas (Annis & Goodwin, 1997). Es un heteropolisacárido de estructura compleja formada por una cadena lineal de unidades de ácido D-galacturónico unidas entre sí por enlaces α ,1-4, en la región del homogalacturonano, misma que en ocasiones puede estar intercaladas con unidades de L-ramnosa, lo que conforma la región del ramnogalacturonano. Esta región se caracteriza además por presentar ramificaciones de carbohidratos de diversos

tipos, como arabinosa, galactosa, xilosa, ácido ferúlico, apiosa y fucosa, entre otros (de Vries y Visser, 2001; Jayani *et al*, 2005). Las pectinasas son un grupo de enzimas de diversos tipos encargadas de degradar a la pectina hasta sus compuestos monoméricos elementales. Las actividades enzimáticas que actúan sobre la cadena principal de la pectina comprenden a las hidrolasas, que actúan sobre los enlaces α -1,4-glicosídicos. Dado su modo de acción estas pueden ser del tipo endo, si actúan de manera aleatoria a lo largo de la cadena principal, o exo, si actúan sobre los finales no reductores de los oligogalacturónidos (Kashyap *et al.*, 2001; Niture, 2008).

Regulación de la actividad pectinolítica

Las pectinasas pueden tener distintas funciones, en dependencia del organismo

que las produce. Así, mientras que en los hongos saprófitos, como *A. niger*, estas enzimas son importantes para proveer al microorganismo los nutrientes a partir de los materiales de su medio ambiente, en el caso de los microorganismos fitopatógenos, como *A. flavus*, intervienen en la degradación de la pared celular durante el proceso de invasión microbiana a las células vegetales (Parenicová, 2000).

Considerando la complejidad y tamaño molecular de los polisacáridos que conforman a los materiales que suelen invadir los hongos filamentosos, es clara la dificultad para su asimilación cuando dichos materiales fungen como su único sustrato. A ese respecto se ha demostrado que los hongos saprófitos producen de manera constitutiva una serie de isoformas de poligalacturonasas, cuya acción primaria sobre la pectina provoca la liberación de oligosacáridos y algunos grupos reductores, que a su vez inducen la expresión de las enzimas necesarias para lograr la acción masiva necesaria sobre esta estructura (Wubben *et al.*, 2000). Adicionalmente, la expresión de los genes inducibles es susceptible de regulación por represión catabólica por carbono (de Vries & Visser, 2003).

Los procesos de regulación de la expresión de pectinasas no han sido plenamente elucidados, debido a la complejidad y diversidad de los sustratos que las inducen. Sin embargo, se ha observado

que la síntesis del complejo pectinolítico pareciera estar controlada, al nivel de transcripción, por al menos tres mecanismos diferentes: la inducción específica por pectina o ácido galactrónico, la represión catabólica mediada por el factor transcripcional CreA y la regulación por el pH ambiental, controlada por el factor transcripcional PacC (Bruno-Bárcena *et al.*, 2002).

Respecto a la inducción del sistema pectinolítico, se ha reportado en *A. niger* al ácido D-galacturónico y la pectina como los principales inductores de la expresión de la mayoría de los genes que codifican para enzimas pectinolíticas (de Vries, 2003), mientras que fuentes como la L-arabinosa, L-ramnosa o ácido ferúlico provocan la expresión de subseries de genes pectinolíticos. En lo que se refiere a la represión catabólica de las pectinasas, se ha observado que muchas de estas enzimas, dependiendo del sistema biológico que las produzca, pueden sufrir represión catabólica por carbono. Los principales represores de los sistemas pectinolíticos son las fuentes de carbono fácilmente metabolizables, como glucosa, fructosa y sacarosa. El principal elemento involucrado en el proceso de represión catabólica de las pectinasas es la proteína CreA (Parenicová, 2000; de Vries, 2003; Akimitsu *et al.*, 2004).

Por otro lado, el pH del medio de cultivo evoluciona a medida que sucede la producción de metabolitos por parte de los microorganismos que se están desarrollando

en el medio. De hecho, el pH del medio tiene un efecto importante sobre el crecimiento y la formación del producto, al influenciar tanto la ruptura de los sustratos como el transporte de estos y de los productos a través de la pared celular.

Los microorganismos producen enzimas activas en amplios intervalos de pH como estrategia de supervivencia (Prusky & Yakobi, 2003). Aún cuando se ha documentado la secreción de enzimas y metabolitos de diversos tipos en dependencia del pH del cultivo, todavía no se ha profundizado en el estudio de tales procesos regulatorios para la producción de pectinasas por microorganismos saprófitos. Existen reportes en los que se mencionan algunos genes de *A. nidulans* sujetos a regulación por el pH ambiental, con lo que se ha logrado saber que las poligalacturonasas se secretan a bajos pH, mientras que las pectato liasas lo hacen cuando el pH del medio se incrementa, lo que sugiere que los patógenos son capaces de modular el pH del huésped como un mecanismo para incrementar su potencial invasivo (Eshel *et al.*, 2002). En general, la regulación de la expresión de poligalacturonasas por el pH está mediada por la acción de la proteína PacC (de Vries & Visser, 2001).

Los sistemas de cultivo y su utilidad en el estudio fisiológico de la producción de enzimas

Cuando se desea estudiar tanto la fisiología como los aspectos cinéticos y metabólicos que conlleva la producción de pectinasas, se opta por el uso de metodologías desarrolladas en cultivos líquidos en donde los parámetros involucrados sean de fácil medición, con las que sea posible generar correlaciones (Teixeira *et al.*, 2000; Jacob & Prema, 2006; Oncu *et al.*, 2006; Favela-Torres *et al.*, 2006; Cavalitto & Mignone, 2007; Gummadi & Kumar, 2008). Dos de las técnicas más utilizadas para tal fin son el cultivo en lote y el cultivo en lote alimentado.

El cultivo en lote es uno de los métodos más simples empleados para el desarrollo de cultivos líquidos. Se caracteriza por el hecho de que la concentración de sustratos, productos y células, así como el estado fisiológico y metabólico celular, cambian con el tiempo del proceso. De igual manera, parámetros como el pH y el oxígeno disuelto cambian, a menos de que se establezcan estrategias adecuadas para su control (Ramírez Reivich, 2004).

Cuando la generación de productos y subproductos provoca efectos negativos sobre la formación de los metabolitos de interés, o bien el sistema de producción es susceptible a represión por la concentración del sustrato, una alternativa es el empleo del cultivo alimentado. En este, uno o varios de los nutrientes limitantes se suministran a lo largo del cultivo y la alimentación de los sustratos puede hacerse por pulsos, o de

manera continua; por lo que el volumen del cultivo se incrementa. A pesar del cambio en el volumen de operación, el valor de ciertas variables clave, como las concentraciones del sustrato y biomasa pueden controlarse en valores relativamente constantes. Mediante el desarrollo del cultivo alimentado se puede además controlar la velocidad de crecimiento dentro de los intervalos que favorezcan una función objetivo particular (Ramírez Reivich, 2004; Najafpour, 2007).

Con lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivo el uso del cultivo alimentado para estudiar el efecto de la fuente de carbono en concentraciones limitantes y el pH del medio sobre la producción de poligalacturonasas por *Aspergillus flavipes* FP-500.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo.

Se utilizó la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500, que se mantuvo en refrigeración en cajas con agar papa-dextrosa mediante resiembras periódicas.

Composición del medio.

Para todos los experimentos, *A. flavipes* FP-500 se hizo crecer en medio basal, que contenía, en g/L: K_2HPO_4 , 2; KH_2PO_4 , 2; y $(NH_4)_2SO_4$, 5. El pH inicial del medio se ajustó con la ayuda de soluciones de NaOH o H_2SO_4 2 M, hasta lograr el valor deseado en cada caso. El medio se esterilizó a 121°C y 1.5 psia durante 20 min. A esta solución basal se adicionó, al momento de la

inoculación, la fuente de carbono en la concentración final adecuada para cada experimento.

Inóculo

La suspensión de esporas que sirvió como inóculo se obtuvo a partir de cultivos desarrollados en cajas petri con tres días de crecimiento, utilizando solución salina (NaCl al 0.9%). Cada experimento se inoculó con el volumen adecuado de esta suspensión para tener 1×10^6 esporas/mL.

Cultivo por lote en fermentador.

Para observar la evolución de los parámetros de operación a lo largo del cultivo y conocer la relación de este con la producción de las pectinasas, se utilizó un biorreactor BioFlo 110, Newbrunswick Scientific, de 7 L, con 5 L de volumen de operación. Durante el desarrollo de estos experimentos se utilizó el medio basal descrito previamente, y como única fuente de carbono se empleó glucosa o pectina al 1% (p/v). Todos los experimentos se inocularon con 1×10^6 esporas/mL. Los cultivos operaron a 400 rpm, 37°C y 0.5 vvm de aire, registrando la evolución del oxígeno disuelto (dO₂). Se retiraron aron muestras periódicas cada 4 h, a las cuales se les determinó la concentración de biomasa, el consumo de sustrato, la concentración de grupos reductores y las actividades pectinolíticas, mediante las técnicas descritas más adelante.

Artículos

Cultivo alimentado en fermentador

Para su diseño y análisis cinético, tanto el cultivo por lote como el cultivo alimentado parten de los mismos balances de materia. Así, las ecuaciones que definen los balances

$$\frac{d(V\rho)}{dt} = \rho F$$

$$\frac{dXV}{dt} = q_X V$$

$$\frac{dSV}{dt} = -q_S V$$

$$\frac{dPV}{dt} = q_P X V$$

Donde V es el volumen de reacción, ρ es la densidad del medio de cultivo y F representa al flujo de alimentación; mientras que las expresiones de velocidad (q_X , q_S y q_P) se definen como:

$$q_X = \mu X$$

$$q_S = -\frac{q_X}{Y_{XS}}$$

$$q_P = \frac{dP}{dt} = -Y_{PS} \frac{dS}{dt}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento. Estas ecuaciones asumen que el sustrato sólo se usa para la formación de biomasa (x) y producto (p). Y_{XS} y Y_{PS} representan el rendimiento de conversión del sustrato en biomasa y producto, respectivamente, y se definen como:

$$Y_{XS} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{Sustrato consumido}}$$

$$Y_{PS} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\text{Producto generado}}{\text{Sustrato consumido}}$$

Estas ecuaciones de balance describen el comportamiento macroscópico promedio del sistema de producción, y dependiendo del tipo de cultivo que se esté desarrollando,

para la masa total del sistema de reacción ($V\rho$), generación de biomasa (X), consumo de sustrato (S) y la formación de producto (P) se expresan mediante las ecuaciones diferenciales:

Balance total de masa

Para generación de biomasa

Para consumo de sustrato

Para generación de producto

las ecuaciones toman formas específicas para describir el comportamiento del mismo, tal como se muestra en la Tabla 1.

Artículos

Tabla 1. Balances de materia para el cultivo en lote y el cultivo alimentado a partir de los balances generales¹.

Parámetro para balance	Cultivo en lote	Cultivo alimentado ²
	Volumen constante, no hay flujo de entrada	Volumen variable, existe flujo de entrada
Volumen	$\frac{dV}{dt} = 0$	$\frac{dV}{dt} = F$
Flujo	$F = 0$	$F \neq 0$
Generación de Biomasa	$\frac{dX}{dt} = q_x = \mu X$	$\frac{dX}{dt} = \mu X - \left(\frac{F}{V}\right)X$
Consumo de sustrato	$\frac{dS}{dt} = -q_s X = -\frac{1}{Y_{XS}} \mu X$	$\frac{dS}{dt} = \left(\frac{F}{V}\right)S_0 - \frac{1}{Y_{XS}} \mu X$
Generación del producto	$\frac{dP}{dt} = q_p X$	$\frac{dP}{dt} = q_p X - \left(\frac{F}{V}\right)P$

¹ Para el desarrollo de las ecuaciones específicas para cada cultivo, se expandieron los términos diferenciales, calculando los productos de las dos derivadas.

² La relación entre el flujo y el volumen (F/V), se conoce como Factor de dilución (D).

Para establecer el cultivo alimentado, se utilizaron los parámetros cinéticos del microorganismo al desarrollarse en un cultivo en lote sobre la fuente de carbono deseada (glucosa o pectina), en un valor de pH constante, mismos que se indican en la Tabla 2. Los cultivos comenzaron en un volumen de 2 L bajo la operación de cultivo por lote, aunque se formularon con la concentración de sales adecuada para un volumen final de 5 L y la aireación se suplementó a 2.5 L/min a lo largo de todo el régimen de alimentación.

Con ello se logró que en todo momento tanto las sales que componían al medio basal como la oxigenación estuvieran en exceso. La alimentación comenzó cuando el sistema presentaba condiciones de baja concentración de sustrato (<1 g/L). La concentración de biomasa obtenida al alcanzar esa condición sirvió para calcular la concentración que debería tener el sustrato en el flujo de alimentación, mediante la siguiente expresión:

$$S_0 = \frac{X_{Lote}}{Y_{XS}}$$

Donde

S_0 es la concentración de sustrato en la corriente de alimentación.

Artículos

X_{Lote} es la concentración de biomasa en el tiempo en que se alcanzan las condiciones adecuadas para comenzar a alimentar.

Y_{XS} es el rendimiento biomasa-sustrato, parámetro calculado a partir de la modelación de los resultados obtenidos del cultivo en lote.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de cultivos en lote utilizados para calcular la concentración de sustrato en la alimentación

Sustrato utilizado en el cultivo base	Parámetros cinéticos ¹		Tiempo en el que $S_{lote} \leq 1$ (h)	X_{Lote} (g/L)	S_0 (g/L)
	μ (h^{-1})	Y_{XS} (g/g)			
Glucosa	0.0716	0.2259	90	1.4	6.17
Pectina	0.6218	0.5869	44	4.06	6.92

¹ Los parámetros cinéticos se calcularon a partir del cultivo por lote desarrollado en la fuente de carbono correspondiente y se estimaron mediante el procedimiento reportado en Martínez-Trujillo et al (2008)

Para el proceso de alimentación se utilizó un flujo de 0.042 L/h, con el objetivo de incrementar 1 L/día el volumen del reactor. El régimen de alimentación se dividió en tres etapas de 24 h, mediante las cuales se intentó resolver si las condiciones específicas empleadas en cada caso provocaban un cambio en la producción de pectinasas. No obstante el régimen de alimentación, durante la primera etapa se utilizaron las mismas condiciones del cultivo lote que sirvió como proceso iniciador.

Para descartar el efecto de la evolución del pH sobre la producción de las pectinasas, el valor de este parámetro se mantuvo constante durante todo el experimento, mediante la adición de NaOH o H₂SO₄ 2 M. Durante la alimentación los cultivos se mantuvieron a 37°C y una agitación de 400

rpm, tomando muestras periódicas cada 4 h. Las muestras se filtraron, para cuantificar la concentración de biomasa, y la fracción filtrada se mantuvo en congelación hasta su análisis, en el cual se cuantificó la concentración de sustratos, carbohidratos reductores y las actividades pectinolíticas.

Los regímenes de alimentación utilizados en esta etapa experimental fueron de dos tipos. En el primero, se revisó el efecto de la fuente de carbono, mientras que con el segundo se analizó el resultado de la variación del pH sobre la producción de las pectinasas por *A. flavipes* FP-500. La Tabla 3 muestra la sucesión de sustratos utilizados durante las etapas de alimentación de los experimentos desarrollados en el primer bloque.

Artículos

Tabla 3. Sucesión de fuentes de carbono durante la etapa de alimentación en el cultivo alimentado.

Experimento	Fuente de carbono utilizada en el cultivo lote base	Fuente de carbono alimentada en la Etapa I	Fuente de carbono alimentada en la Etapa II	Fuente de carbono alimentada en la Etapa III
Pec-Glu-Pec	Pectina	Pectina	Glucosa	Pectina
Glu-Pec-Glu	Glucosa	Glucosa	Pectina	Glucosa

Técnicas de analíticas

Cuantificación de la concentración de biomasa.

El crecimiento celular obtenido en cada muestra se determinó mediante la técnica de peso seco, expresándose en g/L.

Cuantificación de la actividad de exopectinasas.

La actividad exopectinolítica se cuantificó mediante la determinación de los carbohidratos reductores producidos después de incubar una mezcla de pectina al 1% (p/v) pH 5 y regulador de acetatos 100 mM con la muestra, a 45 °C durante 20 min. Las lecturas obtenidas se compararon contra una curva patrón de ácido galacturónico (1 mg/mL). Una unidad de actividad exopectinolítica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de ácido galacturónico bajo las condiciones de ensayo (Trejo-Aguilar *et al.*, 1996).

Cuantificación de la actividad de endopectinasas.

La actividad de endopectinasas se determinó con base en el cambio relativo que provocaban 0.5 mL de muestra sobre la viscosidad de 10 mL de una solución de pectina al 1% (p/v) pH 4.2, con la ayuda de un viscosímetro Canon Fenske # 200. Una unidad de actividad endo se definió como la cantidad de enzima capaz de reducir la viscosidad de la pectina en un 50% después de 10 min de reacción (Trejo-Aguilar *et al.*, 1996).

Cuantificación de la concentración de azúcares reductores.

El consumo de sustrato (en los experimentos con monosacáridos como fuentes de carbono) o la aparición de grupos reductores (en el caso de las fermentaciones con polisacáridos como fuentes de carbono) se determinaron mediante la cuantificación de carbohidratos reductores en las muestras, utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). La cantidad adecuada de muestra se llevó a un volumen final de 1 mL, considerando que la concentración máxima de muestra que detecta esta técnica es de 1

mg/mL. A la muestra diluida adecuadamente, se le agregaron 2 mL del reactivo DNS y se sometieron a ebullición por 5 min. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 5 mL de H₂O y se leyeron en el espectrofotómetro a 575 nm, utilizando un blanco preparado con agua en vez de muestra. La concentración obtenida en cada caso se calculó utilizando las curvas patrón de los azúcares correspondientes.

Cuantificación de la concentración de pectina en los cultivos.

El consumo de sustrato en los experimentos en los que se utilizaron polisacáridos como fuente de carbono se estimó mediante la técnica descrita por Dubois *et al.* (1956). Para ello, la cantidad necesaria de muestra se llevó a un volumen final de 2 mL, considerando que la concentración máxima de muestra que detecta esta técnica es de 0.1 mg/mL. A la muestra diluida adecuadamente, se le agregó 1 mL de fenol al 5% (p/v) y 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Después de dejar reposar los tubos durante 20 min, estos se leyeron en el espectrofotómetro a 480 nm, utilizando un blanco preparado con agua en vez de muestra. Las lecturas se compararon contra curvas patrón de pectina o ácido poligalacturónico, para determinar la concentración del polisacárido correspondiente en cada tiempo de operación del cultivo.

RESULTADOS

Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de pectinasas

Para el desarrollo de esta etapa experimental, se realizaron dos cultivos. Para ambos, se estableció un cultivo por lote con la fuente de carbono que serviría como base de análisis, en una concentración de 10 g/L. Cuando se alcanzó una concentración menor de 1 g/L de esa fuente de carbono, misma que se indica en la Tabla 2, comenzó la secuencia de alimentación correspondiente, de acuerdo al orden de alimentación señalado en la Tabla 3. Cada etapa de alimentación duró 24 h, durante las cuales se retiraron muestras cada 4 h para su posterior análisis. Después de que se concluyó la alimentación (lo que se indica con la flecha en las figuras correspondientes), se permitió que el cultivo continuara desarrollándose durante 6 h más, y se tomaron dos muestras ante esas condiciones, antes de dar por concluido el experimento.

Los cultivos se desarrollaron en condiciones fisiológicas aproximadamente constantes a lo largo del régimen de alimentación, como se puede apreciar en la figura 1.

En el experimento Pec-Glu-Pec (ver tabla 3), la concentración de biomasa a lo largo del proceso de alimentación se mantuvo prácticamente constante en las etapas I y II, en un valor entre 1.5 y 2 g/L, y se incrementó en la Etapa III, donde se alcanzaron valores de casi 3 g/L. Sin embargo, al final de esta

Artículos

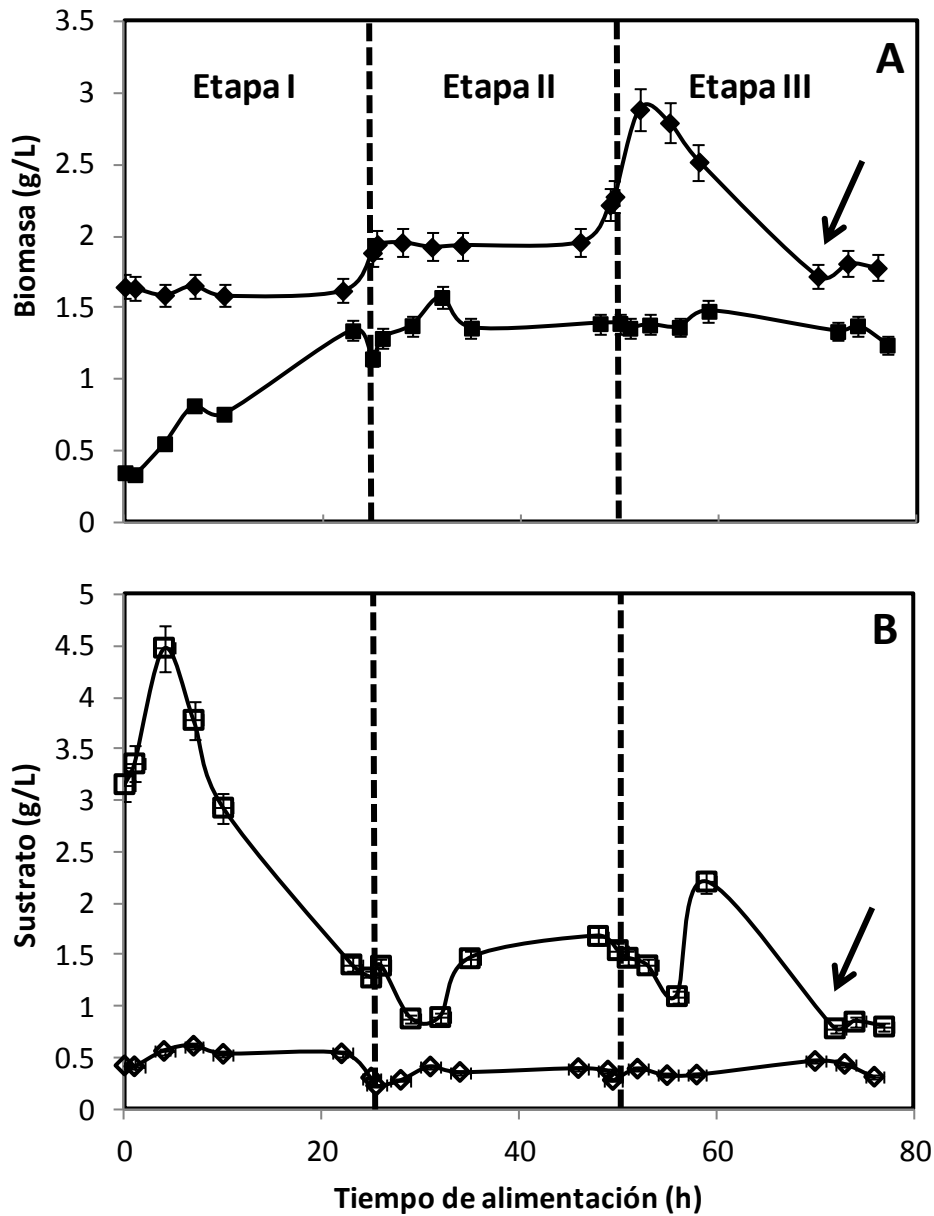


Fig. 1. Evolución de la concentración de Biomasa (A) y Sustrato (B) durante las etapas de alimentación del cultivo alimentado en los experimentos Pec-Glu-Pec (◆ y ◇) y Glu-Pec-Glu (■ y □). Las flechas indican el final de la fase de alimentación.

etapa la concentración de biomasa volvió a decrecer, llegando a los valores encontrados en un inicio (figura 1A). En lo que respecta a la concentración de pectina, ésta se mantuvo

constante a lo largo del régimen de alimentación (figura 1B).

En el experimento Glu-pec-Gluc la biomasa se incrementó de 0.3 a 1.3 g/L

Artículos

durante la Etapa I y luego permaneció constante hasta el final de la operación del cultivo (figura 1A), lo que fue congruente con el consumo de sustrato, que sucedió principalmente en la Etapa I, luego de la cual la concentración alcanzada se mantuvo constante, no obstante el proceso de alimentación (figura 1B). Para bloquear el

efecto del incremento de biomasa en alguna de las etapas de alimentación, así como el de la dilución generada por la alimentación, se reportan las actividades enzimáticas por gramo de biomasa. En lo que respecta a la producción de exopectinasas, en el experimento Pec-Glu-Pec (Figura 2A), esta actividad pectinolítica se mantuvo prácticamente

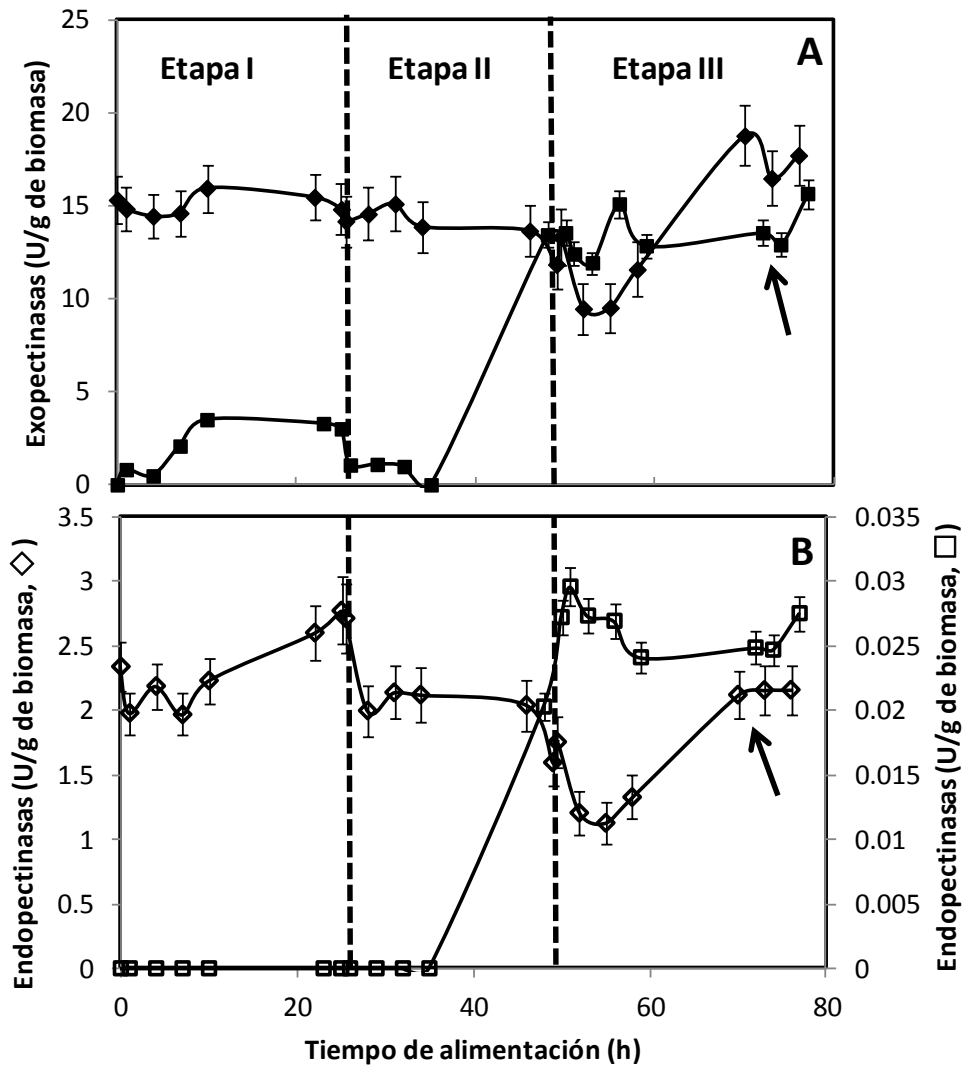


Fig. 2. Evolución de la producción de exopectinasas (A) y endopectinasas durante las etapas de alimentación del cultivo alimentado en los experimentos Pec-Glu-Pec (◆ y ◇) y Glu-Pec-Glu (■ y □). Las flechas indican el final de la fase de alimentación.

constante a lo largo de las Etapas I y II, alrededor del valor obtenido con el cultivo en lote (\square 15 U/g de biomasa. Sin embargo, hacia el final de la Etapa II esta actividad disminuyó casi a la mitad, aunque luego recuperó hasta ser incluso ligeramente mayor que la observada en un principio.

Durante el experimento Glu-Pec-Glu, la producción de exopectinasas fue muy baja (\sim 3 U/g de biomasa) durante la Etapa I y la mitad de la Etapa II, aunque luego se incrementó cuatro veces, hasta alcanzar \sim 20 U/g de biomasa, en la que se mantuvo hasta el final de la operación del régimen de alimentación.

En lo que se refiere a la producción de endopectinasas, en el experimento Pec-Glu-Pec, esta se mantuvo prácticamente constante alrededor de 3 U/g e biomasa durante todo el proceso de alimentación (figura 2B). En el experimento Glu-Pec-Glu, la producción de endopectinasas no se observó durante el cultivo por lote desarrollado sobre glucosa, ni durante la Etapa I, donde la glucosa fue la fuente de carbono utilizada en la alimentación. Con la pectina, esta actividad se incrementó hasta \sim 0.03 U/g de biomasa, pero la alimentación de glucosa en la Etapa III disminuir 17%, para luego mantenerse constante hasta el final del régimen de alimentación (figura 2B).

La relación del pH con la producción de pectinasas por A. flavipes FP-500

Para complementar los resultados obtenidos, se verificó el efecto de pH del medio sobre la producción de las pectinasas en condiciones fisiológicas cuasiestables. Para lo anterior, se llevó a cabo un cultivo alimentado, cuya base se desarrolló sobre pectina. En este caso, las diferentes etapas del régimen de alimentación se establecieron con base en el pH del cultivo. Así, la alimentación se realizó siempre con pectina pero durante la Etapa I el pH se mantuvo constante en 3.5, luego este se incrementó a 5.0 durante la Etapa II, y por último se bajó hasta 2.6 durante la última etapa de alimentación.

Como se puede observar, la concentración de biomasa permaneció relativamente constante durante las primeras dos etapas, mientras que en la última fase dicha concentración disminuyó notablemente (figura 3A). Como en el caso anterior, las actividades enzimáticas se reportan específicamente por g de biomasa. Durante Etapa I la producción de exopectinasas se incrementó ligeramente (Gráfica 3B), mientras que la de endopectinasas lo hizo casi 1 U/g de biomasa (figura 3C). En la Etapa II, la actividad exopectinolítica se incrementó \sim 7 U/g de biomasa (figura 3B), mientras que la producción de endopectinasas permaneció aproximadamente constante (figura 3C). Durante la Etapa III, correspondiente al valor más bajo de pH en el medio, la actividad de exopectinasas disminuyó hasta los valores obtenidos

Artículos

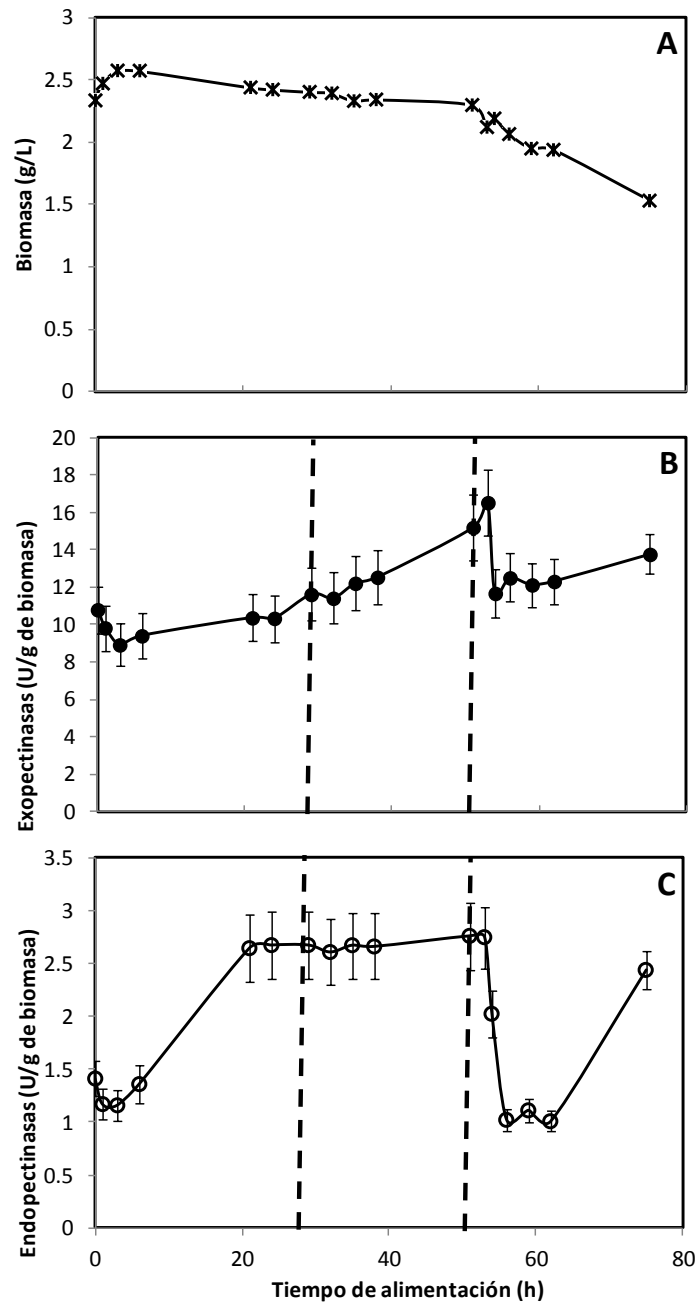


Fig. 3. Evolución de la Biomasa (A), producción de exopectinasas (B) y endopectinasas (C) producidas por *A. flavipes* FP-500 en un cultivo en lote alimentado desarrollado sobre pectina. En el régimen de alimentación se utilizó pectina en una concentración de 6.92 g L^{-1} y un flujo constante de 0.042 L h^{-1} . Durante la etapa I, se mantuvo el pH del medio constante en un valor de 3.5, en la etapa II el pH del medio fue de 5.0, y en la etapa III se provocó una disminución en el pH hasta 2.0. Se tomaron muestras periódicas cada 4 h durante el régimen de alimentación.

durante la Etapa I, y se mantuvo relativamente constante hacia el final de la alimentación (figura 3B), pero la actividad de endopectinasas sufrió primero una disminución severa durante las primeras horas de la Etapa III, aunque después se incrementaron hasta llegar al valor obtenido durante la Etapa II (figura 3C).

DISCUSIÓN

Los resultados observados en el estudio del efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de pectinasas durante todas las etapas de alimentación sugieren que existe un momento, al inicio de las Etapas II y III, en el que hay una mezcla de las dos fuentes de carbono que han sido alimentadas al reactor. Además es muy probable que durante esa etapa de transición ambas fuentes de carbono sean utilizables por el microorganismo. A pesar de que ante las condiciones probadas no fue posible conocer la velocidad de consumo que presentó el microorganismo para cada una de ellas, es altamente probable que la fuente de carbono que se alimentó primero siga consumiéndose o bien comience a diluirse por efecto de la alimentación de la segunda. En cualquier caso, llegará un momento en el que la concentración de la fuente de carbono que se está alimentando en la etapa analizada será considerablemente mayor, y ejercerá el mayor efecto sobre el microorganismo. Al

parecer, este fenómeno sucede alrededor de las 14 h después del cambio en el sustrato de alimentación. El efecto de la mezcla de dos sustratos durante la operación de un cultivo alimentado se ha observado en diferentes procesos, por lo que se ha convertido en un parámetro de consideración para estudios de control de los procesos desarrollados mediante esta modalidad de cultivo (Picco-Marco & Navarro, 2008).

A partir del razonamiento anterior, y con base en el comportamiento observado se puede apreciar que la glucosa favoreció la formación de biomasa durante la alimentación (figura 1A), mientras que la alimentación de pectina permitió el mantenimiento de las condiciones fisiológicas pseudoestables. El efecto positivo de la glucosa en cultivos alimentados sobre el crecimiento es congruente con lo reportado para *Aspergillus niger* durante la producción de ácido cítrico (Papagianni *et al.*, 1999).

En lo que respecta a la producción de las poligalacturonasas, esta disminuyó cuando se utilizó glucosa en la corriente de alimentación (figuras 2A y 3A), lo que sugiere el efecto represor de esta fuente de carbono. Por otro lado, el evidente incremento que se obtuvo al sustituir la glucosa por pectina como la fuente de carbono predominante dentro del cultivo, indica el efecto inductor de la pectina sobre las mismas. Ambas observaciones son congruentes con lo

reportado para las pectinasas producidas por hongos del género *Aspergillus* (de Vries & Visser, 2001).

En lo que respecta a las actividades pectinolíticas del tipo exo producidas durante las fases de alimentación en las que la glucosa era la fuente de carbono principal, estas podrían corresponder a las isoformas constitutivas que se han sugerido para las exopectinasas de *A. flavipes* FP-500 (Martínez-Trujillo *et al.*, 2009), en concordancia con las reportadas para *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (Aguilar & Huitrón, 1990), *A. niger* (Solís-Pereira *et al.*, 1993; Patil & Dayanand, 2006) y *A. japonicus* 586 (Teixeira *et al.*, 2001), entre otros. Además se debe destacar que, al sustituir la glucosa por la pectina en el reactor, la producción pectinolítica que había disminuido por acción de la primera volvió a incrementarse. Esto sugiere que la represión causada por la glucosa sobre la producción de exopectinasas podría ser transitoria o bien que existen isoformas de estas enzimas que son inducidas por pectina y que no se encuentran bajo el control del regulador CreA, por lo que no se ven afectadas por la presencia de glucosa. Por otra parte, el que no se observe una disminución en la actividad exopectinolítica debido a la adición de glucosa en la Etapa III podría deberse a que en este caso la concentración de glucosa es baja, y no aporta al efecto represor de esta fuente de carbono. Esto es congruente con lo observado para las poligalacturonasas

de *A. terreus*, que no parecieron estar sujetas a represión cuando había concentraciones bajas de glucosa en el medio (Runco *et al.*, 2000).

En lo que se refiere a la producción de la actividad endopectinolítica, esta no se observó en el cultivo en lote desarrollado en glucosa, además de verse muy afectada en los casos donde se sustituyó a la pectina por la glucosa como la fuente de carbono predominante. Esto muestra claramente el efecto represor que tiene la glucosa sobre esta actividad enzimática, mismo que ya había sido reportado anteriormente para otras cepas del género *Aspergillus* (de Vries & Visser, 2001).

Por otro lado, en lo que se refiere al efecto del pH sobre la producción de las pectinasas, en primera instancia se puede observar que la concentración de biomasa permaneció relativamente constante durante las primeras dos etapas de alimentación, mientras que en la última fase dicha concentración disminuyó notablemente (figura 3A). Lo anterior podría deberse al pH tan ácido en el que transcurrió esta última etapa, como sucedió con *Aspergillus oryzae* (Malvessi & Moura, 2004). Por otro lado, como en estos experimentos no hubo cambio en la fuente de carbono utilizada en la alimentación, el efecto del cambio de pH se observó de manera más inmediata.

En lo que se refiere a la producción de exopectinasas, a pesar de que el pH del medio se mantuvo constante, durante la

Etapa I de alimentación la producción de estas enzimas se incrementó 2.16 veces. Al parecer, esto mostró el efecto inductor de la pectina sobre la producción de esta actividad pectinolítica, como ya se había reportado antes para *Aspergillus* sp. en un cultivo alimentado (Aguilar & Huitrón, 1986). En la Etapa II, la actividad exopectinolítica se incrementó (figura 3B), lo que sugiere que existe un efecto positivo de los valores de pH cercanos a la neutralidad sobre la expresión de las exopectinasas.

Por otra parte, la producción de endopectinasas igualmente se incrementó durante Etapa I, aunque permaneció aproximadamente constante durante la segunda etapa de alimentación (figura 3C). Al parecer, en el pH de 3.5 se favoreció la producción de esta actividad pectinolítica, pero no así a pH de 5.0. Esto se concluyó luego de analizar que la estabilidad de las endopectinasas producidas en la Etapa I no se modificó en un pH de 5.0 (datos no mostrados). Finalmente, dado que la actividad endopectinolítica de *Aspergillus flavipes* FP-500 es muy estable en valores de pH ácidos (resultados no publicados), la disminución observada al inicio de la Etapa III podría deberse al decremento en la concentración de biomasa sucedido en esa etapa, mientras que el incremento observado en la segunda parte de la Etapa III sugiere que en esta fase se indujo la formación de endopectinasas ácidas.

Mediante el empleo del cultivo alimentado fue posible identificar el efecto de la fuente de carbono y el pH sobre la producción de pectinasas de *A. flavipes* FP-500. Los resultados obtenidos sugirieron que estas enzimas parecen presentar represión catabólica por glucosa, que es severa sobre las endopectinasas pero transitoria para las exopectinasas. La pectina tiene un fuerte efecto inductor sobre ambas actividades pectinolíticas. Además, las pectinasas del tipo endo se ven afectadas tanto por la concentración y tipo de la fuente de carbono como por el pH del medio de cultivo. Al parecer, *A. flavipes* FP-500 produce varias isoformas de exopectinasas, que se expresan ante diferentes valores de pH.

REFERENCIAS

- Aguilar G & Huitrón C (1986) Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 541-545.
- Aguilar G & Huitrón C (1990) Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnol. Lett.* 12(9): 655-660.
- Akimitsu K, Isshiki A, Ohtani K, Yamamoto H, Eshel D & Prusky D (2004) Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65: 271-275.
- Annis S L & Goodwin P H (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes

Artículos

- produced by plant pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 103(1): 1-14.
- Bruno-Bárcena JM, Lucca ME, Siñeriz F & Ramón D (2002) pH regulation of enzyme production in *Aspergillus nidulans* growing in aerobic batch fermenter. *Biotechnol. Lett.* 24: 567-572.
- Cavalitto S F & Mignone CF (2007) Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Proc. Biochem.* 42: 175-179.
- de Vries, RP (2003) Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes, relevance for industrial production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 10-20.
- de Vries, R P & Visser, J (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(4): 497-552.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA & Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3): 350-356.
- Eshel D, Miyara I, Ailing T, Dinoor A & Prusky D (2002) pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in Persimmon fruit. *MPMI.* 15(8): 774-779.
- Favela-Torres E, Volke-Sepúlveda T & Viniegra-González G (2006) Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2): 221-227.
- Gummadi SN & Kumar S (2008) Batch and fed batch production of pectin lyase and pectate lyase by novel strain *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. *Biores. Technol.* 99: 874-881.
- Jacob N & Prema P (2006) Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 263-267.
- Jayani, R S, Saxena, S Y Gupta, R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Proc. Biochem.* 40: 2931-2944.
- Kashyap, D R, Vohra, P K, Chopra, S Y Tewari, R (2001). Applications of pectinases in the comercial sector: a review. *Biores. Technol.* 77: 215-227.
- Malvessi E & Moura da Silveira M (2004) Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47(5): 693-702.
- Martínez-Trujillo A, Aranda JS, Gómez-Sánchez C, Trejo-Aguilar B & Aguilar-Osorio G (2009) Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. *Braz. J. Microbiol.* 40: 40-47.
- Martínez-Trujillo A, Aranda JS & Aguilar-Osorio G (2008) Kinetic study on inducibility of polygalacturonases from *Aspergillus flavipes* FP-500. *Electronic J. Biotechnol.* 11(4): 1-8.

Artículos

- Miller G L (1959) Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Najafpour G D (2007) Biochemical Engineering and Biotechnology. Primera Edición. Editorial Elsevier, Holanda.
- Niture, S K (2008) Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biología*, 63(1): 1-19.
- Oncu S, Unluturk S, Tari C & Gogus N (2006) Various factors affecting the pellet morphology, broth reology and pectinase enzyme production in submerged fermentation of *Aspergillus sojae*. IUFoST.DOI: 10.1051/IUFoST:20060271.
- Papagianni M, Matteya M & Kristiansena B (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme Microb. Technol.* 25(8-9): 710-717.
- Parenticová, L (2000). Pectinases of *Aspergillus niger*: A Molecular And Biochemical Characterisation. Tesis de doctorado. Wageningen University. Holanda. ISBN 90-5808-203-2.
- Patil SR & Dayanand A (2006) Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Biores. Technol.* 97: 2054–2058.
- Pico-Marco E & Navarro JL (2008) A closed-loop exponential feeding law for multi-substrate fermentation processes. Proceedings of the 17th World Congress The International Federation of Automatic Control Seoul, Korea, July 6-11.
- Prusky D & Yakoby N (2003) Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol. Plant Pathol.* 4(6): 509–516.
- Ramirez-Reivich OT (2004) Ingeniería Bioquímica en “Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna”, Francisco G. Bolívar Zapata, Compilador y editor. Primera edición. Editorial de El Colegio Nacional, México, D.F.
- Runco R, Navarro AR & Maldonado MC (2001) Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus terreus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 487-491.
- Solís-Pereira S, Favela-Torres E, Viniestra-González G & Gutiérrez-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.
- Teixeira MFS, Lima Filho JL & Durán N (2001) Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian J. Microbiol.* 31: 286-290.
- Trejo-Aguilar B, Visser J & Aguilar-Osorio G (1996). Pectinase secretion by *Aspergillus* FP-180 and *Aspergillus niger* N402 growing under stress induced by the pH of culture medium. *Proc. Pectin and Pectinases Symposium*, p. 915-920.

Artículos

Wubben JP, Have AT, van Kan JAL & Visser, J (2000). Regulation of endopolygalacturonase gene expression

in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr. Gen.* 37: 152-157.