



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

Enzimas pécticas de *Aspergillus kawachii*: aislamiento,
purificación y caracterización de pectinesterasa

Bioq. Carolina Elena Vita

Director: Dr. Claudio E. Voget

Co-director: Dr. Roque A. Hours

Año 2013



Enzimas pécticas de *Aspergillus kawachii*: aislamiento,
purificación y caracterización de pectinesterasa

El presente trabajo de tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, con el financiamiento de la Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Tesista: Bioq. Carolina Elena Vita

Director: Dr. Claudio E. Voget

Co-director: Dr. Roque A. Hours

A Lucía, Julián y Horacio

A Adriana y al Nene

A mi abuelo Silvio

Agradecimientos

A mi director de Tesis, Dr. Claudio Voget, por aceptar dirigirme, por su estímulo durante mi trabajo

A mi Co-Director de Tesis, Dr. Roque Hours por haberme acercado a la ciencia, por su apoyo incondicional y confianza.

A Juan Carlos y a Tato, quienes estuvieron a mi lado desde mis comienzos hasta ahora.

A todos mis compañeros Fede, Cecilia, Betina, Gisel, Pamela, Andrea, Caty, Coca, Victor, Carlitos, Flavia, Gallego, Marilin, Laura, Julio, y en general a todo el personal del CINDEFI.

A Rubén y Ramón, por haber compartido muchas experiencias juntos.

A Aleca y a Osvaldo por su apoyo.

A mi amiga Cecilia que siempre pensó que iba a llegar este momento.

A Lorena, por su apoyo y aliento incondicional.

A Valeria, Federico y Carla por las horas de trabajo compartidas.

A Lala, por su confianza y estímulo.

A Laura, mi hermana de la vida, por su apoyo y amistad incondicional.

A mis padres que me apoyan y ayudan en todos mis emprendimientos.

A mis hermanos, Mariela y Pay, por ser parte de mi vida.

A Julián y a Lucía por compartir a su mamá.

A Horacio, mi compañero. Gracias por creer en mí, acompañarme, apoyarme, ayudarme en todo y en todo momento de mi vida. Por haber crecido personal y profesionalmente juntos.

“Me lo contaron y lo olvidé, lo vi y lo entendí, lo hice y lo aprendí”

Confucio

Divulgación de los resultados de la Tesis doctoral

Artículos publicados o en preparación:

Vita, C.E., Contreras Esquivel, J.C. and Voget, C.E. (2009). The pectolytic system of the industrial fungus *Aspergillus kawachii*. Food Science and Biotechnology 8, 1365-1370.

Vita, C.E., Contreras Esquivel, J.C., Voget, C.E. and Hours, R.A. Purification and characterization of pectinesterase from *Aspergillus kawachii*. Food Science and Biotechnology. En preparación.

Índice de contenidos

Capítulo 1.....	1
Introducción.....	1
1.1. La pared celular vegetal	1
1.2 Estructura de los principales componentes químicos de la pared celular	2
1.2.1 Celulosa.....	2
1.2.2 Hemicelulosa.....	3
1.2.3 Pectina	4
1.3 Modelo de inserción de polisacáridos en la pectina y la pared celular	10
1.4 Las pectinas en los frutos. Pectina comercial. Usos de la pectina.	11
1.5 Biodegradación de los polisacáridos que componen la pared celular. Pectinasas o enzimas pectolíticas.....	12
1.5.1 Enzimas que atacan el esqueleto principal de los polímeros pécticos	14
1.5.2 Enzimas accesorias.....	16
1.6 Regulación de la síntesis de pectinasas microbianas	18
1.7 Aplicaciones de las enzimas pectolíticas	20
1.8 La pectinesterasa	21
1.8.1 Presencia y ubicación	23
1.8.2 Polimorfismo.....	23
1.8.3 Propiedades fisico-químicas.....	24
1.8.4 Estructura	24
1.8.4.1 Estructura primaria.....	24
1.8.4.2 Estructura tridimensional	25
1.8.5 Actividad catalítica.....	27
1.8.5.1 Mecanismo de reacción.....	27
1.8.5.2 Influencia del pH y de los cationes	27
1.8.5.3 Modo de acción	28
1.9 <i>Aspergillus kawachii</i>	30
1.9.1 <i>Aspergillus kawachii</i> como productor de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular	32
1.10 Objetivos, justificación y plan de tesis.....	33
1.11 Bibliografía.....	34
Capítulo 2	49
Enzimas pécticas de <i>Aspergillus kawachii</i>	49
2.1 Resumen	49
2.2 Introducción	49
2.3 Materiales y métodos	51
2.3.1 Reactivos y soluciones	51
2.3.2 Microorganismo utilizado, condiciones de cultivo y procesamiento de las muestras	51
2.3.3 Actividades enzimáticas.....	52
2.3.4 Técnicas bioquímicas	54
2.4 Resultados y discusión	56
2.4.1 Crecimiento de <i>A. kawachii</i> en medios que contienen pectina	56
2.4.2 Screening de pectinasas.....	57
2.4.3 Caracterización parcial de las pectinasas	61
2.5 Conclusiones	67

2.6 Bibliografía.....	67
Capítulo 3	71
Cultivos de <i>Aspergillus kawachii</i> para la producción de Pectinesterasa	71
3.1 Resumen	71
3.2 Introducción	71
3.3 Materiales y Métodos	73
3.3.1 Reactivos y soluciones	73
3.3.2 Microorganismo e inóculo	74
3.3.3 Determinaciones analíticas.....	74
3.3.4 Cultivos en sustrato sólido	74
3.3.4.1 Materiales utilizados	74
3.3.4.2 Propiedades de hidratación de los materiales utilizados como sustratos sólidos	75
3.3.4.3 Cultivos con salvado de trigo	76
3.3.4.4 Cultivos con pomaza de limón	76
3.3.4.5 Cultivos con perlita	77
3.3.5 Cultivos en medio líquido	77
3.3.5.1 Efecto de la FCE	77
3.3.5.2 Efecto del pH inicial.....	78
3.3.5.3 Cinética de producción de PE en frascos	78
3.3.5.4 Cultivos en biorreactor	78
3.3.6 Determinación de actividades enzimáticas	79
3.3.7 Optimización estadística de la producción de PE mediante el diseño de Doehlert.....	79
3.4 Resultados y discusión	79
3.4.1 Fermentaciones en sustrato sólido (FSS)	79
3.4.1.1 Cultivos con salvado de trigo	83
3.4.1.2 Cultivos con pomaza de limón	84
3.4.1.3 Cultivos con perlita	85
3.4.2 Cultivos en frascos	86
3.4.2.1 Efecto de la FCE en la producción de PE	86
3.4.2.2 Efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de PE.....	90
3.4.2.3 Cultivos glucosa – pectina.....	91
3.4.3. Cinética de producción de PE en frascos y fermentador.....	92
3.4.4 Optimización de la producción de PE en medio con harina de soja y pectina.....	94
3.4.5 Comparación de la cinética de producción de PE en Erlenmeyers y fermentadores empleando el medio optimizado	100
3.5 Conclusiones	101
3.6 Bibliografía.....	101
Capítulo 4	106
Pectinesterasa de <i>Aspergillus kawachii</i>: purificación y caracterización	106
4.1 Resumen	106
4.2 Introducción	107
4.3 Materiales y Métodos	107
4.3.1 Reactivos y soluciones	107
4.3.2 Pectinesterasa comercial	108
4.3.3 Condiciones de cultivo	108
4.3.4 Purificación de la PE	109
4.3.5 Técnicas analíticas y bioquímicas	110

4.3.5.1 Técnicas de medida de actividad pectinesterasa	110
4.3.5.1.1 Técnica de verde de bromocresol.....	110
4.3.5.1.2 Técnica de alcohol oxidasa	110
4.3.5.2 Determinación de proteínas.....	111
4.3.5.3 Técnicas electroforéticas	111
4.3.5.3.1 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	111
4.3.5.3.2 Electroforesis nativa de proteínas	111
4.3.5.3.3 Isoelectroenfoque	111
4.3.5.4 Cromatoenfoque	112
4.3.5.5 Zimograma	112
4.3.5.6 Determinación de PM mediante cromatografía de exclusión molecular (CEM)	112
4.3.5.7 Determinación de glicosilación	113
4.3.6 Propiedades de la enzima	113
4.3.6.1 Estabilidad térmica	113
4.3.6.2 pH óptimo.....	113
4.3.6.3 Estabilidad al pH	113
4.3.6.4 Clarificación de jugo de limón	114
4.3.6.5 Efecto de diferentes cationes en la actividad PE.....	114
4.3.6.6 Determinación de parámetros cinéticos	114
4.3.7 Modo de acción	115
4.3.7.1 Desesterificación enzimática de la pectina cítrica.....	115
4.3.7.2 Determinación del grado de metoxilación de las pectinas	115
4.3.7.3 Análisis de las pectinas desesterificadas	115
4.3.7.4 Determinaciones analíticas.....	116
4.3.8 Análisis de huellas peptídicas	116
4.4 Resultados y Discusión	116
4.4.1 Características de las pectinas	116
4.4.2 Pectinesterasa comercial	117
4.4.3 Purificación de PE de <i>A. kawachii</i>	117
4.4.4 Determinación de las propiedades catalíticas de la PE de <i>A. kawachii</i>	125
4.4.4.1 Estabilidad térmica	125
4.4.4.2 pH óptimo.....	126
4.4.4.3 Estabilidad y reversión de la inactivación a pHs ácidos	126
4.4.4.4 Clarificación de jugo de limón	130
4.4.4.5 Efecto de cationes en la actividad	131
4.4.4.6 Determinación de parámetros cinéticos de PE.....	133
4.4.4.7 Modo de acción de PE.....	134
4.4.4.8 Análisis de huellas.....	138
4.5 Conclusiones	139
4.6 Bibliografía.....	140
Capítulo 5	159
Conclusiones generales	159
Anexo	161
Diseño experimental: Método de Doehlert	161
Bibliografía.....	165

Lista de abreviaturas

AG	Arabinogalactano
AGA	Ácido galacturónico
AGasa	Arabinogalactanasa
AIS	Alcohol insoluble solids
AO	Alcohol oxidasa
APD	Agar papa dextrosa
APG	Acido poligalacturónico
Ara	Arabinosa
ARAasa	Arabinasa
Araf	Arabinofurano
ARFasa	α -L-arabinofuranosidasa
a_w	Actividad acuosa
BACNa	Buffer acetato de sodio
BCP	Buffer citrato-fosfato de sodio
CAZy	CArbohydrate-Active EnZymes
CCF	Cromatografía en capa fina
CDTA	Ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacetio
CE	Cromatoenfoco
CEM	Cromatografía de exclusión molecular
CIA	Cromatografía de intercambio aniónico
CIC	Cromatografía de intercambio catiónico
CMC	Carboximetilcelulosa
CMCasa	Carboximetilcelulasa
CRA	Capacidad de retención de agua
CreA	Carbon catabolite repressor protein
FCE	Fuente de Carbono y Energía
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatorgraphy
FSS	Fermentación en sustrato sólido
Gal	Galactosa
GALasa	Galactanasa
Galp	Galactopiranososa
Glu	Glucosa
GM	Grado de metoxilación
GRAS	Generally regarded as safe
HG	Homogalacturonanos
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión

HS	Harina de soja
IEF	Isoelectroenfoque
Man	Manosa
mhdf	<i>m</i> -hidroxidifenilo
<i>onp</i>	ortonitrofenil
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosido
P Aa	Pectina desesterificada con PE de <i>A. aculeatus</i>
P Ak	Pectina desesterificada con PE de <i>A. kawachii</i>
P Na	Pectina desesterificada con PE de cáscara de naranja
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PE	Pectinmetilesterasa
Pec	Pectina
PeL	Pectinliasa
PGasa	Poligalacturonasa
PL	Pomaza de limón
<i>pnp</i>	Paranitrofenil
<i>pnp</i> -Ara	<i>p</i> -nitrofenil- α -L-arabinofuranosido
<i>pnp</i> -Fuc	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-fucopiranosido
<i>pnp</i> -Glu	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosido
<i>pnp</i> -Ram	<i>p</i> -nitrofenil- α -L-ramnopiranosido
Ram	Ramnosa
RG	Ramnogalacturonano
RGasa	Ramnogalacturonasa
RR	Rojo de rutenio
SDS	Dodecil sulfato de sodio
ST	Salvado de trigo
t_r	Tiempo de retención
VB	Verde de bromocresol
VR	Viscosidad relativa
XG	Xilogalacturonano
Xil	Xilosa
α -Ram	α -L-ramnosidasa
β -gal	β -D-galactosidasa

Capítulo 1

Introducción

1. Motivación

El hongo filamentoso *Aspergillus kawachii* es capaz de crecer sobre la superficie de la cáscara de limón resultando en su desintegración. Durante el desarrollo de las hifas se produce la degradación de las paredes celulares a distancias de 15-30 μm , lo cual indica la producción de enzimas extracelulares capaces de degradar los polímeros que la constituyen. Estas observaciones motivaron el desarrollo de las investigaciones reportadas en la presente Tesis Doctoral.

1.1. La pared celular vegetal

La pared celular vegetal es una matriz compleja que define las características individuales de las células dentro de la planta. La importancia de esta estructura se ha puesto de manifiesto en importantes hallazgos, i.e.: el 15 % de todos los genes de *Arabidopsis* están relacionados con la construcción de la pared celular (Carpita et al., 2001). Esta estructura además de definir la morfología de la planta es fundamental para la comunicación entre células y participa en la internalización de las señales químicas.

En términos generales, las funciones de la pared celular vegetal son las siguientes:

- Soporte mecánico y estructural.
- Control del tamaño de la célula.
- Resistencia a la turgencia interna.
- Control de la velocidad y dirección del crecimiento.
- Control de la difusión entre células.
- Almacenamiento de nutrientes (semillas).
- Protección contra patógenos y deshidratación.
- Fuente de moléculas biológicamente activas (mensajeros).
- Interacción célula-célula.

La pared celular de las células vegetales se presenta de dos formas: una pared primaria fina y otra secundaria, más gruesa (Albersheim, 1965). La pared primaria se encuentra en células jóvenes e indiferenciadas que están en crecimiento, posee una estructura conservada en una gran variedad de plantas superiores (Vidhyasekaran, 1997). Por el contrario, la pared

secundaria se encuentra en células diferenciadas que han dejado de crecer. La pared primaria es una estructura altamente organizada que puede contener diferentes carbohidratos (celulosa, hemicelulosa y polisacáridos pécticos) así como proteínas estructurales (ricas en hidroxiprolina, prolina y glicina), lignina y sustancias incrustadas como cutina, suberina y compuestos inorgánicos. En la pared secundaria, tanto su composición como su estructura varían considerablemente entre un tipo celular y otro, siendo sus componentes principales lignina, suberina y componentes inorgánicos (Talmadge et al., 1973; Vidhyasekaran, 1997).

En la Fig. 1.1 se muestra un esquema de pared celular primaria detallando sus componentes estructurales principales: celulosa, hemicelulosa y polisacáridos pécticos.

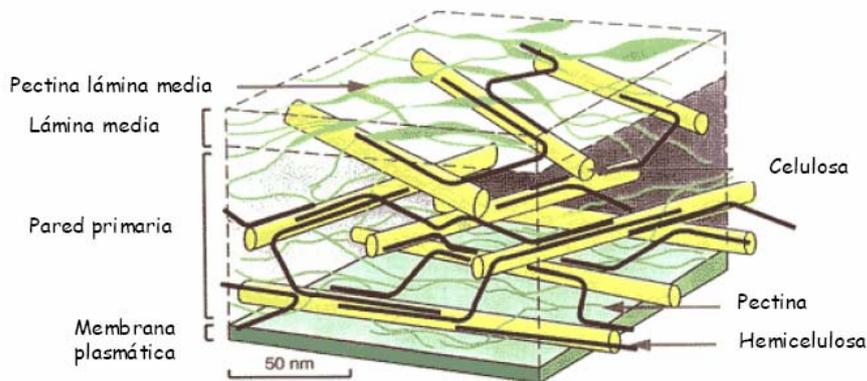


Figura 1.1 Estructura esquemática de la pared celular vegetal (http://ippa.info/what_is_pectin.htm).

1.2 Estructura de los principales componentes químicos de la pared celular

1.2.1 Celulosa

Las características principales de la celulosa son las siguientes:

- Es un homopolisacárido formado por unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4).
- Dependiendo de su origen, puede presentar estructura amorfa o cristalina.
- Es comparativamente más resistente a la hidrólisis que otros biopolímeros.
- Representa, en promedio, el 33 % de la biomasa vegetal, con valores del 90 % en la fibra de algodón y 50 % maderas duras.
- Forma fibrillas a través de puentes de H, de hasta 500.000 unidades.
- Confiere rigidez mecánica al tejido vegetal.

En la Fig. 1.2 se muestra la estructura base y las fibras de la celulosa.

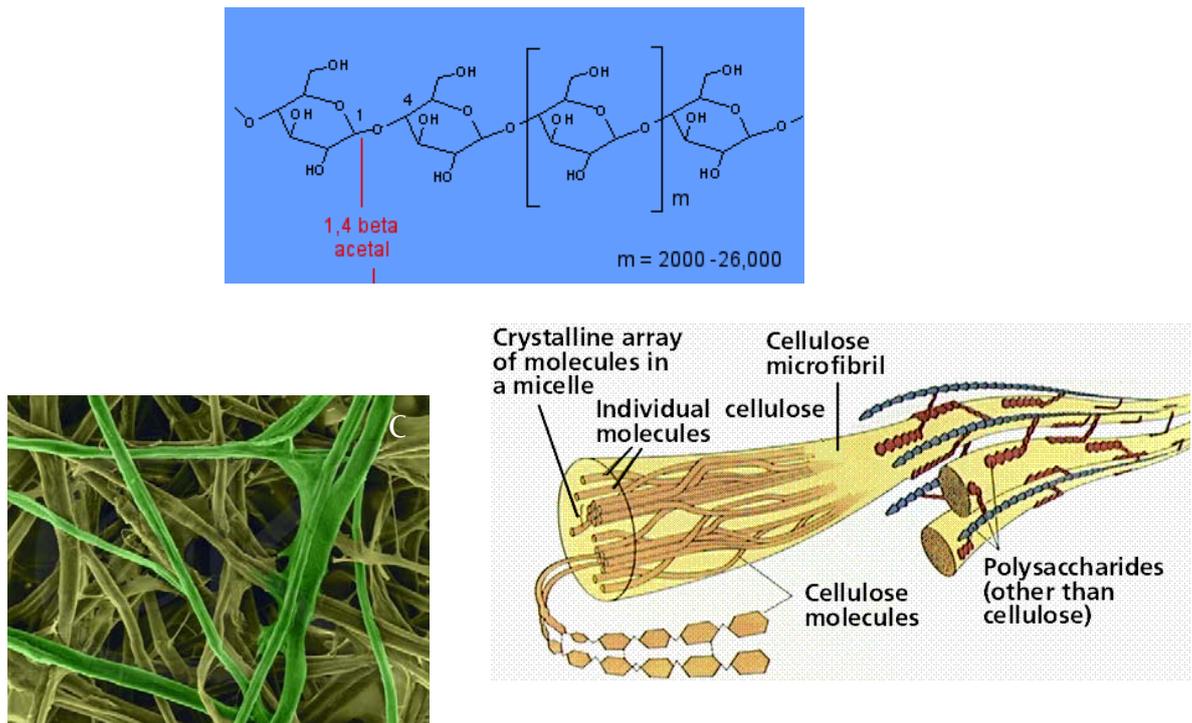


Figura 1.2 Estructura de la celulosa. A) Estructura base mostrando las unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4). B) Modelo del arreglo de las microfibrillas de celulosa (www.sinauer.com). C) Microfotografía de fibras de celulosa en papel (SEM \times 1080; www.DennisKunkel.com)

1.2.2 Hemicelulosa

Las características principales de la hemicelulosa son las siguientes:

- Es un heteropolisacárido formado por restos de varios tipos de monómeros: xilosa (Xil), manosa (Man), galactosa (Gal), ramnosa (Ram) y arabinosa (Ara).
- A diferencia de la celulosa, su estructura comprende cadenas cortas (500 a 3000 residuos) y es ramificada. Forma microfibrillas pero la estructura es básicamente amorfa y es relativamente accesible a la hidrólisis.
- Incluye a xilanos, glucuronoxilanos, arabinoxilanos, glucomananos y xiloglucanos.
- Muchos monómeros se encuentran acetilados.
- Sus polisacáridos suelen denominarse “de entrecruzamiento”.
- Desde el punto de vista mecánico, refuerza las fibras de celulosa impidiendo su desplazamiento en sentido axial.

En la Fig. 1.3 se muestra un ejemplo de estructura de hemicelulosa, polisacárido de entrecruzamiento, en este caso un fucogalactoxiloglucano, parcialmente acetilado en uno de sus residuos (galactosil-)

Es muy difícil definir específicamente la pectina ya que su composición y estructura dependen, entre otros factores, del método de extracción y del origen del tejido vegetal. De hecho es considerada uno de los polisacáridos más complejos ya que está compuesto por 17 monosacáridos diferentes con más de 20 tipos de enlaces (Mohnen, 1999; O'Neill et al., 2004; Ridley et al., 2001a). Durante estos años se han descrito numerosos elementos estructurales de la pectina. Sin embargo, se cree que todas las pectinas contienen, fundamentalmente, una repetición de los mismos elementos, aunque la cantidad y estructura química fina de estos elementos varíe. En la Fig. 1.4 se puede observar una representación esquemática de los elementos estructurales de la pectina que se describirán a continuación.

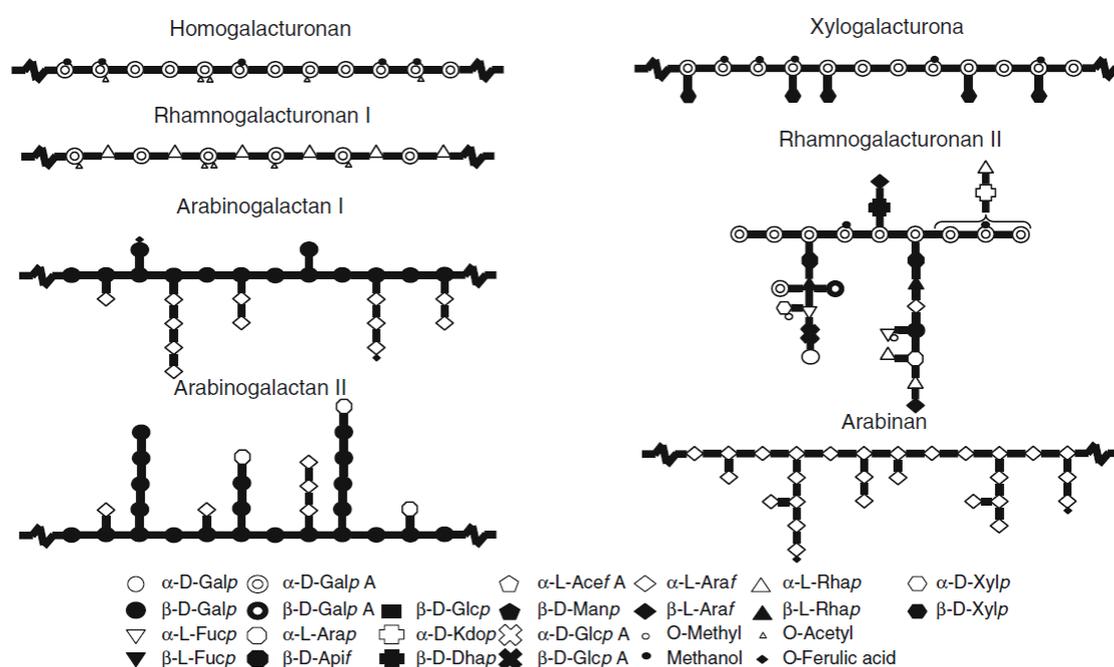


Figura 1.4 Representación esquemática de diferentes elementos estructurales de la pectina (Hilz, 2007).

La caracterización química y estructural de las pectinas se lleva a cabo con métodos químicos y enzimáticos para obtener distintas fracciones, analizar los productos de degradación y, finalmente, mediante el análisis orgánico identificar el tipo de azúcar presente, el enlace glicosídico que une los distintos residuos y la presencia de sustituciones tipo éster. En general el material de partida es el tejido vegetal fresco o deshidratado a partir del cual se procede primero a obtener la fracción conocida como AIS (alcohol insoluble solids) cuyos protocolos varían según el autor y el fruto o tejido empleado. Luego, mediante agua y distintas soluciones extractivas conteniendo agentes quelantes como CDTA (ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacetio) u oxalato, HCl, NaOH, etc., se obtienen en forma

sucesiva distintas fracciones solubles de la pectina que son luego caracterizadas en cuanto a su composición química y organización estructural. De este modo se han descrito al menos cinco polisacáridos pécticos, pero se pueden agrupar en dos tipos mayores de acuerdo a la estructura del esqueleto principal: galacturonanos y ramnogalacturonanos. Dentro de los galacturonanos se encuentran los homogalacturonanos (HG, Fig. 1.5) y los xilogalacturonanos. Los ramnogalacturonanos se clasifican en tipo I (RGI, Fig. 1.6) y en tipo II (RGII, Fig. 1.7). En todos ellos, el esqueleto principal lo constituye una cadena de unidades de ácido galacturónico (AGA) conectados por enlaces α -(1→4).

Homogalacturonano

Las características principales del HG son las siguientes:

- Está formado por un mínimo de 70 residuos, algunos de los cuales están esterificados parcialmente con metanol (Thibault et al., 1993).
- La distribución de los metoxilos puede ser aleatoria o por bloques. Se define el grado de metoxilación (GM) como los moles de metanol presentes cada 100 moles de ácido galacturónico.
- El GM es variable y depende, entre otros factores, del estado de madurez del fruto.
- Cuando se acumulan varios residuos de AGA sin esterificar se forman, en presencia de Ca^{+2} , estructuras tipo “cajas de huevo” (Fig. 1.5). Son zonas de mayor rigidez estructural que conducen a la gelificación (Morris et al., 1982).
- El GM divide a las pectinas comerciales en pectinas de alto metoxilo (> 50 %) y de bajo metoxilo (< 50 %) cuyas propiedades funcionales son diferentes (Nomachi et al., 2002). Además de la esterificación con metanol, algunos grupos hidroxilos en C-2 y C-3 se encuentran acetilados. El grado de acetilación es muy bajo en pectinas extraídas de manzanas o cítricos (3-4 %) pero alto en la de remolacha azucarera o papa (14-20 %).
- Tanto el GM como la distribución de los grupos éster a lo largo del HG determinan las propiedades físico-químicas del polímero y su funcionalidad. Al no estar ramificado, se lo conoce como la región lisa (smooth region) de la pectina. En algunos frutos el HG puede representar hasta el 60 % de la totalidad de las sustancias pécticas, en otros como en la soja prácticamente no está presente.

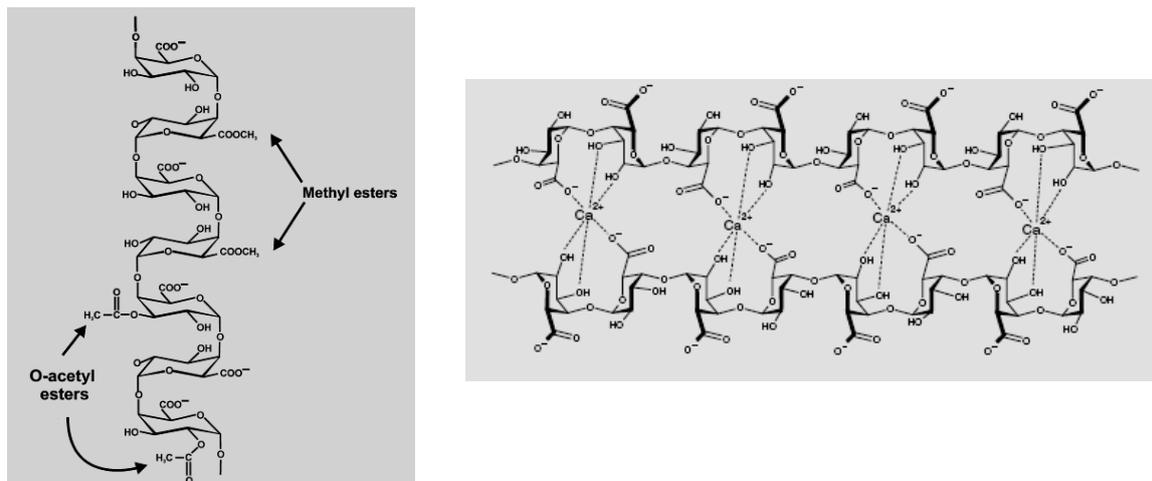


Figura 1.5 Estructura del homogalacturonano y formación de estructuras tipo “cajas de huevo” en presencia de Ca⁺². (Ridley et al., 2001b); (Morris et al., 1982)

Xilogalacturonano

Se denomina xilogalacturonano (XG) a la cadena de HG sustituida por una sola unidad de β -D-xilopiranososa por medio de enlaces β -(1 \rightarrow 3) (Le Goff et al., 2001; Schols et al., 1995; Albersheim et al., 1996). El grado de xilosidación puede variar entre el 25 % (sandía) y el 75 % (manzana) (Le Goff et al., 2001; Schols et al., 1995; Yu and Mort, 1996). Parte de los residuos de AGA en el XG se encuentran metilesterificados y los ésteres metílicos se encuentran distribuidos homogéneamente entre los residuos de AGA sustituidos y no sustituidos (Schols et al., 1995; Yu and Mort, 1996). El XG ha sido identificado principalmente en los tejidos reproductivos como frutas y semillas (Albersheim et al., 1996; Schols et al., 1995). Además, Zandleven et al. (2007) demostraron recientemente su presencia en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana* (Zandleven et al., 2007). La soja es particularmente rica en XG.

Ramnogalacturonano I

En la Fig. 1.6 se puede observar que el RGI está formado por repeticiones del disacárido (1 \rightarrow 2)- α -L-ramnosa-(1 \rightarrow 4)- α -D-galacturónico que se une glicosídicamente a los residuos de HG (Albersheim et al., 1996; McNeil et al., 1980). Según la naturaleza de la pectina podemos encontrar RGI compuesto de 20 hasta 300 residuos. Las características principales del RGI son las siguientes:

- Los residuos ramnósidos de RGI pueden estar sustituidos en el O-4 con cadenas laterales de azúcares neutros (Colquhoun et al., 1990; Lau et al., 1987; McNeil et al., 1980).

- En las cadenas laterales se han identificado tanto una sola unidad [β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)], como sustituciones de polímeros, como galactanos, arabinanos (50 residuos o más) y arabinogalactanos I (Lau et al., 1987; Lerouge et al., 1993).
- La proporción de residuos de Ram ramificados varía entre 20 a 80 % dependiendo de la fuente del polisacárido (Albersheim et al., 1996).
- Los residuos de AGA de RGI en general no se encuentren esterificados (Kravtchenko et al., 1992).
- Los residuos de AGA del RGI pueden encontrarse O-acetilados en O-2 u O-3 (Carpita and Gilbeaut, 1993; Komalavilas and Mort, 1989; Schols et al., 1990; Schols and Voragen, 1994).

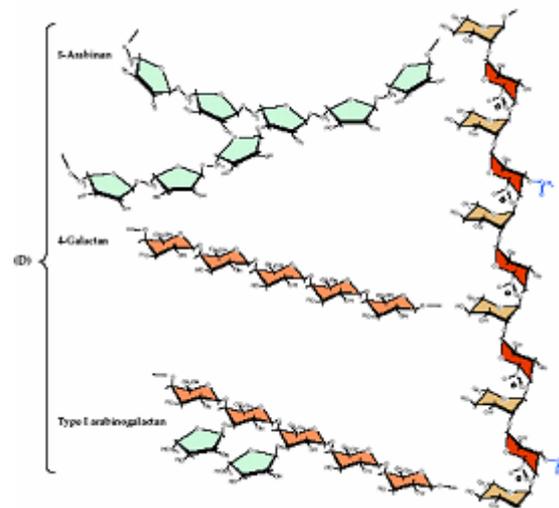


Figura 1.6 Estructura del RGI. Ara (), Gal () y Ram () (Carpita and McCann, 2000).

Ramnoglucuronano II

- Es de reciente descripción (1978).
- Es de bajo PM (5 a 10 kDa).
- Se encuentra en la mayoría de las plantas.
- Está compuesto por un esqueleto de 9 unidades de AGA de los cuales algunos se encuentran metilesterificados (Ridley et al., 2001a; O'Neill et al., 2001; Ishii and Matsunaga, 2001) y 4 ramificaciones laterales (cadenas A, B, C y D) que contienen 11 tipos de azúcares distintos, algunos raros, que se unen covalentemente a los residuos del HG (Ridley et al., 2001a; Willats et al., 2001a).

1994). La cadena de AGI puede finalizar con un residuo α -L-Araf-(1→4) en el extremo no reductor (Huisman et al., 2001).

Arabinogalactano II

- Está compuesto por una cadena de 1,3 β -D-Galp que contiene cadenas laterales cortas de α -L-Araf-(1→6)-[β -D-Galp-(1→6)] $_n$ ($n = 1, 2$ ó 3) (Mohnen, 1999; Ridley et al., 2001a; Carpita and Gilbeaut, 1993). Los residuos galactosilos pueden encontrarse sustituidos por residuos α -L-Araf-(1→3).
- El AGII se encuentra asociado a proteínas (3–8 %), también denominado AG-proteínas. La parte proteica es rica en in prolina/hidroxiprolina, alanina, serina y treonina (Gaspar et al., 2001).

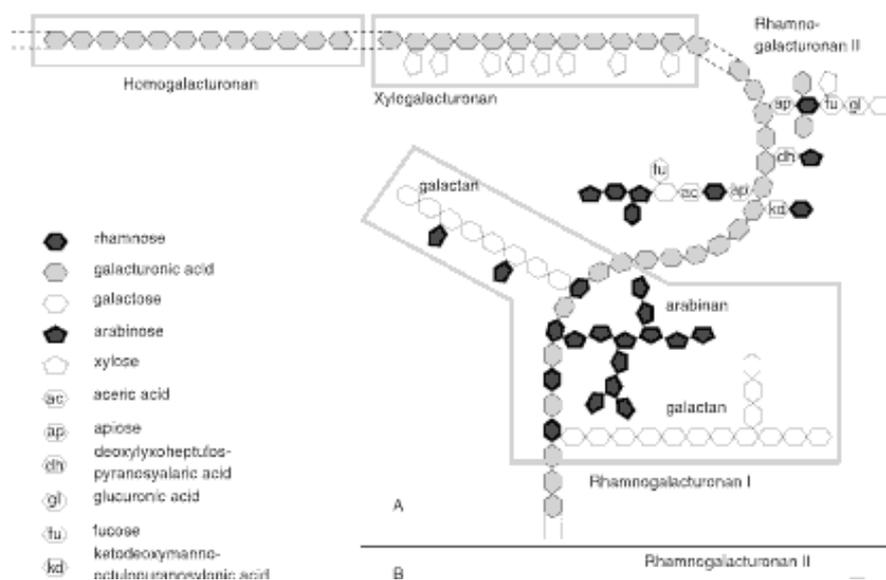


Figura 1.8. Modelo de pectina según Pilnik (Voragen et al., 2009).

1.3 Modelo de inserción de polisacáridos en la pectina y la pared celular

Se ha tratado de establecer la conformación de los polímeros dentro de la pectina y cómo éstos se ensamblan en la pared celular. La síntesis de los polisacáridos pécticos ocurre principalmente en el aparato de Golgi, en el caso del HG y su esterificación están involucradas las enzimas pectin-metil-transferasa y HG-galacturonosiltransferasa, que utilizan como precursores la S-adenosilmetionina y UDP-galacturónico, los cuales son transportados del citoplasma al Golgi. El producto resultante es un polímero de AGA con alto grado de esterificación (~ 80 %) que es exportado a la pared celular. No obstante, en la pared el HG se localiza en diferentes regiones en las cuales el grado de esterificación es variable. La

desesterificación es llevada a cabo por la pectin metilesterasa asociada a la pared celular. El control del grado de esterificación es crítico para varias funciones fisiológicas de la pectina. En la Fig. 1.8 se presenta un modelo clásico de pectina.

1.4 Las pectinas en los frutos. Pectina comercial. Usos de la pectina.

El contenido en pectina de distintos frutos se indica en la Tabla 1. La interpretación de estos valores tiene cierta complejidad, ya que como se mencionara anteriormente, el término pectina está asociado a diversos componentes estructurales cuya presencia y composición dependen del método de extracción.

Tabla 1. Contenido de pectina (% en base a peso fresco).

Fruto	Pulpa	Bagazo	Corteza
Mango africano	0,72		
Manzana	0,5-1,6	1,5-2,5	
Avocado	0,73		
Banana	0,7-1,2		
Anacardo		1,28	
Cerezas	0,24-0,54		
Guayaba	0,26-1,2		
Limón	2,5-4,0		5,0
Litchi	0,42		
Mango	0,66-1,5		
Naranja	1,35		3,5-5,5
Papaya			0,66-1,0
Granada	0,5		2,1-3,0
Durazno	0,1-0,9		
Ananá	0,04-0,13		
Frutilla	0,14- 0,44		
Tomate	0,2-0,6		

En la Tabla 2 se indican la composición de las diferentes pectinas expresadas en función de los azúcares y elementos estructurales que la contienen.

Industrialmente la pectina se obtiene de residuos sólidos o bagazos (pomazas) de la industria juguera, en particular de cítricos (limón o naranja) y manzana, que contienen altos niveles de pectina (Tabla 2). Se han descrito varios procesos de obtención de pectina, pero el

más difundido consiste básicamente en una extracción con ácido en caliente. Luego el extracto se concentra, precipita con isopropanol, se seca y el sólido resultante se tamiza para estandarizar el tamaño de partícula. Estas pectinas contienen predominantemente HG y algunas fracciones asociadas a las regiones ramificadas. Las pectinas pueden ser luego modificadas en relación al grado de metilación y/o sustituidas en sus grupos funcionales como por ejemplo ser amidadas con amoníaco. Entre las propiedades más importantes de las pectinas tenemos: solubilidad, peso molecular, viscosidad, capacidad de gelificación, grado de metilación, etc. Las pectinas se emplean como agentes emulsificantes, gelificantes, estabilizantes, etc., en diferentes industrias alimenticias como son la elaboración de mermeladas, confituras, jalea, rellenos de frutas en productos horneados (la pectina de alto metoxilo impide que la fruta se desmenuce con la temperatura), dulces y golosinas, bebidas refrescantes, productos lácteos, y reemplazante de grasas (al dar una textura similar como en los patés). Para elaborar mermelada bajas en calorías se utilizan pectinas de bajo metoxilo a las que añadimos sales cálcicas.

Tabla 2. Composición de la pared celular de frutas (expresada en g/kg de material fresco).

Fruta	Componente						Total
	Residuo insoluble en etanol (%)	Pectina	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Proteína	
Manzana	20	272	169	349	2	76	868
Pera	15	281	148	267	69	82	847
Mango	25	408	91	236	27	127	889
Ananá	13	163	267	210	85	94	819
Frutilla	12	411	66	232	11	255	975
Frambuesa	20	168	89	177	73	277	784
Cereza	13	396	49	130	169	244	988
Papaya	26	364	165	124	1	127	784

1.5 Biodegradación de los polisacáridos que componen la pared celular. Pectinasas o enzimas pectolíticas

La pared celular vegetal es degradada por un variado número de enzimas que reflejan la complejidad química de dicha estructura. Son producidas por diversos organismos, tanto procariotes como eucariotes y algunas de estas enzimas han encontrado diversas aplicaciones

biotecnológicas. La mayoría de las pectinasas comerciales son producidas por hongos filamentosos del género *Aspergillus* (Voragen and Pilnik W., 1989).

Las enzimas son básicamente glicosidasas que cortan los enlaces mediante hidrólisis o β -eliminación (las glicosidasas se clasifican en casi 100 familias basadas en la similitud de sus secuencias (web: CAZy (CARbohydrate-Active EnZymes))).

La configuración del C anomérico es importante en la selectividad y modo de acción de estas enzimas. De acuerdo al mecanismo involucrado pueden retener o invertir su configuración.

Las revisiones bibliográficas sobre enzimas pécticas solamente describían las enzimas que actuaban sobre el HG (Rombouts and Pilnik, 1980; Fogarty and Kelly, 1983), pero recientemente se han descubierto varias enzimas que actúan sobre el RG (Mutter, 1997; Schols, 1995; Vlugt-Bergmans et al., 2000). Las enzimas que actúan sobre el HG y el RG pueden ser divididas en depolimerizantes o desesterificantes.

Las enzimas depolimerizantes se clasifican de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) tipo de ruptura de los enlaces glicosídicos: hidrolítico o transeliminativo.
- b) mecanismo de la reacción: tipo exo o endo.
- c) preferencia de actividad respecto al GM (alto o bajo).

Las enzimas desesterificantes se clasifican de acuerdo al tipo de grupo éster que hidrolizan, ya sea metil-, acetil- o feruoil-éster.

Considerando lo anterior, las enzimas pécticas pueden clasificarse en:

- i) Enzimas que atacan el esqueleto principal de los polímeros pécticos.
- ii) Enzimas accesorias.

La importancia de las enzimas pécticas en la patogénesis y su papel en los procesos de colonización de la planta ha llevado al desarrollo de numerosos estudios. Se ha observado en cultivos *in vitro* con restos de paredes vegetales que las primeras enzimas degradadoras de pared celular producidas por los hongos son las enzimas pécticas, seguidas de las hemicelulasas y celulasas (De Lorenzo et al., 1997). La acción de estas enzimas parece ser un requisito indispensable para que actúen las demás enzimas degradadoras de pared celular. La aparición secuencial de las enzimas que degradan la pared celular, podría tener su explicación en el hecho de que sólo después de que hayan actuado las enzimas pécticas, la red de celulosa antes rodeada por la pectina pasaría a ser accesible y los inductores de celulasas y hemicelulasas serían liberados (De Lorenzo et al., 1997). Por ello, la mayoría de los estudios sobre enzimas degradadoras de pared celular se han centrado en las enzimas pécticas. En la

Fig. 1.9 se muestra un esquema del sitio de acción de las principales enzimas que degradan pectina.

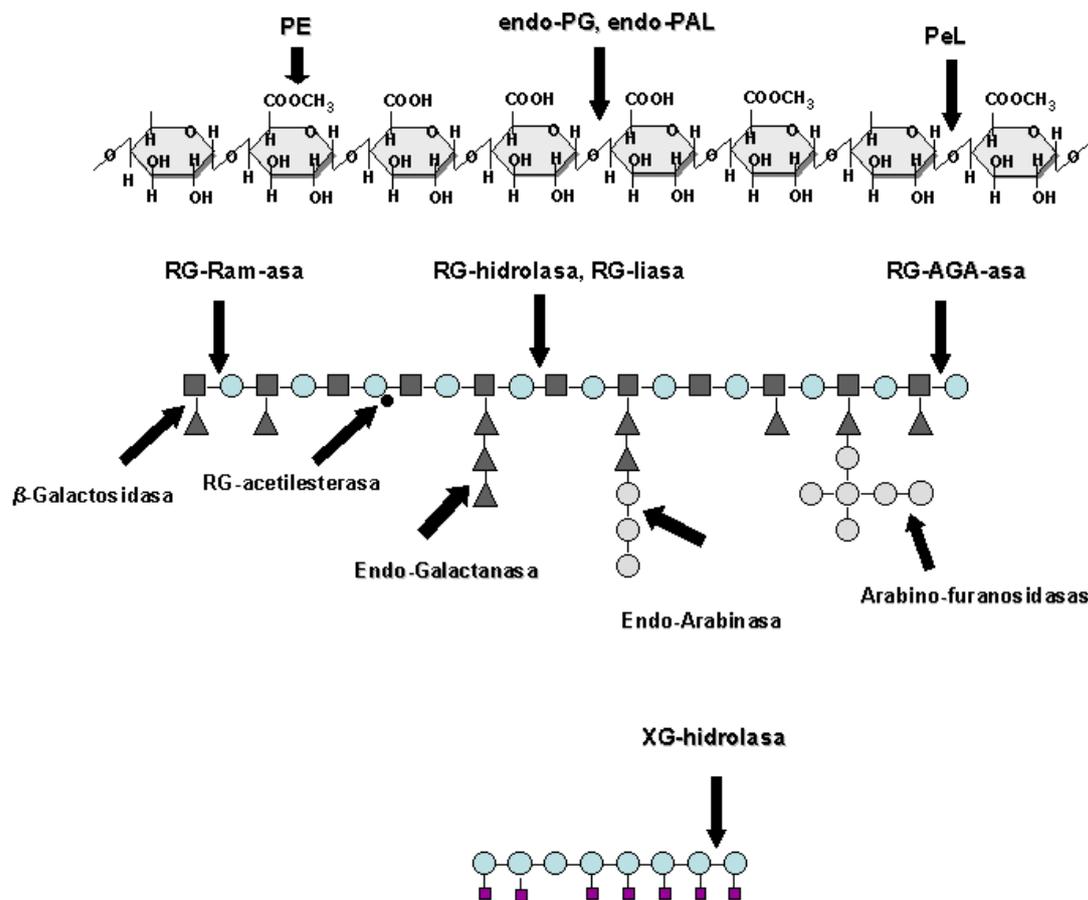


Figura 1.9 Degradación de fragmentos de sustancias pécticas por enzimas pectolíticas específicas (Voragen et al., 2001).

La pectinólisis es un fenómeno importante para los microorganismos patógenos. Pero la degradación de las sustancias pécticas también está asociada a otros procesos biológicos propios de la planta como son el crecimiento, la maduración de los frutos y la abscisión de la hojas (Rombouts and Pilnik, 1980).

1.5.1 Enzimas que atacan el esqueleto principal de los polímeros pécticos

Enzimas que actúan sobre el HG:

Poligalacturonasas (PGasas; EC 3.2.1.15): actúan sobre el HG hidrolizando las uniones glicosídicas entre residuos no esterificados. Se pueden dividir en tres grupos de acuerdo a su acción sobre el sustrato ácido poligalacturónico (APG): endo-PGAsas que atacan el sustrato en forma aleatoria generando mezclas de oligómeros, tri-, di-galacturonatos y AGA; las exo-PGAsas tipo I (galacturonano α -(1 \rightarrow 4)-galacturonosidasa) que liberan AGA del

extremo no reductor y las exo-PGasas tipo II (exo-poli- α -galacturonosidasa) que liberan digalacturonato del extremo no reductor. Las endo-PGasas y exo-PGasas tipo I fueron identificadas en varios hongos filamentosos y han sido estudiadas extensamente (Parenicová et al., 1988).

Las PGasas también se clasifican dentro de la familia 28 de hidrolasas glicosídicas degradadoras de pectina. Existen más de 115 secuencias de PGasas dentro de la base de datos de GenBank (Benson et al., 2002) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La mayor parte de ellas pertenecen a hongos, bacterias y plantas, aunque también han sido descritas en insectos (GenBank Y17906) e incluso en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (GenBank NP508878). La mayoría de las PGasas descritas en hongos son del tipo endo, habiendo sido caracterizados únicamente 5 genes codificadores del tipo exo en hongos filamentosos: en *Fusarium oxysporum* (García Maceira et al., 1997), en *Aspergillus tubingensis* (Kester et al., 1996), en *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig et al., 1998), en *Aspergillus nidulans* (GenBank AY237304) y en *Botryotinia fuckeliana* (GenBank AF145229). A su vez, se ha descrito la presencia de exo-PGasas en otras especies de hongos como *Penicillium frequentans* (Chellegatti et al., 2002), *Botrytis cinerea* (Rha et al., 2001) y *A. niger* (Sakamoto et al., 2002).

Polimetilgalacturonasas: esta enzima degradaría el HG altamente metoxilado, aunque su existencia es fuente permanente de controversia. Algunos reportes sobre la presencia de dicha actividad enzimática se atribuyen en realidad a la actividad de la PGasas contaminada con pectinmetilesterasa (Rombouts and Pilnik, 1980).

Pectinliasas y *pectatoliasas* (EC 4.2.2.2 y EC 4.2.2.10): estas enzimas degradan el HG mediante un mecanismo de transeliminación, introduciendo un doble enlace entre el C-4 y el C-5 del extremo no reductor formado en la reacción (Fig. 1.10). Las HG liasas se dividen en aquellas que degradan pectina con bajo grado de metoxilación (pectatoliasas) y las que hidrolizan pectina altamente metoxilada (pectinliasas, PeL), ambas del tipo endo. No se han encontrado liasas en plantas y la fuente más común de estas enzimas son las bacterias y hongos filamentosos, en particular los fitopatógenos. Las pectatoliasas requieren Ca^{+2} para su actividad, pero no así la PeL. Otras liasas descritas son la exo-pectatoliasa y las oligogalacturonato liasas, las cuales a diferencia de las exo-PGasas y las oligogalacturonato hidrolasas, atacan el sustrato desde el extremo reductor (Wong, 1995).

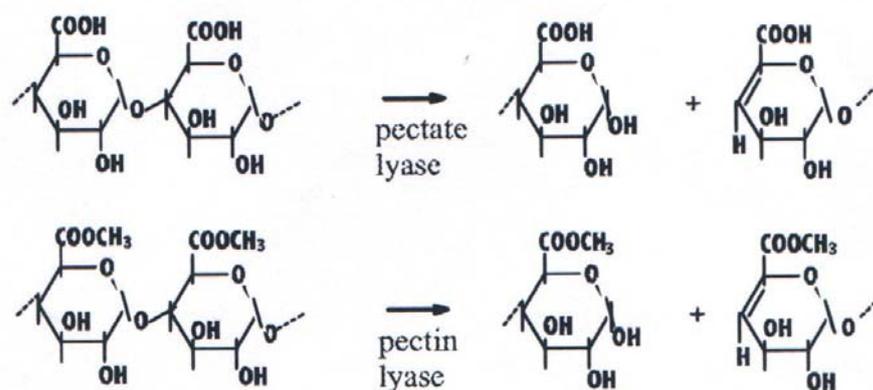


Figura 1.10 Modelo de reacción de la pectatoliasa y de la pectinliasas (Parenicová, 2000).

Enzimas que actúan sobre el RG

La primera descripción de una enzima capaz de degradar la cadena principal del RGI tuvo lugar en 1990 y se la denominó ramnogalacturonasa (RGasa, EC 3.2.1.-). El nombre actual es α -D-galactopiranosilurónico-(1,2)- α -L-ramnopiranosil hidrolasa (RG-hidrolasa). La enzima hidroliza la unión AGA-Ram en el esqueleto principal del RG. Más recientemente se han descrito otras enzimas que degradan RG: RG-liasa, que corta la unión Ram-AGA del esqueleto principal, y dos enzimas que actúan en forma exo: RG-ramnohidrolasa, que remueve una Ram terminal del extremo no reductor del RG, y RG-galacturonanhidrolasa, que remueve AGA terminal del extremo no reductor de RG (Voragen et al., 2001).

1.5.2 Enzimas accesorias

Se han denominado enzimas accesorias a las pectinasas que degradan las cadenas laterales de los polímeros pécticos y a las que remueven sustituyentes de la cadena principal. Algunas de estas enzimas actuarían también sobre otros polisacáridos constituyentes de la pared celular, en particular la hemicelulosa, dependiendo del enlace específico que la enzima reconoce. La mayor parte de este tipo de enzimas accesorias se han estudiado en bacterias y hongos filamentosos, particularmente en el género *Aspergillus* (de Vries, 1999).

Entre las enzimas accesorias se encuentran:

α -L-Arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55): son enzimas inespecíficas que remueven residuos Ara unidos por enlaces α -1,2-, α -1,3- y α -1,5- de diversos sustratos, entre ellos los arabinanos laterales de las pectinas.

Arabinoxilanhidrolasas (EC 3.2.1.55): son enzimas involucradas en la degradación de la hemicelulosa, muy específicas de residuos Ara unidos a xilosa.

Endo-arabinasas (EC 3.2.1.99): hidrolizan en forma aleatoria las uniones α -1,5 de los arabinanos, potenciando la acción de las arabinofuranosidasas.

α - y β -galactosidasas (EC 3.2.1.22 y EC 3.2.1.23): remueven residuos Gal de los galactanos laterales de las pectinas.

Endo- y exo-galactanasas (EC 3.2.1.164 y EC 3.2.1.145): junto a las β -galactosidasas son necesarias para la degradación completa de las cadenas laterales de galactano y arabinogalactano presente en las pectinas. Si bien los enlaces presentes en estas estructuras son del tipo β (1,3; 1,4 y 1,5), la mayoría de las endo-galactanasas estudiadas muestran preferencia por las uniones β -1,4. La única exo-galactanasa descrita libera Gal de galacto-oligosacáridos y posee actividad transferasa.

Feruloil- y *p*-coumaril-esterasas (EC 3.1.1.73): estas enzimas remueven los residuos feruloil- y coumaroil- que se encuentran esterificando al O-5 en xilanos y al O-3 en Ara u O-6 en Gal de las pectinas. Debido a la propiedad de estos residuos de producir entrecruzamiento entre la pectina y xilano con los otros polisacáridos de la pared como lignina, la acción de estas enzimas es importante para la integridad de la pared. Están muy difundidas en bacterias y hongos filamentosos.

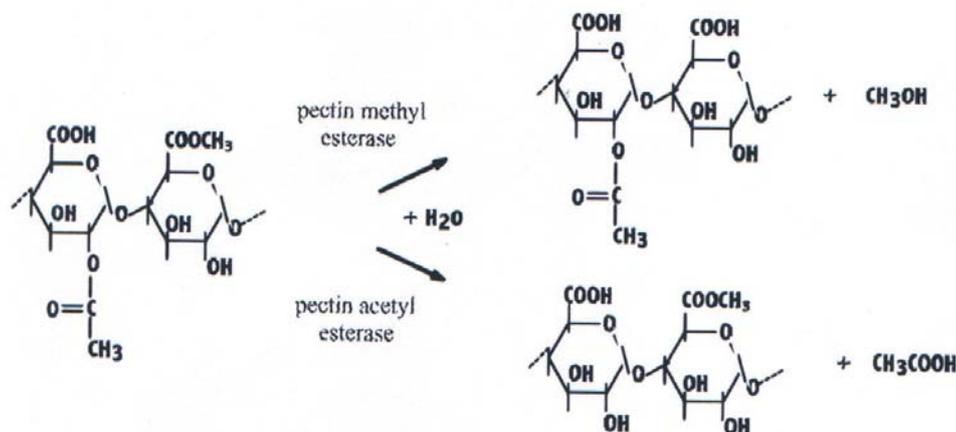


Figura 1.11 Acción de la metilesterasa y la acetilesterasa sobre pectina.(Parenicová, 2000)

Pectinacetil- y pectinmetil-esterasas (EC 3.1.1.6 y EC 3.1.1.11): remueven grupos acetilos y metilos, resp., del HG (Fig. 1.11). Han sido encontradas no sólo en numerosos hongos filamentosos, levaduras y bacterias sino también en plantas superiores. También se ha descrito una ramnogalacturonano acetil esterasa que actúan sobre el RG y es esencial para la acción de la RG-hidrolasa. Otra esterasa relevante es la acetil-xilano esterasa, que remueve los

grupos acetilo que esterifican el O-3 de la cadena principal del xilano y facilita la degradación de este polímero por las endo-xilanasas.

1.6 Regulación de la síntesis de pectinasas microbianas

Debido al tamaño y a la alta complejidad de los polisacáridos, particularmente de aquellos componentes de la pared celular, es clara la dificultad de los microorganismos para penetrar a las células vegetales. Se ha reportado que los oligosacáridos liberados de estos polímeros y/o sus derivados podrían ser los encargados de desencadenar la inducción de la expresión de las enzimas que los degradan, ya que con frecuencia el compuesto inductor de una enzima es el producto o un derivado del producto de esa reacción enzimática (de Vries, 2003).

Las PGasas pueden tener diferentes funciones según el organismo productor. En el caso de los hongos saprófitos como *A. niger*, las PGasas intervienen en los mecanismos vinculados al aporte de nutrientes carbonados desde el medio ambiente. Por el contrario, en los hongos fitopatógenos las PGasas están involucradas en la degradación de primaria de los tejidos vegetales, facilitando la ruptura de las paredes celulares para que el microorganismo entre a la célula, libere nutrientes asimilables desde su interior y, finalmente, se extienda por los tejidos de la planta (Parenicová, 2000).

Todavía no es conocida la molécula señal específica que dispara la síntesis de pectinasas. Sin embargo, la idea que es generalmente aceptada es que la célula fúngica produce un bajo nivel de enzimas pectinolíticas constitutivamente, las cuales liberan mono u oligosacáridos de la estructura vegetal. Estas moléculas pequeñas son transportadas al microorganismo comenzando una expresión masiva de las pectinasas (Mach and Zeilinger, 2003). En el caso particular de los hongos saprófitos, se sabe que producen en forma constitutiva varias isoformas de PGasas como es el caso de *A. kawachii* demostrado por Contreras Esquivel (Contreras Esquivel, 2003c). La acción de estas PGasas constitutivas sobre sustratos pécticos redundan en la liberación de sustancias inductoras (como el AGA). Estos inductores activan una serie de familias de genes inducibles que codifican pectinasas, al mismo tiempo estos genes pueden ser afectados por represión catabólica por carbono (Wubben et al., 2000).

Los mecanismos de regulación de la expresión de las pectinasas aún no están establecidos debido a la complejidad y diversidad del sustrato; sin embargo, la síntesis del

sistema pectolítico estaría controlada a nivel transcripcional por al menos 3 mecanismos diferentes:

- Inducción específica por fuente de carbono (pectina o AGA).
- Represión catabólica (mediada por el factor transcripcional CreA).
- Regulación por pH ambiental (controlada por el factor transcripcional PacC).

Inducción por fuente de carbono

Se ha encontrado que la pectina, el APG y el AGA inducen la expresión de los genes codificantes de poligalacturonas, pectin liasas y pectin esterasas. La inducción del sistema pectinolítico se ha demostrado en *A. niger*, en el cual el AGA es el principal inductor de los genes que codifican las enzimas pectolíticas. Se observó que los genes individuales de cada pectinasa se expresan a distintos tiempos y en presencia de diferentes fuentes de carbono, entre ellas el AGA o bien un metabolito derivado de él (de Vries et al., 2002).

Represión catabólica

Generalmente los represores del sistema pectinolítico son fuentes de carbono fácil y rápidamente asimilables como glucosa, fructosa y sacarosa. Su efecto es llevado a cabo a través de la proteína CreA, la más importante proteína represora de la expresión de genes codificantes de pectinasas (Parenicová, 2000; de Vries, 2003; Akimitsu et al., 2004).

Regulación por pH

El pH del medio de cultivo puede variar a medida que se producen y liberan metabolitos con propiedades ácido-base por parte del microorganismo en desarrollo. El pH afecta tanto el crecimiento como la formación de producto porque puede influenciar la ruptura de los sustratos como así también el transporte a través de la pared celular de sustratos y productos (Martinez Trujillo, 2009). Por ejemplo, los genes de *A. nidulans* están regulados por el pH del medio, las PGasas se secretan a pH ácidos, mientras que pectato liasa lo hace cuando aumenta el pH (Eshel et al., 2002). Se ha reportado que *A. foetidus* crecido en cultivos sólidos sobre afrecho de trigo embebido con diferentes concentraciones de HCl produce mayores actividades de pectinesterasa (PE) a menores concentraciones de HCl en tanto que las mayores actividades de PGasa y PeL se obtienen a mayores concentraciones de HCl (Cavalitto et al., 1996). La regulación de la expresión de las PGasas por el pH está mediada por la proteína PacC (Trevisan et al., 2011; de Vries and Visser, 2001).

1.7 Aplicaciones de las enzimas pectolíticas

Las pectinasas se utilizan en alimentos, para el desgomado y bio refinado (bioscouring) de fibras textiles, producción de papel, tratamiento de madera, alimentación animal, producción de detergentes y tratamiento de aguas residuales, como auxiliares biotecnológicos (Shivakumar and Nand, 1995; Hoondal et al., 2002; Rättö and Viikari, 1996). También se emplean como herramientas analíticas en fitoquímica, en particular en estudios sobre la estructura de la pared celular vegetal, química de polisacáridos, y para la producción de oligosacáridos y polisacáridos con propiedades farmacológicas (McCleary, 1986; Yamada, 1994).

Además el hombre ha utilizado a las enzimas pécticas con diferentes fines industriales. Su primera aplicación comercial, que data de 1930, fue para la preparación de vinos y zumos de fruta. Actualmente se utilizan preparados enzimáticos de pectinasas en los procesos de extracción, clarificación y liquefacción de zumos, para mejorar la calidad del producto, así como en la industria textil, y en otras aplicaciones biotecnológicas como la producción de papel, la extracción de aceite y la fermentación de te y café. El valor estimado de ventas de enzimas pécticas en 1995 fue de 75 millones de dólares, siendo el mercado de las enzimas industriales de 1 billón de dólares (Kashyap et al., 2001). Las pectinasas con aplicaciones en industria alimenticia representan el 25 % del las ventas globales de enzimas grado alimenticio (Singh, 1999).

Las enzimas pectolíticas se han aplicado en la industria de bebidas y alimentos por más de 70 años. La aplicación más tradicional de las pectinasas es en la clarificación de jugos. El jugo que resulta luego del prensado de la fruta, como manzana o uva, es turbio debido a la presencia de fragmentos de pared celular y a complejos formados por proteínas positivamente cargadas rodeadas de una capa de pectina con carga opuesta. La repulsión de estos complejos entre si los mantiene en suspensión. El agregado de una mezcla de PGasa y PE o bien de PeL sola, produce la degradación de la capa externa de pectina, promoviendo la interacción electrostática de los complejos, su precipitación y la consiguiente clarificación del jugo. La pérdida de turbidez del jugo resulta indeseable en los jugos cítricos destinados al consumo excepto en el caso del jugo de limón destinado a la formulación de bebidas colas. Cuando los frutos se exprimen, la PE endógena demetoxila la pectina y la posterior interacción de la misma con el Ca^{+2} presente en el jugo da lugar a la precipitación del pectato de calcio y la consiguiente autoclarificación. La degradación parcial de la pectina mediante el uso selectivo

de una PGasa o PeL genera productos de bajo peso molecular no precipitables en presencia de calcio y de este modo se evita la autoclarificación (Bonnin et al., 1997).

Las pectinasas también se utilizan para el procesamiento de pulpa (pulp enzyming). Se adicionan a la masa prensada de frutas, las que como en los casos de frutillas, cerezas, grosellas, frambuesas, manzanas y uvas, generalmente presentan alto contenido en pectina. Las pectinasas degradan la pectina causando la gelificación de la pulpa y facilitando el proceso de filtración. Este proceso se ha aplicado también para aumentar el rendimiento del prensado en la producción de aceites de oliva, palma y coco.

Otro proceso de gran interés biotecnológico es la maceración, cuyo objetivo es degradar la laminilla media del tejido vegetal para producir células libres prácticamente intactas (Pilnik and Rombouts, 1981; Renard, 1989; Nakamura et al., 1995). Dicho proceso fue originalmente desarrollado para obtener néctares (bebidas viscosas, turbias y con pulpa). Las peras, duraznos, damascos, papaya, maracuyá y guayaba son frutos utilizados con frecuencia en este proceso. La maceración también es empleada para la obtención de purés de vegetales (zanahorias, morrones, etc.), con alto contenido de sólidos, pigmentos y vitaminas, que se utilizan en la alimentación humana (bebés, adultos mayores), y como aditivos alimentarios. Las PGasas y PeL son las enzimas utilizadas con mayor frecuencia durante la maceración de los tejidos vegetales.

La licuefacción, proceso más drástico que la maceración, conduce a la degradación de la pared celular, se realiza a través de la acción combinada de pectinasas y celulasas, dando lugar a la lisis y la consiguiente liberación del jugo celular. Este proceso se aplica a la producción de jugos de frutas difíciles de filtrar como mango, banana o guayaba. Este proceso presenta una restricción importante, el uso de celulasas purificadas en la elaboración de alimentos no es aceptado por las agencias regulatorias. Un proceso alternativo es la licuefacción del orujo (pomace liquefaction), que consiste en diluir el orujo obtenido después de prensar la pulpa de fruta y obtener el jugo de primera expresión. El orujo diluido se licuefacta enzimáticamente y se vuelve a filtrar obteniéndose un segundo jugo. Este proceso se utiliza para incrementar la obtención de jugos de manzana y ananá.

1.8 La pectinesterasa

La pectinmetilesterasa o simplemente pectinesterasa (PE, EC 3.1.1.11) pertenece a la clase CAZy 8 de las carbohidrato esterasas (Cantarel et al., 2009). Esta enzima, que puede ser tanto de origen vegetal como microbiano, cataliza la hidrólisis específica del éster metílico

unido a la posición C-6 del residuo AGA en la región lineal del HG de la pectina, alterando así el grado y el patrón de metilesterificación, liberando tanto metanol como protones (Fig. 1.12).

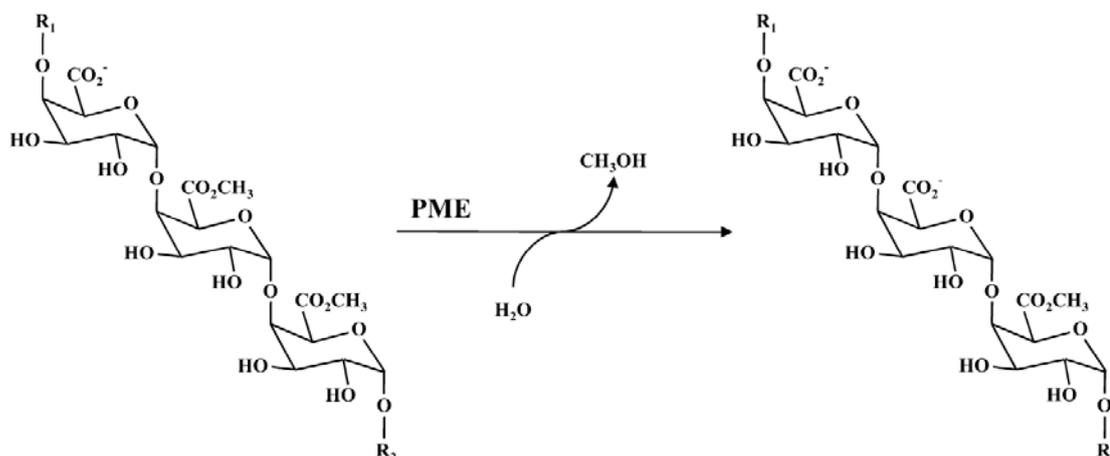


Figura 1.12 Reacción de demetoxilación del homogalacturonano de la pectina catalizada por la PE (R1 y R2 corresponden a los fragmentos inicial y terminal del polímero de la pectina, (Jolie et al., 2010).

Las PE juegan un rol importante en tecnología de alimentos debido a su actividad sobre diversas materias primas vegetales. Particularmente, se utilizan en combinación con pectinasas depolimerizantes (PGasas y/o pectatoliasas) para degradar pectina, tanto en procesos de clarificación de jugos de fruta (particularmente los menos ácidos como el de manzana y uva) como en la reducción de viscosidad de algunos productos alimenticios (Pilnik and Rombouts, 1981; Fogarty and Ward, 1972; Ishii et al., 1979). También hay casos en los cuales las PE se utilizan solas (elaboración de pectinas de bajo metoxilo) (Ishii et al., 1979) o clarificación de jugos cítricos, particularmente de limón (Pilnik and Rombouts, 1981; Baumann, 1981). El mecanismo de clarificación enzimática de jugos cítricos se fundamenta en el proceso de desesterificación de la pectina que deriva en su coagulación en forma de pectato de calcio. Este mecanismo ocurre espontáneamente en algunos jugos cítricos debido a la presencia de PE endógena. Sin embargo, este proceso natural es lento por lo cual se hace necesario el agregado de cantidades suplementarias de preparados comerciales con actividad de PE que debe ser activa al pH del jugo a clarificar. La actividad y estabilidad óptima de las PEs comerciales se encuentran generalmente en el rango de pH de 4 a 7. Información obtenida de empresas nacionales elaboradoras de jugos cítricos revela que actualmente el proceso de clarificación enzimática de jugo de limón presenta serios inconvenientes debido a la escasa actividad y estabilidad de los preparados enzimáticos

comerciales al pH natural del jugo. Como alternativa han surgido métodos de clarificación basados en la ultrafiltración del jugo, los cuales también presentan inconvenientes tecnológicos. De aquí surge la necesidad de búsqueda de PEs activas y estables en rangos de pH bajos para explorar su utilización en los procesos ya mencionados.

1.8.1 Presencia y ubicación

Las PEs de origen vegetal son enzimas ubicuas, se las ha encontrado en todas las plantas superiores examinadas, en raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Rexova-Benkova and Markovic, 1976; Benen et al., 2003). Las PEs vegetales se asocian principalmente a la pared celular por interacciones iónicas y, por lo tanto, se liberan a altas concentraciones iónicas o cambiando el pH a valores alcalinos (Rexova-Benkova and Markovic, 1976; Bordenave, 1996). Sin embargo, existen algunas formas solubles (Benen et al., 2003; Bordenave, 1996; Ciardiello et al., 2004; Markovic, 1998).

Finalmente, las PEs de origen microbiano son producidas tanto por bacterias fitopatógenas y hongos (Rexova-Benkova and Markovic, 1976; Markovic and Janecek, 2004; Rexova-Benkova and Markovic, 1976), como por microorganismos simbióticos durante sus interacciones con las plantas (Lievens et al., 2002). También se las ha encontrado en algunas levaduras (Benen et al., 2002; Gainvors et al., 1994; Nakagawa et al., 2000) e insectos como el gorgojo del arroz y el pulgón verde (Shen et al., 1999; Shen et al., 2005; Ma et al., 1990).

1.8.2 Polimorfismo

Las PEs pueden presentar múltiples isoformas, particularmente las de origen vegetal. Esta gran variedad de isoformas es más común en dicotiledóneas que en monocotiledóneas. El gran número de isoformas de PEs en plantas probablemente refleje la diversidad de roles de la enzima en la modificación de la pared celular durante el desarrollo de la planta. Se cree que la expresión de diferentes isoformas de PE, tanto espacial como temporalmente, es un mecanismo para regular la actividad endógena de la enzima en las plantas (Bosch and Hepler, 2005).

El grado de isoformas en PEs de origen microbiano es muy limitado y sólo aparece en ciertos microorganismos (Pelloux et al., 2007; Benen et al., 2003; Bordenave, 1996). Las diferentes isoformas catalizan la misma reacción (Micheli, 2001). Sin embargo pueden diferir en su pI, PM, grado de glicosilación, termoestabilidad y propiedades catalíticas (Rexova-Benkova and Markovic, 1976; Benen et al., 2003; Bosch and Hepler, 2005; Cameron et al.,

1998). Se han encontrado PEs con diferentes pHs óptimos, dependencias de sales, especificidades de sustrato y patrones de desesterificación (Markovic and Janecek, 2004; Catoire et al., 1998; Pelloux et al., 2007; Goldberg R. et al., 2001).

1.8.3 Propiedades físico-químicas

Las PEs son proteínas de tamaño medio con un PM comprendido entre 25-54 kDa. Son activas como monómeros. Las PEs de origen eucariótico pueden estar glicosiladas en el nitrógeno de Asn (N-ligada) o en el oxígeno de Ser o Thr (O-ligada) (Benen et al., 2003; Bordenave, 1996) como ocurre otras proteínas de la pared celular (PGasas y PeLs). Sin embargo, ha sido reportado sólo un número limitado de PEs glicosiladas, incluyendo isoformas de PE de kiwi (Giovane et al., 1990; Ciardiello et al., 2008), de naranja (Cameron and Grohmann, 1996; Rillo et al., 1992), de higo (Ding et al., 2002) y varias especies de *Aspergillus* (Christgau et al., 1996; Warren et al., 2002).

El pI de las PEs puede variar entre 3,1 y 11, valores extremos encontrados para las PE fúngicas y de vegetales, respectivamente. Los pIs neutros o alcalinos presentes en las PE de vegetales podría explicar su fuerte grado de asociación con la pared celular ligeramente ácida (Bordenave, 1996). Pocos estudios han puesto de manifiesto la presencia de PE ácidas en plantas, por ejemplo: en lino, higo, álamo y raíz de achicoria (Jolie et al., 2010). Se cree, sin embargo, que existe algún error para detectar PE ácidas en plantas, que podría estar relacionado con las condiciones experimentales utilizadas para la extracción de proteínas (Micheli, 2001). Las PE fúngicas poseen valores de pI más ácidos que aquellas de origen vegetal y la mayoría de las bacterianas como la de *Erwinia chrysanthemi* (Bordenave, 1996).

1.8.4 Estructura

1.8.4.1 Estructura primaria

Se ha secuenciado un gran número de PEs de plantas y microorganismos, tanto por medio de secuenciación proteica como de genes (Christgau et al., 1996; Laurent et al., 1993; Markovic and Jornvall, 1986; Markovic et al., 2002; Bordenave, 1996; Gaffe et al., 1997; Richard et al., 1994). Si bien existe cierta homología, las enzimas parecen ser divergentes, con un rango de identidad de residuos desde un 85 % para algunas PEs de plantas hasta un 20-30 % para PEs microbianas (Pelloux et al., 2007; Markovic et al., 2002; Jenkins et al., 2001; Markovic and Jornvall, 1992); <http://www.cazy.org/CE8.html> and <http://services.uniprot.org>, 2010).

Cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de más de 100 PEs (de plantas y microorganismos) se puede observar que todas contienen 5 segmentos secuenciales de alta similitud, 6 residuos estrictamente conservados (3 residuos de Gly, 1 de Asp, 1 de Arg y 1 de Trp), y varios residuos aromáticos altamente conservados funcionalmente importantes (Pelloux et al., 2007; Markovic and Janecek, 2004). A pesar de estas similitudes, se han encontrado diferencias significativas entre PEs de plantas, hongos y bacterias, especialmente en el contenido en residuos de His, Cys y aromáticos (Markovic and Janecek, 2004). También se han encontrado diferencias en la formación de puentes disulfuro; por ejemplo, la presencia de dos puentes intra-cadena se han descrito para la PE de tomate (Markovic and Jornvall, 1992; D'Avino et al., 2003), característica controvertida por Di Matteo y otros (Di Matteo et al., 2005). Se ha detectado un puente disulfuro en la PE de *E. chrysanthemi* (Johansson et al., 2002), mientras que se piensa que no existen en la PE de zanahoria (Johansson et al., 2002). Es posible construir un árbol genealógico (cladograma) utilizando los alineamientos de las secuencias representativas de 70 PEs. Como resultado se obtienen varios clados filogenéticos: uno de hongos, otro de bacterias y ocho de plantas, reflejando los diferentes grados de variedad que existen entre ellos (Markovic and Janecek, 2004; Eklöf et al., 2009).

1.8.4.2 Estructura tridimensional

Hasta la fecha, las únicas estructuras tridimensionales de PEs que han sido esclarecidas son la de *Erwinia chrysanthemi*, la de zanahoria (Johansson et al., 2002) y la de tomate (modelo molecular (D'Avino et al., 2003) y estructura cristalina (Di Matteo et al., 2005)). Las tres enzimas muestran una gran similitud en el plegamiento global. El sitio de unión a la pectina está situado de manera superficial con forma alargada, accesible al solvente, formado por loops externos. La parte central de esta hendidura está revestida por varios residuos aromáticos (Tyr, Phe, Trp), como es característico en los sitios de unión a carbohidratos. La molécula de pectina tiene una configuración de hélice (Figs. 1.13A y B), con los grupos carboximetilos apuntando en diferentes direcciones que los sucesivos residuos de AGA que puede ser acomodada en dicha hendidura (Fig. 1.13C). El hipotético sitio activo (representado por la PE de zanahoria en la Fig. 1.13D) que se encuentra en esta cavidad contiene varios restos de aminoácidos conservados: dos Asp, dos Gln y una Arg (Jenkins et al., 2001; D'Avino et al., 2003; Di Matteo et al., 2005; Johansson et al., 2002).

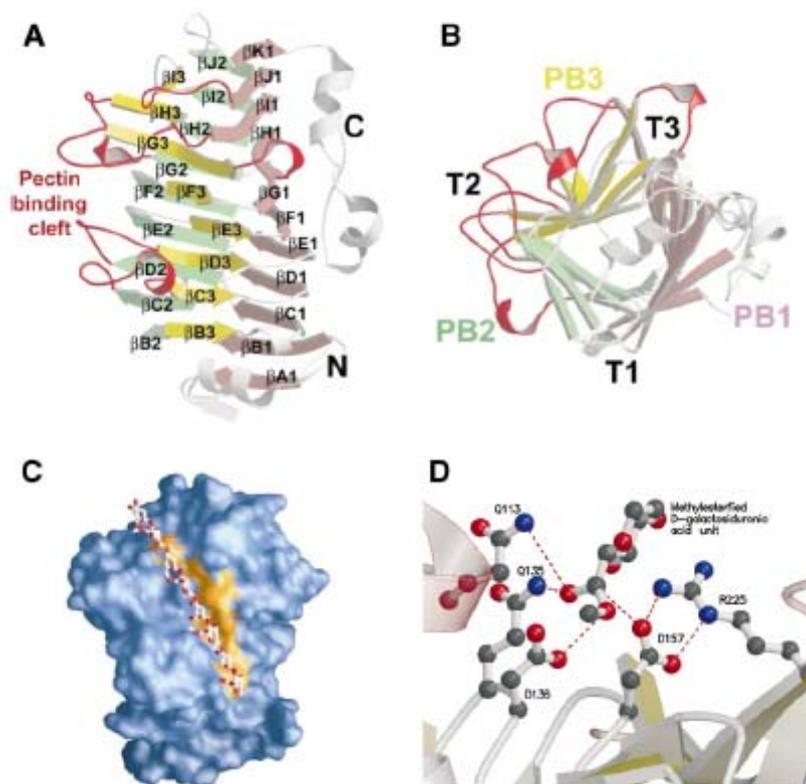


Figura 1.13 Estructura tridimensional de PE de zanahoria. A) Estructura de hélice β . B) Vista de la estructura rotada 90° en eje X (N-terminal). C) Representación del sitio de unión a la pectina. D) Sitio activo con una molécula de sustrato (Jolie et al., 2010).

La superposición de las estructuras conocidas de las PEs de zanahoria, tomate y *E. chrysanthemi* (Fig. 1.14) confirma la similitud de los plegamientos topológicos. Al mismo tiempo, pone de manifiesto una gran diferencia entre las PEs de plantas y la bacteriana, como es la forma de la hendidura del sustrato, que es más profunda en la bacteriana por la presencia de loops más largos (D'Avino et al., 2003; Di Matteo et al., 2005).

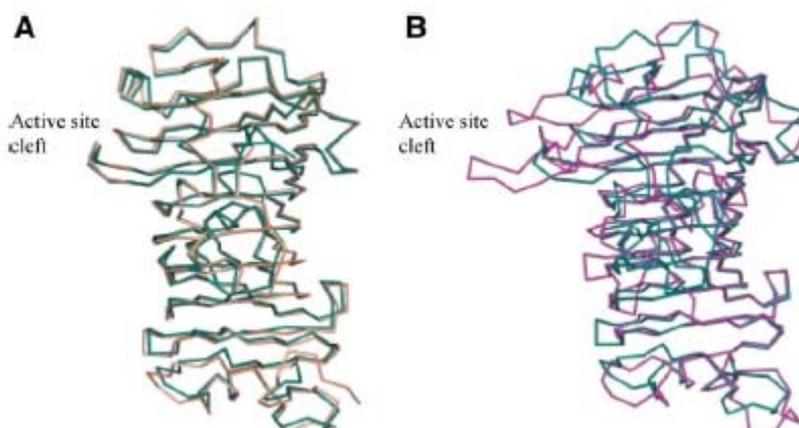


Figura 1.14 Comparación de la estructura 3D de diferentes PEs. A) PE de tomate (verde) y zanahoria (naranja). B) Superposición de la PE de tomate y de *E. chrysanthemi* (violeta) (Jolie et al., 2010).

1.8.5 Actividad catalítica

1.8.5.1 Mecanismo de reacción

La PE cataliza la hidrólisis específica de la unión éster metílico en el C-6 de los residuos de AGA presentes en la pectina, formando un carboxilo dissociable en la cadena de pectina y liberando metanol. La presencia de grupos carboxílicos libres en la cercanía del sitio activo parece ser necesaria para la actividad de PE (Rexova-Benkova and Markovic, 1976; Fries et al., 2007; Bordenave, 1996). Este hecho explicaría la preferencia de la PE por las pectinas parcialmente desesterificadas (Johansson et al., 2002; Andersen et al., 1995; van Alebeek et al., 2003).

Basándose en la estructura del sitio catalítico de la PE de zanahoria (Fig. 1.13D), se ha propuesto un mecanismo de acción de la PE (Johansson et al., 2002), el cual fue confirmado posteriormente para la PE de tomate (Di Matteo et al., 2005) y para la de *E. chrysanthemi* con pequeños cambios (Fries et al., 2007). El carboxilato cargado negativamente de un residuo Asp del sitio activo, estabilizado por un enlace de hidrógeno a una Arg, realiza un ataque nucleofílico en el carbono carbonilo del éster metílico de HG. En analogía con otros mecanismos hidrolíticos se forma un intermediario con forma de tetraedro cargado negativamente, que se estabiliza por la presencia de cadenas laterales conservadas de Gln. Posteriormente, un segundo residuo Asp (en general el ácido-base en la reacción) actúa como un donador de protones en la etapa de escisión donde metanol se libera. El sitio activo se restaura a través de la extracción de un protón de una molécula de agua entrante por el grupo carboxilato resultante del segundo Asp, escindiendo el enlace covalente entre el sustrato y el primer Asp. Por su interacción con los anillos aromáticos, la cadena del HG se mantiene dentro de la hendidura del sustrato, a la espera del próximo paso de desmetoxilación. Un mecanismo alternativo sugiere que el Asp del sitio activo es el responsable de la desprotonación catalítica de una molécula de agua, en lugar de un ataque nucleófilo sobre el carbono carbonílico (Jenkins et al., 2001).

1.8.5.2 Influencia del pH y de los cationes

Las PEs, especialmente las de plantas, suelen ser muy sensibles al entorno iónico. La estabilidad al pH depende de la fuente de la enzima y se extiende de 1 a 10 (Benen et al., 2003). El pH óptimo de las diferentes PEs varía sustancialmente, como se puede deducir de su amplio rango de pIs: desde alcalino para la mayoría de las PE de origen vegetal o bacteriano hasta ácido para la mayoría de origen fúngico (Pelloux et al., 2007; Benen et al., 2003).

Las PEs vegetales y las bacterianas suelen ser poco activas a pHs ácidos debido a las fuertes interacciones entre la enzima cargada positivamente y los grupos carboxílicos libres del HG (producto de la reacción enzimática). A pHs básicos ocurre lo inverso, las PEs alcalinas pueden ser liberadas de su sustrato por la repulsión electrostática entre los grupos carboxilos libres y la carga negativa de la enzima (Bordenave, 1996;Nari et al., 1986). Lo contrario ocurre con las PEs de origen fúngico.

Los cationes afectan la catálisis de las PEs. Para la mayoría de las PEs vegetales, los cationes son esenciales para la actividad enzimática (Rexova-Benkova and Markovic, 1976;Bordenave, 1996;Moustacas et al., 1991). Sin embargo, se han descrito algunas isoformas de PEs independientes de los mismos (Savary et al., 2003;Warrilow et al., 1994;Savary et al., 2002;Phan et al., 2007).

Generalmente la actividad de PEs aumenta con la fuerza iónica hasta llegar a un valor óptimo por encima del cual comienza a disminuir. Dicho valor óptimo depende de la naturaleza del catión (Ma et al., 1990;Leiting and Wicker, 1997;Sun and Wicker, 1999). Se ha propuesto que los cationes (iones metálicos, así como poliaminas) compiten con las proteínas cargadas positivamente por la interacción con los grupos carboxílicos libres de la pectina formados luego de la acción enzimática. De este modo, se facilita la liberación de la enzima ya que la mayoría de las PEs vegetales poseen pI alcalinos, por lo cual se encuentran cargadas positivamente, incluso a pHs ligeramente básicos (Benen et al., 2003;Bordenave, 1996;Nari et al., 1991;Charnay et al., 1992). Sin embargo, un mayor incremento en la concentración salina deriva en el bloqueo de los grupos carboxílicos libres (necesarios para la actividad enzimática) vecinos al grupo carboxílico esterificado (blanco de la enzima) (Nari et al., 1991;Charnay et al., 1992).

1.8.5.3 Modo de acción

La desesterificación no enzimática es un proceso aleatorio que deriva en una distribución estadística de AGA libres y metoxilados en el HG (Limberg et al., 2000;Van Buren, 1979). Por el contrario, la desesterificación enzimática por parte de las PEs procede de una manera más ordenada. Se pueden considerar 3 mecanismos teóricos para describir el mecanismo de desesterificación enzimática (Greenwood and Milne, 1968;Fries et al., 2007;Duvetter et al., 2006) a saber:

1. Aleatoria o de cadena múltiple, donde la enzima cataliza una única reacción para luego disociarse del sustrato.

2. Lineal o de cadena simple, donde la enzima remueve todos los metilésteres contiguos de una única cadena de pectina antes de disociarse del sustrato.
3. De ataque múltiple, donde la enzima desesterifica un número promedio limitado (denominado grado de ataque múltiple) metilésteres contiguos antes que el complejo enzima-pectina se disocie.

Estos tres modelos se extienden desde la disociación inmediata de la enzima después de un ciclo de reacción hasta decenas o cientos de eventos catalíticos antes de la disociación final enzima-sustrato (Cameron et al., 2008).

En general se acepta que las PEs con pI alcalino (de plantas y de bacterias) eliminan los ésteres metílicos de manera progresiva, en bloques, creando largos tramos contiguos de residuos AGA desesterificados, explicándose por el mecanismo de cadena simple (Fries et al., 2007;Grasdalen et al., 1996;Cameron et al., 2008;Markovic and Kohn, 1984;Ralet et al., 2001). Este mecanismo de desesterificación ha sido confirmado por la existencia de residuos metoxilados por delante del sitio catalítico y residuos demetoxilados por detrás del mismo (residuos upstream y downstream) (Fries et al., 2007). En el caso de las PEs ácidas (fúngicas y algunas pocas de vegetales), la pectina se desesterifica en forma aleatoria de acuerdo al mecanismo de cadena múltiple el cual resulta en una distribución "más aleatoria" de AGA desesterificados (Matssura et al., 2000;Limberg et al., 2000;Duvetter et al., 2006). No obstante, esta es una visión muy simple ya que se cree que otros factores pueden influir en el modo de acción, tales como el pH, GM y PM inicial de la pectina. Se ha demostrado que el patrón de acción de algunas isoformas de determinadas PEs es dependiente del pH. A un pH dado, algunas isoformas son más efectivas que otras cuando atacan pectinas altamente esterificadas (Kim et al., 2005;Catoire et al., 1998;Goldberg R. et al., 2001;Denès et al., 2000).

El patrón de desesterificación de la pectina por parte de las PEs se ha estudiado utilizando diversos métodos (Markovic and Kohn, 1984;De Vries J.A et al., 1983;Versteeg, 1979;Grasdalen et al., 1996;Andersen et al., 1995). A su vez, se han caracterizado los fragmentos de los polímeros parcialmente desesterificados luego de ser sometidos a hidrólisis por endo-PGasas (Versteeg, 1979). También han sido reportados diversos estudios cuantitativos donde se utiliza espectroscopia ¹H-NMR para establecer la distribución de los grupos metoxilos de la pectina desesterificada con diferentes grados de esterificación (Grasdalen et al., 1996;Andersen et al., 1995). Por otra parte, se han informado estudios cromatográficos de pectinas altamente metiladas que han sido desesterificadas por PEs de

diferentes orígenes (Ralet et al., 2002). Finalmente, se han evaluado los coeficientes αCa^{+2} (función compleja de la densidad de carga lineal de las macromoléculas) luego de la desesterificación enzimática para determinar el modo de acción de las PEs (Markovic and Kohn, 1984). De estas investigaciones se ha propuesto que las PEs alcalinas de plantas superiores, como tomate, naranja y alfalfa, presentan un mecanismo de desesterificación lineal sobre la cadena originando bloques de grupos carboxílicos. Por el contrario, las PEs ácidas, de origen generalmente fúngico, desesterifican en forma aleatoria los carboxílicos esterificados de la pectina (Markovic and Kohn, 1984).

Las propiedades funcionales de las pectinas se deben no sólo a la cantidad sino también a la distribución de los ésteres metílicos, tanto en la pared celular de plantas y en ciertos productos alimenticios (i.e.: la susceptibilidad hacia despolimerización enzimática de PGasa o PeL, y capacidad de formación de gel de calcio-pectina) (Willats et al., 2001a; Willats et al., 2001b; Thibault and Ralet, 2003; Waldron et al., 2003). Por ello, el modo de acción de las PEs es de gran interés no sólo para los científicos dedicados al estudio de las plantas, sino también para los tecnólogos de alimentos.

1.9 *Aspergillus kawachii*

Aspergillus es uno de los géneros más utilizados en la industria biotecnológica por sus altos niveles de secreción de proteína además de su condición GRAS (generally regarded as safe) para la producción de enzimas microbianas de uso alimenticio. Algunas especies son usadas tradicionalmente, particularmente en países orientales, en la fermentación de granos para la producción de alimentos y bebidas. Las especies más importantes de este hongo son: *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. awamori*, *A. usami* y *A. kawachii* (Cook and Campbell-Platt, 1993).

El hongo amarillo del koji (*A. oryzae*) se ha utilizado para la elaboración de sake (Machida et al., 2005), mientras que el hongo negro del koji (*A. awamori*) y su mutante albino, el hongo blanco del koji (*A. kawachii*) se han empleado para hacer el shochu, bebida alcohólica destilada del Japón comúnmente elaborada a partir de cebada, batata y/o arroz. El shochu se produce principalmente en el suroeste de Japón (isla de Kyushu), donde el clima es relativamente más cálido que en los lugares para la elaboración del sake. Por ello, los tanto *A. awamori* como *A. kawachii* fueron seleccionados para la elaboración del shochu ya que al ser productores de ácidos evitan la contaminación bacteriana indeseable. A pesar de estas dos especies de moho koji están filogenéticamente cercanas a *A. niger*, ambas están claramente

separados de *A. niger* (Yamada et al., 2011). En la Tabla 1.1 se detallan algunos de los ejemplos más representativos del uso de *A. kawachii* en fermentaciones alimentarias tradicionales de países orientales.

Tabla 1.1 Empleo de *A. kawachii* como iniciador en productos alimenticios originarios de Japón, Corea y China.

Producto	Nombre popular	Iniciador	Ingrediente principal	Referencia
Vino (Japón)	Shochu	Shochu-koji	Arroz, cebada o batata	(Teramoto et al., 1994) (Obayashi and Uchi, 1999) (Setoguchi et al., 1993)
Sazonador (Japón)	Mirin	Shochu-koji	Arroz	(Nunokawa et al., 1982)
Vino (Japón)	Tipo sake	Shochu-koji	Arroz	(Kawai et al., 1977) (Chiyogiku, 1982) (Shimamura et al., 2001)
Cerveza (Corea)	Takju	<i>A. kawachii</i> -Nuruk	Arroz, trigo	(So et al., 1999)
Pasta de soja (Corea)	Kochujang	<i>A. kawachii</i> -Meju	Soja, ají o chile	(Lee et al., 1984)
Vino (China)	-	<i>A. kawachii</i>	Jugos, ácido acético	(Zhang and Yang, 2001)

Recientemente se ha determinado la secuencia del genoma de *A. kawachii* IFO 4308 (Futagami et al., 2011). El análisis de la secuencia podría dar una idea de las propiedades de este hongo que lo hacen superior para su uso en la producción del shochu. Esta información podría dar lugar a un mayor desarrollo de *A. kawachii* en aplicaciones biotecnológicas industriales.

Aspergillus kawachii es un hongo blanco, filamentoso, que se caracteriza por ser hiper productor de ácido cítrico además de ser utilizado en la producción de vino de arroz (sake) (Toyama and Toyama, 1997). Produce enzimas extracelulares caracterizadas por ser activas y estables a pH más ácidos que sus equivalentes producidas por otros microorganismos. También se lo suele utilizar como iniciador de la fermentación, donde cumple el rol de degradar los polisacáridos presentes en los granos para dar origen al sustrato (mosto) en un proceso semejante al malteado. Posteriormente, este mosto será inoculado dando inicio a la fermentación alcohólica. *A. kawachii* se utiliza desde tiempos ancestrales, cuando existía un uso empírico de varios microorganismos para el procesamiento de materiales de origen vegetal destinado a la producción de alimentos.

1.9.1 *Aspergillus kawachii* como productor de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular

Aspergillus kawachii crece a valores de pH muy bajos como los que se emplean en la elaboración de kojis destinados a la fermentación de cereales (particularmente arroz) en medio ácido (pH: 2,0-4,0) para la producción de shochu (aguardiente japonés), mirin (saborizante) y alcohol. Por el carácter ácido de la fermentación, este hongo debe producir diferentes enzimas extracelulares ácido-estables y con rangos de actividad a pHs más bajos en comparación con enzimas similares producidas por otros microorganismos. Varias de ellas, proteasas ácidas, xilanasas, amilasas, glucoamilasas, maltasas y poligalacturonasas, han sido purificadas y parcialmente caracterizadas bioquímicamente y genéticamente, particularmente por investigadores japoneses (Mikami et al., 1987; Mikami et al., 1988; Iwano et al., 1986; Ito et al., 1992a; Kojima et al., 1999; Contreras Esquivel et al., 1999). Algunas de estas enzimas fueron clonadas y expresadas en *Saccharomyces*. En la Tabla 1.2 se puede observar que la mayoría de las enzimas expresadas por *A. kawachii* están relacionadas con la degradación del almidón, celulosa, hemicelulosa y proteínas. Es relativamente poca la información reportada sobre el sistema pectolítico de este microorganismo.

Tabla 1.2 Propiedades de diversas enzimas de *A. kawachii*.

Enzima	PM	pI	pH óptimo	Rango de pH	Temperatura óptima	Referencias
Amilasa I	104	4,2	4-5	2,5-6,0	70 (pH 5)	(Mikami et al., 1987)
Amilasa II	66	4,2	5	2,5-6,0	70 (pH 5)	“
Amilasa A1	85	-	5	2,0-6,5	-	(Sudo et al., 1994)
Amilasa A2	50	-	5	4,5-9,5	-	“
Amilasa A3	56	-	-	-	-	(Omori et al., 1994)
Glucoamilasa	101	-	4-5	3-8	-	(Mikami et al., 1988)
Carboxilproteínasa	35	3,9	2,8 y 3,4	2,2-6,4	50	(Yagi et al., 1986)
β -Glucosidasa EX -1	145	-	-	2-9	30	(Iwashita et al., 1998)
β -Glucosidasa EX -2	130	-	-	2-9	30	“
β -Glucosidasa CB -1	120	-	-	2-9	30	“
endo-xilanasas A	35	6,7	5,5	3-10	60	(Ito et al., 1992b)
endo-xilanasas B	26	4,4	4,5	3-10	55	“
endo-xilanasas C	29	3,5	2,0	1-9	50	“
PGasa-A1	43	-	4	-	50	(Kojima et al., 1999)
PGasa-A2	80	-	3	-	60	“
PGasa-B	71	-	5	-	60	“
PGasa 1	60	3,5 y 5,0	4,5	2-4,5		(Contreras Esquivel and Voget, 2004)

1.10 Objetivos, justificación y plan de tesis.

Estudiar la producción de enzimas pectolíticas (tanto novedosas como previamente reportadas) por *Aspergillus kawachii*, caracterizarlas y compararlas con sus equivalentes de otros orígenes. Considerando la capacidad de *A. kawachii* de producir enzimas activas en condiciones de alta acidez y al escaso conocimiento de su sistema pectolítico, se inició este trabajo de investigación para contribuir al estudio de las pectinasas de este microorganismo. Este trabajo incluyó el screening de actividades enzimáticas, la producción, purificación y caracterización de la PE activa a bajos valores de pH (2,0-3,0) y su aplicación a la clarificación de jugo de limón. A continuación se define el plan de trabajo desarrollado en este trabajo.

Plan de Tesis

Capítulo 1: Introducción.

Estado actual de la estructura de la pectina, enzimas que la degradan y microorganismos involucrados. Estudio y análisis del estado del arte de los temas comprendidos en este trabajo.

Capítulo 2: Enzimas pectolíticas de *A. kawachii*.

Realización cultivos, purificaciones y caracterizaciones de enzimas pectolíticas de *A. kawachii* en medios líquidos con diferentes fuentes de carbono (en presencia o no de pectina y/o sustancias relacionadas conteniendo AGA como agente inductor).

Capítulo 3: Producción de Pectinesterasa de *A. kawachii*.

Cultivos en fase sólida y líquida. Determinación de inductores de la enzima. Producción de Pectinesterasa en biorreactor. Optimización de la producción utilizando superficies de respuesta.

Capítulo 4: Purificación y caracterización de Pectinesterasa de *A. kawachii*.

Purificación de PE producida en pectina como fuente de carbono y energía. Determinación de propiedades fisico-químicas y cinéticas, modo de acción (en bloque o random), estabilidad térmica, efecto de iones y otras sustancias. Estabilidad térmica y al pH. Comparación con PE comercial de *Aspergillus aculeatus*.

Capítulo 5: Conclusiones generales.

1.11 Bibliografía

1. Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D., and Prusky, D. (2004) Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65, 271-275.
2. Albersheim, P. (1965). The structure and function of the cell wall. In: *Plant Biochemistry*. J.Bonner, and J.Varner, eds. (Academic Press: New York), pp. 151-186.
3. Albersheim, P., Darvill, A.G., O'Neil, M.A., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (1996). *Pectins and pectinases*, (Elsevier Science B.V: Amsterdam).
4. Andersen, A.K., Larsen, B., and Grasdalen, H. (1995) Sequential structure by ¹H NMR as a direct assay for pectinesterase activity. *Carbohydrate Research* 273, 93-98.
5. Baumann, J.W. (1981). Application of enzymes in fruit juice technology. In: *Enzymes and Food Processing*. G.G.Birch, and N.a.P.K.J.Blakebrough, eds. (Applied Science Publishers Ltd.: London), pp. 129-147.
6. Benen, J.A.E., Van Alebeek, G.-J.W.M., Voragen, A.G.J., and Visser, J. (2003). Pectic Esterases. In: *Handbook of Food Enzymology*. J.R.Whitaker, A.G.J.Voragen, and D.W.S.Wong, eds. (Marcel Dekke), pp. 849-856.
7. Benen, J.A.E., Vincken, J.-P., and Van Alebeek, G.-J.W.M. (2002). *Pectins and their manipulation*, (Sheffield Academic Press.).
8. Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., and Wheeler, D.L. (2002) GenBank. *Nucleic Acids Res* 30, 17-20.
9. Bonnin, E., Renard, C., Thibault, J.-F., and Ducroo, P. (1997). Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisations alimentaires. In: *Enzymes an Aggro-Alimentaire*. V.Laneta-Ganda, ed. (Tech et Doc Lavoisier: Paris), pp. 167-200.
10. Bordenave, M. (1996). Analysis of pectin methyl esterases. In: *Plant cell wall analysis*. H.F.Linskens, ed. (Springer: New York), pp. 165-180.
11. Bosch, M., and Hepler, P.K. (2005) Pectin methyl-esterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* 17, 3219-3226.
12. Cameron, R.G., Baker, R.A., and Grohmann, K. (1998) Multiple forms of pectinmethylesterase from citrus peel and their effects on juice cloud stability. *Journal of Food Science* 63, 253-256.
13. Cameron, R.G., and Grohmann, K.J. (1996) Purification and characterization of a thermally tolerant pectin methylesterase from a commercial Valencia fresh frozen orange juice. *Agric.Food Chem.* 44, 458-462.
14. Cameron, R.G., Luzio, G.A., Goodner, K., and Williams, M.A.K. (2008) Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin

- methylesterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydrate Polymers* 71, 287-299.
15. Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res.* 37, 233-238.
 16. Carpita, N., Tierney, M., and Campbell, M. (2001) Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant.Mol.Biol.* 47, 1-5.
 17. Carpita, N.C., and Gilbeaut, D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3, 1-30.
 18. Catoire, L., Pierron, M., Morvan, C., Hervé, C., and Goldberg, R. (1998) Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33150-33156.
 19. Cavalitto, S.F., Arcas, J.A., and Hours, R.A. (1996) Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnology Letters* 18, 251-256.
 20. Charnay, D., Nari, J., and Noat, G. (1992) Regulation of plant cell-wall pectin methyl esterase by polyamines-interactions with the effects of metal ions. *Eur.J.Biochem.* 205, 711-714.
 21. Chellegatti, M.A.d.S.C., Fonseca, M.J.V., and Said, S. (2002) Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. *Microbiol.Res.* 157, 19-24.
 22. Chiyogiku, K.K. (1982). Manufacture of wine-like sake, (Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 82 02,676 : Japan).
 23. Christgau, S., Kofod, L., Halkier, T., Andersen, L., Hockauf, M., Dorreich, K., DALBØGE, H., and Kauppinen, S. (1996) Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzymes. *Biochem.J.* 319, 705-712.
 24. Ciardiello, M.A., D'Avino, R., Amoresano, A., Tuppo, L., Carpentieri, A., Carratore, V., Tamburrini, M., Giovane, A., Pucci, P., and Camardella, L. (2008) The peculiar structural features of kiwi fruit pectin methylesterase: Amino acid sequence, oligosaccharides structure, and modeling of the interaction with its natural proteinaceous inhibitor. *Proteins* 71, 195-206.
 25. Ciardiello, M.A., Tamburrini, M., Tuppo, L., Carratore, V., Giovane, A., Mattei, B., and Camardella, L. (2004) Pectin methylesterase from kiwi and kaki fruits: purification, characterization and role of pH in the enzyme regulation and interaction with the kiwi proteinaceous inhibitor. *J.Agric.Food Chem.* 52, 7700-7703.

26. Colquhoun, I.J., De Ruiter, G.A., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (1990) Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research* 206, 131-144.
27. Contreras Esquivel, J.C. Purification and characterization of *Aspergillus kawachii* polygalacturonases. 2003. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Ref Type: Thesis/Dissertation

28. Contreras Esquivel, J.C., Hours, R.A., Voget, C.E., and Mignone, C.F. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(1), 48-52. 1999.

Ref Type: Journal (Full)

29. Contreras Esquivel, J.C., and Voget, C.E. (2004) Purification and characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J.Biotechnol.* 110, 21-28.
30. Cook, P.E., and Campbell-Platt, G. (1993). *Aspergillus* and fermented foods. In: *The Genus Aspergillus*. K.A.Powell, R.A., and J.F.Peberdy, eds. (Plenum Press: New York), pp. 171-188.
31. D'Avino, R., Camardella, L., Christensen, T.M.I.E., Giovane, A., and Servillo, L. (2003) Tomato pectin methylesterase: Modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins* 53, 830-839.
32. De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellincampi, D., and Cervone, F. (1997). Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: *The Mycota V. Plant Relationships*. Part B. G.C.Carroll, and P.Tudzynski, eds. (Springer-Verlag: Berlin), pp. 61-83.
33. de Vries. Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. 1999.

Ref Type: Thesis/Dissertation

34. De Vries J.A, Rombouts, F.M., Voragen, A.G.J., and Pilnik, W. (1983) Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers* 245-258.
35. de Vries, R.P. (2003) Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide degrading enzymes; relevance for industrial production. *Appl.Microbiol.Biotechnol* 61, 10-20.
36. de Vries, R.P., Jansen, J., Aguilar, G., Parenicová, L., Joosten, V., Wulfert, F., Benen, J.A.E., and Visser, J. (2002) Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters* 530, 41-47.
37. de Vries, R.P., and Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 65, 497-522.

38. Denès, J.-M., Baron, A., Renard, C.M.G.C., Péan, C., and Drilleau, J.-F. (2000) Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research* 327, 385-393.
39. Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., and Tsernoglou, D. (2005) Structural Basis for the Interaction between Pectin Methylesterase and a Specific Inhibitor Protein. *The Plant Cell Online* 17, 849-858.
40. Ding, J.L.C., Hsu, J.S.F., Wang, M.M.C., and Tzen, J.T.C. (2002) Purification and Glycosylation Analysis of an Acidic Pectin Methylesterase in Jelly Fig (*Ficus awkeotsang*) Achenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2920-2925.
41. Duvetter, T., Fraeye, I., Sila, D.N., Verlent, I., Smout, C., Hendrickx, M., and Van Loey, A. (2006) Mode of De-esterification of Alkaline and Acidic Pectin Methyl Esterases at Different pH Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7825-7831.
42. Eklöf, J.M., Tan, T.C., Divne, C., and Brumer, H. (2009) The crystal structure of the outer membrane lipoprotein YbhC from *Escherichia coli* sheds new light on the phylogeny of carbohydrate esterase family 8. *Proteins* 76, 1029-1036.
43. Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinooor, A., and Prusky, D. (2002) pH regulated endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Mol Plant-Microbe Interact* 15, 774-779.
44. Fogarty, W., and Kelly, C.T. (1983). Pectic enzymes. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. W.Fogarty, ed. (: New York), pp. 131-182.
45. Fogarty, W.M., and Ward, O.P. (1972) Pectic substances and pectinolytic enzymes. *Process Biochem.* 7, 13-7.
46. Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2007) Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *The EMBO J.* 26, 3879-3887.
47. Futagami, T., Mori, K., Yamashita, A., Wada, S., Kajiwara, Y., Takashita, H., Omori, T., Takegawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., and Goto, M. (2011) Genome Sequence of the White Koji Mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, Used for Brewing the Japanese Distilled Spirit Shochu. *Eukaryotic Cell* 10, 1586-1587.
48. Gaffe, J., Tiznado, M.E., and Handa, A.K. (1997) Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiol.* 114, 1547-1556.
49. Gainvors, A., Frazier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., and Belarbi, A. (1994) Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. (1994) *Yeast* 10, 1311-1319.

50. García Maceira, F.I., Di Pietro, A., and Roncero, M.I. (1997) Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. FEMS Microbiol.Lett. 154, 37-43.
51. Gaspar, Y., Johnson, K.L., McKenna, J.A., Bacic, A., and Schultz, C.J. (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. Plant Mol.Biol. 47, 161-176.
52. Giovane, A., Quagliuolo, L., Castaldo, D., Servillo, L., and Balestrieri, C. (1990) Pectin methyl esterase from *Actinidia chinensis* fruits. Phytochemistry 29, 2821-2823.
53. Goldberg R., Pierron M., Bordenave M., Breton C., Morvan C., and Hervé du Penhout, C. (2001) Control of mung bean pectinmethylesterase isoform activities. Influence of pH and carboxyl group distribution along the pectic chains. J.Biol.Chem. 276, 8841-8847.
54. Grasdalen, H., Andersen, A.K., and Larsen, B. (1996) NMR-spectroscopy studies of the action pattern of tomato pectin esterase – generation of block structure in pectin by a multiple attack mechanism. Carbohydr.Res. 289, 105-114.
55. Greenwood, C.T., and Milne, E.A. (1968) Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 23, 281-366.
56. Hilz, H. Characterization of cell wall polysaccharides in bilberries and black currants. 2007. Wageningen University.
Ref Type: Thesis/Dissertation
57. Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., and Beg, Q.K. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology 59, 409-418.
58. Huisman, M.M.H., Brull, L.P., Thomas-Oates, J.E., Haverkamp, J., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2001) The occurrence of internal (1-5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. Carbohydrate Research 330, 103-114.
59. Ishii, S., Kiho, K., Sugiyama, S., and Sugimoto, H. (1979) Low methoxyl pectin prepared by pectinesterase from *Aspergillus japonicus*. J.Food Sci. 44, 611-614.
60. Ishii, T., and Matsunaga, T. (2001) Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. Phytochemistry 57, 969-974.
61. Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M.A., Darvill, A., and Albersheim, P. (1999) The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. J.Biol.Chem. 274, 13098-13104.
62. Ito, K., Iwashita, K., and Iwano, K. (1992a) Cloning and sequencing of xynC gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*. Biosci.Biotech.Biochem. 56, 1338-1340.

63. Ito, K., Ogasawa, H., Sugimoto, T., and Ishikawa, T. (1992b) Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci.Biotech.Biochem.* 56, 547-550.
64. Iwano, K., Mikami, S., Fukuda, K., Shiinoki, S., and Shimada, T. (1986) The properties of various enzymes of Shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *J.Brew.Soc.Japan* 81, 490-494.
65. Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimojo, H., and Ito, K. (1998) Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 62, 1938-1946.
66. Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K., and Pickersgill, R.W. (2001) Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *Journal of Molecular Biology* 305, 951-960.
67. Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemanna, R., Jornvall, H., Markovic, O., and Eklund, H. (2002) Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Lett.* 514, 243-249.
68. Jolie, R.P., Duvetter, T., Van Loey, A.M., and Hendrickx, M.E. (2010) Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* 345, 2583-2595.
69. Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., and Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* 77, 215-227.
70. Kawai, S., Takahashi, K., and Tamaki, Y. (1977) Production of citron-sake. III. *Nippon Jozo Kyokai Zasshi* 72, 680-681.
71. Kester, H.C.M., Kusters-van Someren, M.A., Muller, Y., and Visser, J. (1996). The exo-polygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*: characterization and cloning of the gene. In: *Progress in Biotechnology. Pectins and Pectinases Proceedings of an International Symposium.* J.Visser, and A.G.J.Voragen, eds. (Elsevier), pp. 817-823.
72. Kim, Y., Teng, Q., and Wicker, L. (2005) Action pattern of Valencia orange PME de-esterification of high methoxyl pectin and characterization of modified pectins. *Carbohydrate Research* 340, 2620-2629.
73. Kojima, Y., Sakamoto, T., Kishida, M., Sakai, T., and Kawasaki, H. (1999) Acid condition-inducible polygalacturonase of *Aspergillus kawachii*. *Journal of Molecular Catalysis B* 6, 351-357.
74. Komalavilas, P., and Mort, A.J. (1989) The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydrate Research* 189, 261-272.
75. Kravtchenko, T.P., Arnould, I., Voragen, A.G.J., and Pilnik, W. (1992) Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical β -elimination in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* 19, 237-242.

76. Lau, J.M., McNeil, M., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1987) Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine. *Carbohydrate Research* 168, 245-274.
77. Laurent, F., Kotoujansky, A., Labesse, G., and Bertheau, Y. (1993) Characterization and overexpression of the pem gene encoding pectin methylesterase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Gene* 131, 17-25.
78. Le Goff, A., Renard, C.M.G.C., Bonnin, E., and Thibault, J.F. (2001) Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers* 45, 325-334.
79. Lee, T.S., Lee, T.S., and Oh, K.H. (1984) Effect of kojis on the composition of kochujang. *Journal of the Korean Society of Food and Nutrition* 13, 238-246.
80. Leiting, V.A., and Wicker, L. (1997) Inorganic cations and polyamines moderate pectinesterase activity. *J.Food Sci.* 62, 253-255.
81. Lerouge, P., O'Neil, M.A., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1993) The purification of commercially available endo- α -L-arabinanases and α -L-arabinosidase for use in the structural analysis of pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 243, 373-378.
82. Lievens, S., Goormachtig, S., Herman, S., and Holsters, M. (2002) Patterns of Pectin Methylesterase Transcripts in Developing Stem Nodules of *Sesbania rostrata*. *MPMI* 15, 164-168.
83. Limberg, G., Korner, R., Buchholt, H.C., and etc (2000) Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydrate Research* 327, 293-307.
84. Ma, R., Reese, J.C., Black, W.C., and Bramelcox, P.J. (1990) Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *J.Insect Physiol.* 36, 507-512.
85. Mach, R.L., and Zeilinger, S. (2003) Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60, 515-522.
86. Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., and Kikuchi, H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 138, 1157-1161.

87. Markovic, O., and Jornvall, H. (1992) Disulfide bridges in tomato pectinesterase: variations from pectinesterases of other species; conservation of possible active site segments. *Protein Sci.* *1*, 1288-1292.
88. Markovic, O. (1998) Soybean seed pectinesterase. *Seed Science Research* *8*, 455-461.
89. Markovic, O., Cederlund, E., Griffiths, W.J., Lipka, T., and Jörnvall, H. (2002) Characterization of carrot pectin methylesterase. *Cellular and Molecular Life Sci* *59*, 513-518.
90. Markovic, O., and Janecek, S. (2004) Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohydrate Research* *339*, 2281-2295.
91. Markovic, O., and Jornvall, H. (1986) Pectinesterase. The primary structure of the tomato enzyme. *Eur.J.Biochem.* *158*, 455-462.
92. Markovic, O., and Kohn, R. (1984) Mode of pectin deesterification by *Trichoderma reesei* pectinesterase. *Experientia* *40*, 842-843.
93. Martinez Trujillo, M.A. Estudio cinético de la producción secuenciada de pectinasas en *Aspergillus flavipes* FP-500. 2009.
Ref Type: Thesis/Dissertation
94. Matssura, Y., Matsubara, K., and Fuchigami, M. (2000) Molecular composition of onion pectic acid. *Food Chemistry and Toxicology* *65*, 1160-1163.
95. McCleary, B.V. (1986) Enzymatic modification of plant polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules* *8*, 349-354.
96. McNeil, M., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1980) Structure of Plant Cell Walls: X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* *66*, 1128-1134.
97. Micheli, F. (2001) Pectin methylesterase: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* *6*, 414-419.
98. Mikami, S., Iwano, K., Shinoki, S., and Shimada, T. (1987) Purification and some properties of acid-stable α -amylases from shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *Agric.Biol.Chem.* *51*, 2495-2501.
99. Mikami, S., Karita, S., Iwano, K., Shinoki, S., and Shimada, T. (1988) Purification and some properties of hydrolases from shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *Nippon Nogeikgaku Kaishi* *62*, 867-874.
100. Mohnen, D. (1999). *Comprehensive natural products chemistry*, (Elsevier: Dordrech.The Netherlands).
101. Morris, E.R., Powell, D.A., Gidley, M.J., and Rees, D.A. (1982) Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *Journal of Molecular Biology* *155*, 507-516.

102. Moustacas, A.-M., Nari, J., Borel, M., Noat, G., and Ricard, J. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochemical Journal* 279, 351-354. 1991.

Ref Type: Journal (Full)

103. Mutter, M. New rhamnogalacturonan degrading enzymes from *Aspergillus aculeatus*. 1-141. 1997. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.

Ref Type: Thesis/Dissertation

104. Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Tomizuka, N. (2000) Amethylotrophic pathway participates in pectin utilization of *Candida boidinii*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4253-4257.
105. Nakamura, T., Hours, R.A., and Sakai, T. (1995) Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science* 60, 468-472.
106. Nari, J., Noat, G., Diamantidis, G., Wouddstra, M., and Ricard, J. (1986) Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur.J.Biochem.* 155, 199-202.
107. Nari, J., Noat, G., and Ricard, J. (1991) Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell-wall pectin methylesterase. *Biochem.J.* 279, 343-350.
108. Nomachi, W., Urago, K.I., Oka, T., Ekino, K., Matsuda, M., Goto, M., and Furukawa, K. (2002) Molecular breeding of *Aspergillus kawachii* overproducing cellulase and its application to brewing barley shochu. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93, 382-387.
109. Nunokawa, Y., Shiinoki, S., and Hirotsune, M. (1982) Production of mirin with use of shochu-*koji*. II Quality improvement of mirin. *Nippon JozoKyokai Zassi* 77, 123-125.
110. O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 294, 846-849.
111. O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu.Rev.Plant Biol.* 55, 109-139.
112. Obayashi, A., and Uchi, S. (1999). Manufacture of shochu from sweet potatoes, (: Tokyo. Japan).
113. Omori, T., Takeshima, N., and Shimoda, M. (1994) Formation of acid-labile α -amylase during barley-*koji* production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78, 27-30.
114. Parenicová, L., Benen, J.A.E., Kester, H.C.M., and Visser, J. (1988) *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry* 251, 72-80.

115. Parenicová, L. Pectinases of *Aspergillus niger*: A Molecular And Biochemical Characterisation. 2000. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.
Ref Type: Thesis/Dissertation
116. Pelloux, J., Rusterucci, C., and Mellerowicz, E.J. (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* 12, 267-277.
117. Phan, T.D., Bo, W., West, G., and Lycett, G.W. (2007) Silencing of the major salt-dependent isoform of pectinesterase in tomato alters fruit softening. *Plant Physiol.* 144, 1960-1967.
118. Pilnik, W., and Rombouts, F.M. (1981). Pectic enzymes. In: *Enzymes and Food Processing*. G.G.Birch, and N.a.P.K.J.Blakebrough, eds. (Applied Science Publishers Ltd.: London.), pp. 105-28.
119. Ralet, M.C., Bonnin, E., and Thibault, J.-F. (2002) Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography B* 753, 157-166.
120. Ralet, M.C., Dronnet, V., Buchholt, H.C., and Thibault, J.F. (2001) Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research* 336, 117-125.
121. Rättö, M., and Viikari, L. (1996). Pectinases in wood debarking. In: *Progress in Biotechnology. Pectins and Pectinases Proceedings of an International Symposium*. J.V.and, ed. (Elsevier), pp. 979-982.
122. Renard, C. Etude des polysaccharides parietaux de la pomme. Extraction at caracterization par des methodes chimiques et enzymatiques. 1989. Université de Nantes, France.
Ref Type: Thesis/Dissertation
123. Rexova-Benkova, L., and Markovic, O. (1976). Pectic enzymes. Academic Press, ed. (: New York), pp. 323-385.
124. Rha, E., Park, H.J., Kim, M.O., Chung, Y.R., Lee, C.W., and Kim, J.W. (2001) Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 201, 105-109.
125. Richard, L., Qin, L.X., Gadal, P., and Goldberg, R. (1994) Molecular characterization of a putative pectin methylesterase cDNA and its expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 355, 135-139.
126. Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929-967.
127. Rillo, L., Castaldo, D., Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., and Quagliuolo, L. (1992) Purification and properties of pectin methylesterase from mandarin orange fruit. *J.Agric.Food Chem.* 40, 591-593.

128. Rombouts, F.M., and Pilnik, W. (1980). Pectic enzymes, (Academic Press: New York).
129. Sakamoto, T., Bonnin, E., Quemener, B., and Thibault, J.F. (2002) Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572, 10-18.
130. Savary, B.J., Hotchkiss, A.T., and Cameron, R.G. (2002) Characterization of a salt-independent pectin methylesterase purified from Valencia orange peel . *J.Agric.Food Chem.* 50, 3553-3558.
131. Savary, B.J., Hotchkiss, A.T., Fishman, M.L., Cameron, R.G., and Shatters, R.G. (2003). Development of a valencia orange pectin methylesterase for generating novel pectin products. In: *Advance in Pectin and Pectinase Research*. A.G.J.Voragen, H.A.Schols, and R.Visser, eds. (Kluwer Academic), pp. 345-361.
132. Schols, H.A. Structural characterization of pectic hairy regions isolated from apple cell walls. 1-155. 1995. Wageningen Agricultural University.The Netherlands.
Ref Type: Thesis/Dissertation
133. Schols, H.A., Bakx, E.J., Schipper, D., and Voragen, A.G.J. (1995) A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research* 279, 265-279.
134. Schols, H.A., Posthumus, M.A., and Voragen, A.G.J. (1990) Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydrate Research* 206, 117-129.
135. Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (1994) Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research* 256, 83-95.
136. Scott-Craig, J.S., Cheng, Y.-Q., Cervone, F., DeLorenzo, G., Pitkin, J.W., and Walton, J.D. (1998) Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Appl.Env.Microbiol.* 64, 1497-1503.
137. Setoguchi, S., Takamine, K., Kamesawa, H., and Hamasaki, Y. (1993) Study on sweet potato koji. *Kagoshima-ken Kogyo Gijutsu Senta Kenkyu Hokoku* 7, 13-19.
138. Shen, Z., Manning, G., Reese, J., and Reeck, G.R. (1999) Pectin methylesterase from rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera:Curculionidae): Purification and characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 209-214.
139. Shen, Z.C., Pappan, K., Mutti, N.S., Denton, M., Zhang, Y., Kanost, M.R., Reese, J.C., and Reeck, G.R.J. (2005) Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. *J.Insect Sci.* 5.
140. Shimamura, K., Sasaki, T., and Sato, T. (2001). Manufacture of alcoholic beverages using fruit juice and white koji, (Kokai Tokkyo Koho: Japan).

141. Shivakumar, P.D., and Nand, K. (1995) Anaerobic degradation of pectin by mixed consortia and optimization of fermentation parameters for higher pectinase activity. *Lett.Appl.Microbiol.* *20*, 117-119.
142. So, M.-H., Lee, Y.-S., Han, S.-H., and Noh, W.-S. (1999) Analysis of major flavor compounds in Takju mash brewed with a modified Nuruk. *Han'guk Sikp'um Yongyang Hakhoechi* *12*, 421-426.
143. Sudo, S., Ishikawa, T., Sato, K., and Oba, T. (1994) Comparison of acid-stable α -amylase production by *Aspergillus kawachii* in *solid-state* and submerged cultures. *Journal of Fermentation and Bioengineering* *77*, 483-489.
144. Sun, D., and Wicker, L. (1999) Kinetic Compensation and the Role of Cations in Pectinesterase Catalysis. *J.Agric.Food Chem.* *47*, 1471-1475.
145. Talmadge, K.W., Keegstra, K., Bauer, W.D., and Albersheim, P. (1973) The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol.* *51*, 158-173.
146. Teramoto, Y., Saigusa, N., Yoshida, Y., and Ueda, S. (1994) Production and characteristics of red rice sake. *J.Inst.Brew.* *100*, 3-6.
147. Thibault, J.F., Renard, C.M.G.C., Axelos, M.A.V., Roger, P., and Crepeau, M.J. (1993) Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid-hydrolysis. *Carbohydrate Research* *238*, 271-286.
148. Thibault, J.-F., and Ralet, M.-C. (2003). Physico-chemical properties of pectins in the cell walls and after extraction. In: *Pectin and Pectinase Research*. A.G.J.Voragen, H.A.Schols, and J.Visser, eds. (Kluwer Academic), pp. 91-105.
149. Toyama, H., and Toyama, N. (1997) Isolation of acid hyper-producing strains from hyperpolyploids of *Aspergillus kawachii* . *Microbios* *90*, 23-32.
150. Trevisan, G.L., Oliveira, E.H.D., Peres, N.T.A., Cruz, A.H.S., Martinez-Rossi, N.M., and Rossi, A. (2011) Transcription of *Aspergillus nidulans* *pacC* is modulated by alternative RNA splicing of *palB*. *FEBS Letters* *585*, 3442-3445.
151. van Alebeek, G.-J., van Scherpenzeel, K., Beldman, G., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2003) Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. *Biochem.J.* *372*, 211-218.
152. Van Buren, J. (1979) The chemistry of texture in fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies* *10*, 1-23.
153. Van de Vis, J.W. Characterization and mode of action of enzymes degrading galactan structures of arabinogalactans. 1994. Wageningen University, Wageningen, Netherlands, 1994.

Ref Type: Thesis/Dissertation

154. Versteeg, C. Pectinesterases from the orangefruit - their purification, general characteristics and juice cloud destabilizing properties. 1979. Wageningen Agricultural University.

Ref Type: Thesis/Dissertation

155. Vidhyasekaran, P. (1997). Fungal pathogenesis in plants and crops. Molecular biology and host defense mechanisms, (INC : New York).
156. Vlugt-Bergmans, C.J.B., Meeuwssen, P.J.A., Voragen, A.G.J., and Ooyen, A.J.J.V. (2000) Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. Applied Environmental Microbiology 66, 36-41.
157. Voragen, A.G., and Pilnik W. (1989) Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. Biocatalysis in Agricultural Biotechnology 93-115.
158. Voragen, A.G.J., Beldman, G., and Schols, H. (2001). Chemistry and enzymology of pectins. In: Advanced Dietary Fiber Technology. B.V.McCleary, and L.rosky, eds. (Blackwell Publishing.: Oxford), pp. 19-23.
159. Waldron, K.W., Parker, M.L., and Smith, A.C. (2003) Plant cell walls and food quality. Compr.Rev.Food Sci.Food Saf. 2, 101-109.
160. Warren, M.E., Kester, H., Benen, J., Colangelo, J., Visser, J., Bergmann, C., and Orlando, R. (2002) Studies on the glycosylation of wild-type and mutant forms of *Aspergillus niger* pectin methylesterase. Carbohydrate Research 337, 803-812.
161. Warrilow, A.G.S., Turner, R., and Jones, M.G. (1994) A novel form of pectinesterase in tomato. Phytochemistry 35, 863-868.
162. Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., and Knox, J.P. (2001a) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. Plant.Mol.Biol. 47, 9-27.
163. Willats, W.G.T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., and van Alebeek, G.J.W. (2001b) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. J.Biol.Chem. 276, 19404-19413.
164. Wong, D.W.S. (1995). Pectic Enzymes. In: Food Enzymes. Structure and Mechanism. D.W.S.Wong, ed. (Capman & Hall: Mexico), pp. 212-236.
165. Wubben, J.P., Have, A.T., van Kan, J.A.L., and Visser, J. (2000) Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea*; by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. Current Genetics 37, 152-157.
166. Yagi, F., Fan, J., Tadera, K., and Kobayashi, A. (1986) Purification and characterization of carboxyl proteinase from *Aspergillus kawachii*. Agric.Biol.Chem. 50, 1029-1033.
167. Yamada, H. (1994) Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. Carbohydrate Polymers 25, 269-276.

168. Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M., and Mikami, S. (2011) Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112, 233-237.
169. Yu, L., and Mort, A.J. (1996). *Pectins and pectinases*, (Elsevier Science B.V.: Amsterdam).
170. Zandleven, J., Sorensen, S.O., Harholt, J., Beldman, G., Schols, H.A., Scheller, H.V., and Voragen, A.G.J. (2007) Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 68, 1219-1226.
171. Zhang, W., and Yang, R. (2001) Application of engineering-strain in preparation of acetic acid beverage with orange juice. *Zhongguo Niangzao* 3, 22-26.

Capítulo 2

Enzimas pécticas de *Aspergillus kawachii*

2.1 Resumen

Se llevó a cabo el screening de las pectinasas extracelulares producidas por *A. kawachii* en cultivos líquidos con diferentes FCE. El hongo se cultivó en medios conteniendo triptona como FN, sales y pectina cítrica o pomaza de limón. La pomaza contiene básicamente polisacáridos de la pared celular vegetal, tales como celulosa, hemicelulosa y pectina. La mayoría de las pectinasas fúngicas son inducibles por componentes de la pared celular vegetal. Como referencia se empleó el medio con glucosa para analizar la expresión constitutiva de las enzimas. Se utilizaron sustratos específicos para detectar la presencia de enzimas que degradan tanto el esqueleto principal como las ramificaciones de la pectina y procesos cromatográficos para separar y caracterizar parcialmente las enzimas detectadas. Las actividades enzimáticas se determinaron tanto a pH 5,0 como a pH 2,0 para evaluar la presencia de enzimas acidofílicas.

Los resultados obtenidos mostraron que este hongo produce al menos una de las siguientes enzimas inducibles: PGasa ácida, pectinliasa, pectinmetilesterasa, α -L-arabinofuranosidasa, α -1,5-endoarabinasa, β -D-galactosidasa/exogalactanasa y β -1,4-endogalactanasa. También se detectó la presencia de α -L-ramnosidasa y β -D-fucosidasa, en particular en los medios con pomaza de limón. Se confirmó la ausencia de actividad ramnogalacturonasa en los cultivos. La mayoría de las pectinasas testeadas fueron activas a pH: 2,0-2,5, indicando que las enzimas de *A. kawachii* son acidofílicas. El fenómeno de inducción-represión de la producción de pectinasas de *A. kawachii* sería semejante al descrito en otras especies de *Aspergillus*.

2.2 Introducción

El hongo filamentoso *Aspergillus kawachii* es ampliamente utilizado en las industrias alimenticias de Japón y de Corea, para la preparación de iniciadores de la fermentación, i.e. koji y nuruk, los cuales son utilizados en la elaboración de sake y de makgeoli, respectivamente, ambas bebidas alcohólicas tradicionales (Lee, 1999; Kitamot, 2002). Durante la fermentación el hongo libera enzimas extracelulares que sacarifican y disuelven el sustrato

(arroz, cebada, batata). Paralelamente, el hongo produce cantidades importantes de ácidos orgánicos, particularmente cítrico, por lo que el pH del medio baja llegando a valores muy bajos (pH cercano a 2). Por ello, las enzimas extracelulares liberadas deben ser ácido-estables y activas para ejercer su acción de modo conveniente.

Hasta el presente, las hidrolasas extracelulares mejor caracterizadas de *A. kawachii* son las proteinasas, celulasas, xilanasas y amilasas (Iwano et al., 1986; Yagi et al., 1986; Mikami et al., 1987; Ito et al., 1992b; Iwashita et al., 1998; Nagamine et al., 2003). Exceptuando las poligalacturonasas (PGasas) (Hayashi, 1958; Kojima et al., 1999; Contreras Esquivel and Voget, 2004; Voget et al., 2006), existe muy poca información de las demás enzimas de *A. kawachii* que degradan pectina (enzimas pectolíticas, pectinasas). Así, la caracterización de las pectinasas de este hongo puede ayudar a elucidar el proceso de maceración y fermentación el grano usado para preparar bebidas fermentadas y permitir el descubrimiento de novedosas enzimas acidofílicas.

Estas razones motivaron la realización de un screening de las pectinasas, que degradan tanto la cadena principal como las ramificaciones de la pectina, en filtrados de cultivos de este hongo. Las pectinasas, constituyen un heterogéneo y complejo sistema catalítico, hecho que es consistente con la complejidad estructural de los sustratos sobre los que actúan (pectina). Actualmente existe un renovado interés por estas enzimas en diferentes áreas, como consecuencia del avance del conocimiento de la estructura fina de las pectinas y del aislamiento de nuevas pectinasas. *Aspergillus kawachii* se caracteriza por su capacidad de crecer en medios fuertemente ácidos y liberar al medio de cultivo varias hidrolasas activas a pHs más ácidos que enzimas similares producidas por otras especies. Con excepción de algunos reportes sobre actividad poligalacturonásica, el sistema pectinolítico de este microorganismo resta aún por ser caracterizado.

En este capítulo se complementó el screening previamente realizado en nuestro laboratorio por el Dr. Juan C. Contreras Esquivel (Contreras Esquivel, 2003a). Para ello se realizaron diferentes cultivos de *A. kawachii* utilizando tanto pectina como pomaza de limón como FCE y como potenciales inductores de las enzimas degradadoras la pared celular (de Vries and Visser, 2001), y glucosa como medio de referencia para testear la posible producción constitutiva de pectinasas (Contreras Esquivel and Voget, 2004). Además, se realizaron las determinaciones de las actividades enzimáticas no sólo a pH 5,0 sino también a pH 2,0. Finalmente, se llevaron a cabo varios procesos cromatográficos para separar y posteriormente caracterizar parcialmente diferentes actividades enzimáticas.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Reactivos y soluciones

Glucosa (Glu), ácido galacturónico (AGA), arabinosa (Ara), galactosa (Gal), ácido poligalacturónico (APG; sal sódica, 90 % de AGA anhidro), pectina cítrica (Pec; 85 % de AGA anhidro, GM: 53 %), carboximetilcelulosa (CMC; sal sódica), xilano de madera de haya, arabinogalactano de madera de alerce (AG), *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranósido (*pnp*-Ara), *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosido (*pnp*-Fuc), *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*pnp*-Glu), *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), *p*-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (*pnp*-Ram) y *m*-hidroxidifenilo (mhdf) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA). Ramnogalacturonano de soja (RG), arabinano de remolacha y galactano de papa fueron obtenidos de Megazyme (Irlanda). Se utilizó pomaza de limón (PL) de Citrinor (Tucumán, Argentina) libre de semillas, triturada mecánicamente con un procesador de alimentos y tamizada, empleando la fracción 80 + / 100 -. La composición de PL fue la siguiente (% p/p en base húmeda): agua 8,2, AGA 29, azúcares neutros 36 (Glu 50 %, Ara 20,5 %, Gal 14,0 %, Xil 7,0 %, Ram 1,7 % y fucosa 0,8 %) y proteínas 6,7.

Para la determinación de la actividad PE se utilizaron 2,4-pentanodiona y alcohol oxidasa de *Pichia pastoris*, ambos de Sigma.

Los buffers utilizados fueron: citrato-fosfato (BCP), cuya composición fue la siguiente: ácido cítrico 50 mM, fosfato disódico 25 mM y acetato de sodio (BACNa) 20 ó 50 mM. Los pH de los buffers se ajustaron con NaOH o HCl.

El agar papa-dextrosa (APD) fue de Merck y la triptona de Difco. Los productos enzimáticos Olivex® (Novozyme, Dinamarca) y FP Super® (Gist Brocades) se utilizaron como control de diversas actividades enzimáticas. El producto comercial Olivex, una mezcla no caracterizada de diferentes enzimas degradadoras de pared celular vegetal, se utilizó como control positivo de la actividad ramnogalacturonasa. Este producto enzimático se desaló mediante una columna PD-10 equilibrada con BACNa 20 mM, pH 5,0.

2.3.2 Microorganismo utilizado, condiciones de cultivo y procesamiento de las muestras

La cepa fúngica de *Aspergillus kawachii* IFO 4308, fue proporcionado por el Profesor Takuo Sakai de la Universidad Prefectural de Osaka, Japón. Los esporos liofilizados se resuspendieron en Tween 80 al 0,01 % (p/v), se propagaron a 30°C en tubos con medio APD, y finalmente se mantuvieron bajo vaselina a 4°C (medio stock). Con el medio stock se inocularon erlenmeyers de 125 ml conteniendo 20-25 ml de APD y luego de esporular se

conservaron en la heladera por un período no mayor a un mes. Cuando fue necesario los esporos se resuspendieron con Tween 80 al 0,01 % (p/v) y se contaron en cámara de Neubauer. Esta suspensión de esporos se utilizó para inocular el medio líquido.

Para la fermentación líquida (Contreras Esquivel and Voget, 2004) se utilizaron erlenmeyers de 500 ó 1000 ml con 50 ó 100 ml de medio de cultivo respectivamente. La composición del medio fue la siguiente (g/l): FCE (Glu, Pec o PL) 10,0; triptona 5,0; K_2HPO_4 , 1,0; KCl, 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01. El K_2HPO_4 y la FCE se esterilizaron separados de la triptona y de las sales mediante autoclavado (15 min, 121°C). Los medios integrados se inocularon de manera tal de obtener una concentración de 10^6 esporos/ml. Los cultivos se llevaron a cabo a 30°C y 200 rpm en agitador rotatorio (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA).

A diferentes tiempos de cultivo, se tomó el contenido de los distintos erlenmeyers, se midió el volumen total y el pH. Posteriormente se ajustó a pH 5,0 con HCl o con NaOH 1 N, según corresponda, con el fin de estandarizar las condiciones de la filtración con respecto al pH (en experiencias previas se había demostrado que existen procesos de adsorción diferencial de las enzimas al papel de filtro). Los insolubles remanentes del cultivo (micelio e insolubles del medio) se separaron por filtración a través de papel de celulosa (Whatman # 40). Los insolubles se lavaron con agua destilada y se secaron en estufa a 60°C hasta peso constante. El filtrado a pH 5,0 se fraccionó, congeló a -70°C y posteriormente se liofilizó para ser conservado en heladera hasta su utilización. Los liofilizados se resuspendieron en una concentración $10 \times$ respecto del cultivo original con agua destilada. Luego de 10 min, se centrifugaron a 10.000 g, durante 5 min y el sobrenadante se filtró por membrana de acetato de celulosa ($\varnothing = 47$ mm; tamaño de poro nominal: 0,45 μ m, Osmonics). Posteriormente, el filtrado se desaló mediante una columna PD-10 equilibrada con BAcNa (20 mM, pH 5,0). El eluido se conservó en la heladera a 4°C por un período máximo de 5 días y se utilizó para realizar el screening de las actividades enzimáticas.

2.3.3 Actividades enzimáticas

Actividad sobre sustratos poliméricos: las actividades de poligalacturonasa (PGasa), carboximetilcelulasa (CMCasa), xilanasas, ramnogalacturonasa (RGasa), arabinasa (ARAasa), galactanasas (GALasa) y arabinogalactanasas (AGasa) se determinaron con sus respectivos sustratos (APG, CMC, xilano, RG, arabinano, galactano y AG, respectivamente) por incremento de poder reductor mediante la técnica de Somogyi-Nelson (Herber et al., 1971).

La reacción se llevó a cabo incubando 180 μl de sustrato (0,5 % para PGasa, CMCasa, xilanasa y 0,2 % para el resto de las actividades, en BCP, pH 2,0 ó 5,0) con 20 μl de muestra durante 0,5 a 8 h. La reacción se detuvo colocando las mezclas de reacción en un baño agua/hielo, agregando en forma inmediata el reactivo de Somogyi para luego proseguir con la técnica. Simultáneamente se incubó un blanco de sustrato donde se sustituyó la enzima por el buffer empleado y un blanco de muestra con la enzima inactivada térmicamente (10 min, 100°C en buffer). Para la preparación de galactano y arabinano, los sustratos se llevaron a temperaturas de 50°C y 60°C, respectivamente, para lograr su completa disolución. Según el sustrato empleado se utilizó Gal, Ara o AGA como patrón para la curva de calibración al respectivo pH de reacción.

Actividad RGasa en gel: la determinación de la actividad RGasa se evaluó también por un test cualitativo en gel de agarosa conteniendo RG. Se preparó una mezcla de agarosa y RG (1,0 % y 0,2 % p/v, concentración final, respectivamente) en BAcNa (50 mM, pH 4,5). La mezcla fundida se vertió en caja de Petri. Luego de la formación y consolidación del gel se realizaron orificios circulares ($\varnothing = 3$ mm) con sacabocados donde se sembró 5 μl de muestra enzimática. Las placas se incubaron a 37°C durante 6 h, luego de lo cual se lavaron 2 veces con agua y finalmente se cubrieron con rojo rutenio al 0,05 % (p/v) en agua para finalmente incubarlas por 10 min. Posteriormente, se eliminó la solución remanente y se lavó con agua destilada. La presencia de actividad enzimática positiva se observó mediante la aparición de halos incoloros en el gel rojo.

Actividad liasa: las actividades de pectinliasa (PeL) y de pectatoliasa se ensayaron por incremento de absorbancia a 235 nm ($\epsilon_{235} = 4600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) con Pec (GM 53) o APG al 0,5 % (p/v) en BCP al pH indicado respectivamente (Albersheim, 1966). Para la actividad PL se agregó CaCl_2 (1 mM) a la mezcla de reacción. Antes de ser utilizados los sustratos se filtraron a través de membrana de fibra de vidrio para eliminar cualquier insoluble que interfiriera en la determinación espectrofotométrica. La reacción se llevó a cabo incubando 500 μl de sustrato con 10 μl de muestra. La absorbancia se registró continuamente cada 8 s durante 20 min en un equipo Beckman DU 640. Se calculó la actividad convirtiendo el valor de la pendiente inicial (suministrada por el equipo en unidades de absorbancia) a concentración de productos insaturados.

Actividad pectin metilesterasa (PE): se midió el metanol liberado por el método de la alcohol oxidasa (Klavons and Bennett, 1986). La reacción se llevó a cabo mezclando 190 μl de pectina cítrica (GM 53) al 0,5 % en BCP al pH deseado y 10 μl de enzima. Luego de

incubar el tiempo preestablecido, el pH de la mezcla de reacción se llevó a pH 7,0 con Tris-HCl, pH 9,0. Seguidamente el metanol se oxidó a formaldehído mediante el agregado de 300 μ l de alcohol oxidasa (0,66 U/ml previamente diluida en agua destilada) e incubación (25°C, 20 min). Finalmente se agregaron 500 μ l de una solución conteniendo 2,4-pentanodiona y acetato de amonio que reaccionan con el formaldehído para formar un cromógeno amarillo que absorbe a 412 nm.

Glicosidasas: α -L-arabinofuranosidasa (ARFasa), β -D-fucosidasa, β -D-glucosidasa, α -L-ramnosidasa (α -Ram), β -D-xilosidasa y β -D-galactosidasa (β -gal) se determinaron por medida del *o*-nitrofenol o del *p*-nitrofenol liberado. La reacción se efectuó incubando 200 μ l de solución de sustrato (1 mM de *pnp*- u *onp*-glicósido en BCP al $\frac{1}{2}$, al pH indicado) con 10 μ l de muestra durante 15 a 120 min. La reacción se detuvo con el agregado de 400 μ l de Na₂CO₃ 0,4 M. La hidrólisis de los respectivos sustratos se calculó de la cantidad liberada de *p*-nitrofenol ($\epsilon_{405} = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el *o*-nitrofenol ($\epsilon_{420} = 4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Todas las actividades se realizaron por duplicado a 37°C. Una unidad de actividad enzimática se definió como la producción de un μ mol de grupos reductores, metanol o *p(o)*-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo.

El efecto del pH sobre las diferentes actividades enzimáticas se determinó utilizando el sustrato correspondiente en BCP en el rango de pH de 2,0 a 6,0 a 37°C.

2.3.4 Técnicas bioquímicas

Cromatografía de intercambio aniónico (CIA): la cromatografía de intercambio aniónico de las diferentes actividades enzimáticas ensayadas se realizó utilizando una columna de Sepharose Q equilibrada con BAcNa (20 mM, pH 5,0). Luego de la aplicación de la muestra (0,2-0,3 ml), la columna se lavó con 5 volúmenes de buffer de equilibrio y luego se eluyó con un gradiente de NaCl (0 a 0,5 M en BAcNa, 20 mM, pH 5,0). Las fracciones colectadas fueron de 1 ml.

Degradación enzimática del RG y arabinano: la hidrólisis de RG y arabinano se analizó cualitativamente por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), en un cromatógrafo Waters HPLC (Milford, MA, USA) equipado con una columna para carbohidratos Shodex SC1011 (6,5 \times 300 mm, Shoco Co. Ltd., Tokio, Japón). Se aplicó 20 μ l de las muestras a analizar en la columna acoplada a un detector de índice de refracción (RID 2414). La elución se llevó a cabo con agua grado HPLC a 80°C a un flujo de 0,8-1,0 ml/min.

Se utilizaron los monosacáridos correspondientes como patrones para analizar los productos de degradación.

Degradación de galactanos: los productos de la hidrólisis se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF). Se sembraron 15 µl de patrones o muestras en placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Damstadt, Germany). La cromatografía se desarrolló mediante la técnica ascendente empleando como solvente: n-butanol: ácido acético: agua (6:4:3, v:v:v). Se practicaron 4 ascensos del solvente, secando la placa luego de cada ascenso. Luego de evaporar los solventes, la detección de los productos de reacción se realizó por pulverización sobre la placa con una solución de ácido fosfomolibdico al 3 % (p/v) disuelto en una solución de ácido sulfúrico al 10 % en etanol. Para desarrollar el cromatograma, las placas fueron calentadas por 5 min a 105°C. Las fotografías se tomaron de forma inmediata ya que el color disminuye en el tiempo hasta desaparecer. Como patrones se utilizaron galactano y Gal.

Otras determinaciones: la determinación de glucosa se llevó a cabo por el método enzimático glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener, Argentina). La determinación de AGA se realizó por la técnica de ácido sulfúrico-mhdf (Blumenkrantz and Asboe-Hansen G., 1973). Los carbohidratos totales en los cultivos conteniendo PL se determinaron por la técnica del fenol-sulfúrico utilizando glucosa como estándar (Dubois et al., 1956).

La determinación de glucosamina en los restos insolubles del medio conteniendo PL se realizó mediante el método descrito por Ride (Ride and Drysdale R.B., 1972). El crecimiento del micelio se calculó mediante la relación entre el contenido de glucosamina y el peso de la biomasa seca. El micelio colectado a 30 h del medio con glucosa se empleó como referencia, encontrándose un valor de ~ 30 mg de glucosamina por g de micelio seco.

La determinación del PM de la PeL se llevó a cabo mediante SDS-PAGE (Mighty Small II, Hoefer SE 260) de acuerdo a las condiciones de corrida descriptas por Smith (Smith, 1984). La tinción de las bandas se realizó con Azul brillante de Coomassie R250 (Anedra). Para la determinación del PM se utilizaron patrones de bajo PM en el rango de 14,4 a 94,0 kDa (Sigma Chemicals).

Los ensayos de viscosidad fueron realizados en un viscosímetro Canon-Fenske (Ostwald modificado, IVA) con 7 ml de mezcla de reacción. Los cambios en la viscosidad del sustrato fueron expresados como valores relativos. De este modo, la viscosidad relativa (VR), expresada como porcentaje, se calcula con la siguiente fórmula:

$$VR (\%) = (t_s - t_b) / t_{so} - t_b \times 100$$

donde: t_{s0} y t_s son los tiempos de flujos del sustrato a tiempo cero y a cualquier tiempo de reacción, respectivamente. El t_b es el tiempo de flujo del buffer. El tiempo de reacción fue tomado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t_r = t_0 + \frac{1}{2} t_f$$

donde t_r = tiempo de reacción y t_0 = tiempo de reacción en el momento que el menisco pasa por la marca superior del viscosímetro, y t_f = tiempo total del flujo.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Crecimiento de *A. kawachii* en medios que contienen pectina

En la Fig. 2.1 se muestra la evolución de los cultivos en frascos en medios conteniendo Pec y PL como FCE. El hongo metabolizó completamente Pec como lo revela el agotamiento de los niveles de AGA a las 36 h de cultivo. Similarmente, en el medio PL se observó un agotamiento de los azúcares neutros solubles y del AGA a las 30 h de cultivo. Debe de tenerse en cuenta que la medida del AGA con el método del fenol-sulfúrico resulta en una respuesta del 62 % respecto a la de la glucosa utilizada como estándar. Por lo tanto, un valor más real de los carbohidratos totales iniciales, incluyendo azúcares neutros y ácidos, en el medio PL es 5,0 g/l, de los cuales un 50 % corresponden al AGA. En el medio Pec el pH disminuyó ligeramente durante la fase exponencial de crecimiento y se incrementó bruscamente cuando aún restaba por consumirse un 15-20 % de la FCE. El aumento del pH coincide con el comienzo de la fase estacionaria, aunque se puede observar un crecimiento marginal en esta etapa final del cultivo durante la cual se termina por consumir todo el AGA. En el medio PL los cambios de pH siguieron un patrón similar pero en un tiempo menor del cultivo (15-20 h) debido a que el contenido de pectina es mucho menor comparado con el medio Pec. La entrada a la fase estacionaria es poco evidente, probablemente porque el contenido de glucosamina del micelio utilizado como indicador de crecimiento no es constante sino que varía con el estado fisiológico del hongo. Como es sabido los hongos pueden producir órganos de fructificación y conidios en cultivos sumergidos. De este modo, es probable que ocurra un incremento del contenido de glucosamina (por g de materia seca) cuando comienza la esporulación, fenómeno este asociado a una disminución del crecimiento vegetativo del hongo, reflejando una aparente prologación de la fase exponencial.

Los cultivos en el medio Glu se realizaron con el fin de analizar la expresión constitutiva de las pectinasas, como fuera descrito anteriormente (Contreras Esquivel, 2003a). En nuestro caso se obtuvieron resultados similares. En todos los medios el

crecimiento fúngico fue en forma de pellets, alcanzándose a las 30 h (final de la fase activa de crecimiento) una concentración de biomasa de 7,5; 4,2 y 2,9 g biomasa seca/l y valores de pH de 2,8; 4,2 y 6,7 en los medios Glu, Pec y PL, respectivamente. El rendimiento celular en base al consumo de carbohidratos se encontró en un rango de 0,40-0,60 g/g. Estos valores en realidad están sobreestimados ya que la triptona también aporta C para el crecimiento en forma de aminoácidos.

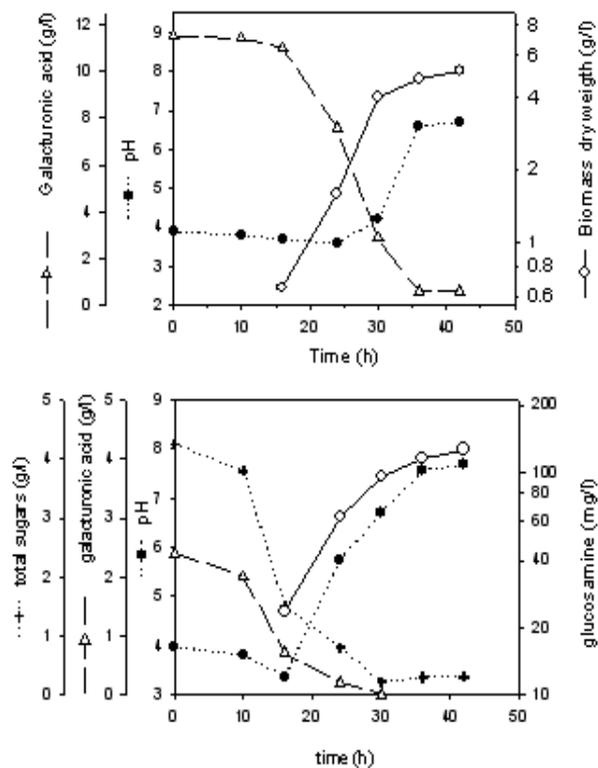


Figura 2.1 Crecimiento de *A. kawachii* en frascos agitados con pectina cítrica (gráfico superior) y pomaza de limón (gráfico inferior).

2.4.2 Screening de pectinasas

Los resultados anteriores demuestran la capacidad de *A. kawachii* de metabolizar pectina y, por lo tanto, de producir enzimas que degradan esta fuente compleja de carbohidratos. Estos resultados motivaron la realización de un screening de actividades enzimáticas en los filtrados correspondientes a la fase final de crecimiento (~ 30 h) mediante ensayos realizados a pHs 5,0 y pH 2,0 a fin de detectar enzimas pectolíticas acidofílicas.

Se llevó a cabo la detección de dos clases de pectinasas. Por un lado, las que actúan sobre el esqueleto principal de la pectina, particularmente sobre el homogalacturonano (HG) o sobre el ramnogalacturonano I (RGI), y por el otro las enzimas desramificantes, conocidas

como enzimas accesorias, que desramifican las cadenas laterales del RGI y otros componentes ramificados. En todos los casos, la producción enzimática se normalizó expresándose en base a la biomasa fúngica correspondiente al tiempo de muestreo (actividad por biomasa, mU/g) en lugar de expresarse por unidad de volumen de medio de cultivo. De este modo, se puede resaltar el carácter inductivo de la fuente de carbono empleada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Actividades pectolíticas detectadas en cultivos de *A. kawachii* empleando diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	pH* ensayo	Actividad enzimática por biomasa (mU/g)									
		PGasa	PeL	PE	ARFasa	β -gal	β -fuc	α -Ram	AGasa	ARAasa	GALasa
Glucosa	2,0	3,7	0	0	0	-	0	0	1,4	0	0
	5,0	42,9	0	0	0	< 0,1	0	0	1,7	0	0
Pectina	5,0	154	2,6	-	13,3	13,5	0,65	< 0,1	5,2	-	-
Pomaza de limón	2,0	25,9	0	4,0	12	27	-	14	5,7	0,95	2,0
	5,0	380	13,4	11,5	41,1	42	3,0	36	7,1	7,3	13,8

El screening de las actividades enzimáticas se realizó en los filtrados de 30 h de cultivo. La actividad enzimática se expresa en mU/g de biomasa seca y es el valor medio de 3 cultivos independientes con un coeficiente de variación entre 10 y 15 %.

*pH al cual se midieron las actividades enzimáticas.

PGasa, poligalacturonasa; PeL, pectinliasa; PE, pectinesterasa; ARFasa, α -L-arabinofuranosidasa; β -gal, β -D-galactosidasa; β -fuc, β -D-fucosidasa; α -Ram, α -L-ramnosidasa; AGasa, arabinogalactanasa; ARAasa, arabinasa; GALasa, galactanasa.

0: no detectable en las condiciones de reacción empleadas; - no determinado.

En un trabajo previo (Contreras Esquivel and Voget, 2004), se demostró que *A. kawachii* produce PGasas en el medio Glu, es decir hay una expresión constitutiva de los genes que codifican estas enzimas. En dicho estudio, la única actividad pectinasa adicional detectada en este medio fue AGasa. El resto de las pectinasas sólo se detectó en los medios Pec y PL, lo cual sugiere que son inducidas por componentes específicos presentes en estos medios. No obstante, la actividad PGasa medida tanto a pH 2,0 (PGasa2) como a pH 5,0 (PGasa5), fue superior en estos medios en comparación con la actividad del medio Glu, por lo cual se concluye que probablemente se indujeron enzimas nuevas y/o se incrementó la síntesis de las PGasas constitutivas. Las pectinasas inducibles detectadas, ya sea en el medio Pec y/o en el PL, fueron las siguientes: PeL, PE, ARAasa, ARFasa, GALasa y β -gal, como también las actividades α -Ram y β -D-fucosidasa, estas últimas particularmente en el medio PL. La actividad ARFasa se encontró particularmente elevada respecto a las otras actividades

glicosídicas. La mayoría de las actividades enzimáticas fue positiva tanto a pH 2,0 como a pH 5,0, indicando la presencia de enzimas acidofílicas en el pool de pectinasas producido por *A. kawachii*. No se detectó actividad de pectatoliasa en ninguno de los medios ensayados. Lo mismo ocurrió con la actividad RGasa cuando esta se midió por aumento de poder reductor confirmando los resultados de estudios anteriores (Contreras Esquivel, 2003a).

La ausencia de actividad RGasa se verificó también por HPLC. Como control positivo de actividad RGasa se empleó el producto comercial Olivex. La incubación de RG al 0,2 % con una dilución 1:50 de Olivex por 1 h a pH 5,0 mostró un incremento del poder reductor equivalente a 180 mU/ml de RGasa. En el análisis por HPLC (Fig. 2.2) se observó que el sustrato sin degradar eluye como un único pico con un tiempo de retención (t_r) de ~ 5,12 min. En cambio, el cromatograma de la mezcla de reacción RG/Olivex presentó una fracción con un PM menor (t_r : 5,6 min) que representa el 30 % del total del área del pico. No se detectaron monosacáridos tales como ramnosa ni AGA. Este patrón de elución sugiere que el RG fue degradado por una actividad enzimática tipo endo. Por otro lado, el poder reductor de la solución de RG no aumentó luego de incubar 12 h el sustrato con los concentrados 10 × de los filtrados de los medios Pec y PeL. En consistencia con este resultado, los cromatogramas de ambas mezclas de reacción fueron equivalentes al blanco de sustrato. Por lo tanto, se concluyó que en las condiciones de cultivo empleadas *A. kawachii* no produce enzimas que degradan el RG.

Además de las pectinasas se demostró que *A. kawachii* produce en estos medios varias enzimas involucradas en la degradación de celulosa y hemicelulosa tales como CMCasa (92 mU/ml), xilanasa (106 mU/ml), β -D-xilosidasa (1,28 mU/ml) y β -D-glucosidasa (156 mU/ml). En conclusión, ninguna de estas enzimas ni tampoco las pectinasas testeadas degradan RG, así se confirma la especificidad de las enzimas que degradan el esqueleto del RGI y que han sido descritas en varios aspergilli (de Vries and Visser, 2001). Es interesante destacar que en cultivos en los cuales se utilizaron otros residuos agroindustriales como FCE (i.e. pulpa de remolacha, cáscara de mango u orujo de manzana en reemplazo de PL), también se encontraron las pectinasas descritas y ausencia de actividad RG. Actualmente se está investigando si *A. kawachii* produce RGasas en otras condiciones de cultivo o en fermentación en sustrato sólido.

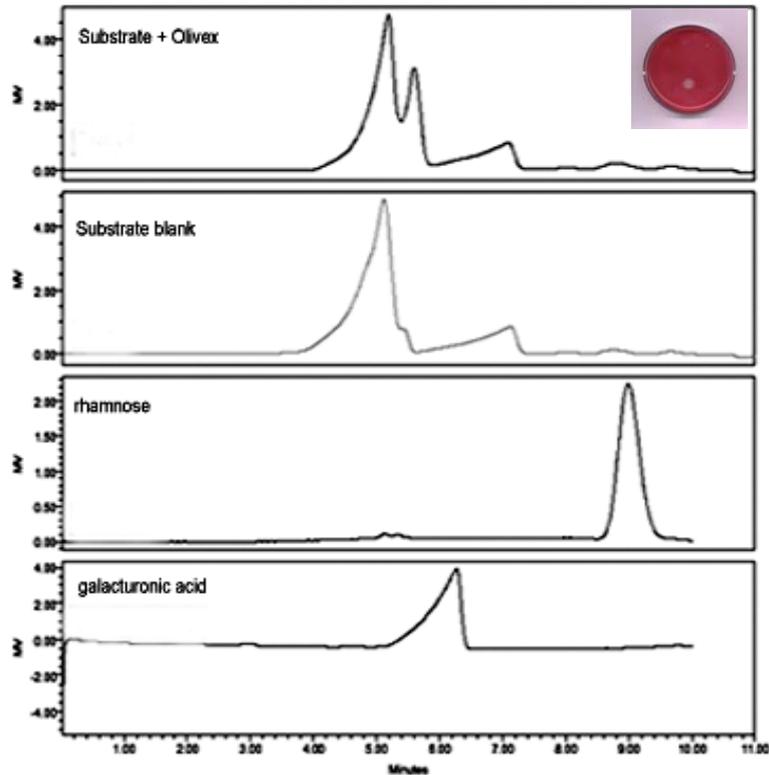


Figura 2.2 Degradación de RG con Olivex.

Se incubaron 950 μ l de RG al 0,2 % en AcB, pH 5,0 con 50 μ l de Olivex (dilución 1:50 en buffer) durante 1 h a 37°C. Luego de la inactivación enzimática por calor (5 min a 100°C) se aplicaron 20 μ l de la mezcla de reacción en la columna de carbohidratos Shodex SC1011 (6,5 \times 300 mm, Shoko Co., Ltd., Tokyo) acoplada a un detector de índice de refracción (RID 2414). Se llevó a cabo la elución con agua calidad HPLC a 80°C con una velocidad de 1,0 ml/min. El pico pequeño en el blanco de sustrato y en Olivex con un t_r de \sim 7,0 min corresponde al ión acetato.

Los resultados obtenidos indican que la síntesis de enzimas pectolíticas en *A. kawachii* depende de la FCE empleada, siendo en su mayoría inducidas en los medios con pectina y probablemente por otros componentes de la pared celular, puesto que el medio PL dio los niveles más altos de actividad por g de micelio. La necesidad de un inductor derivado de la pectina fue también verificada en cultivos donde se empleó glicerol como FCE; en este caso tampoco hubo expresión de pectinasas a excepción de las PGasas. El AGA, un inductor general de las enzimas pectolíticas de *A. niger*, podría desempeñar un rol semejante para las pectinasas de *A. kawachii* (de Vries and Visser, 2001), pero también otros componentes del medio PL podrían aumentar la expresión de los genes específicos. La composición química de la pectina cítrica puede resumirse básicamente en ácido galacturónico esterificado y algo de azúcares neutros. A su vez, la PL contiene pectina y otros componentes de la pared celular vegetal que se solubilizan durante el crecimiento del hongo y podrían ser los responsables del incremento en la producción de las pectinasas.

Por otra parte se conoce que la expresión de ciertos genes fúngicos es regulada por el pH del medio de cultivo. Investigadores japoneses sugirieron la presencia de un sistema de expresión regulado por pH para las PGasas de *A. kawachii* y lo mismo podría ocurrir para las otras pectinasas (Kojima et al., 1999). Los pHs de los medios Pec y PL difieren marcadamente al momento del muestreo, por lo cual la historia del pH de los cultivos podría ser un factor que afecte la composición del pool de pectinasas.

2.4.3 Caracterización parcial de las pectinasas

Los filtrados provenientes de los medios Glu y PL se aplicaron a una columna Resource Q equilibrada con BAcNa (20 mM, pH 5,0) y en las fracciones recolectadas se determinó la actividad de las actividades pectolíticas que habían sido detectadas en el screening previo. Los cromatogramas para las PGasas se muestran en la Fig. 2.3 y para las demás actividades en la Fig. 2.4.

Con excepción de las PGasas, los perfiles de elución fueron equivalentes cuando se midieron las actividades a pH 5,0 ó a pH 2,0. Por lo tanto, para las otras pectinasas sólo se muestran los resultados obtenidos a pH 5,0.

Poligalacturonasas

En el medio Glu, *A. kawachii* produce dos tipos de PGasas en función de su actividad relativa frente a APG a pH 5,0 y pH 2,0 (Contreras Esquivel and Voget, 2004; Voget et al., 2006). Uno de los tipos está constituido por las PGasas ácidas activas a pH 2,0 pero inactivas a pH 5,0 (actividad PGasa2) en tanto que el otro tipo lo forman las especies no ácidas con la especificidad inversa (actividad PGasa5). El cromatograma de las muestras del medio Glu y PL mostró el mismo perfil de elución, es decir los mismos picos para las actividades PGasa2 y PGasa5, lo que sugiere que en ambos medios se produjeron enzimas similares. Sin embargo, la distribución de la actividad PGasa2 entre los dos picos varió notablemente con la FCE. En el medio Glu el pico predominante de la actividad PGasa2 corresponde a PGasaI (> 95 % de la actividad total PGasa2). Esta enzima fue purificada y posteriormente clonada en levaduras (Rojas et al., 2011a). En el filtrado del medio PL, el pico principal de la actividad PGasa2 correspondió a una enzima diferente a PGasaI que se denominó PGasaI' (80 % del total de la actividad PGasa2) mientras que el pico menor se identificó con PGasaI. Esto último fue demostrado empleando tanto la enzima pura nativa como la recombinante, ya que ambas cuando se aplicaron puras eluyeron exactamente en la misma posición que eluyó el pico menor. Mas aún cuando se agregaron a los filtrados no apareció un pico diferente, es decir las

enzimas se comportan exactamente igual en relación a la cromatografía tanto en forma pura como en forma conjunta en la mezcla compleja del cultivo PL.

Con respecto a la actividad PGasa5, las actividades relativas de los dos picos no cambiaron con la FCE. Sin embargo, la interpretación del cromatograma no es tan clara como con la actividad PGasa2. Comparando el perfil de elución con resultados previos se puede inferir que el principal pico (> 95 % de la actividad PGasa5) presente en la fracción no retenida corresponde mayoritariamente a PGasaII. Esta PGasa no ácida tiene un valor de pI ligeramente > 5,0 y junto a la PGasaIII fueron purificadas del medio Glu mediante adsorción a columnas de intercambio catiónico (Sephacrose SP) a pH 5,0. El pI de PGasaIII no se determinó, pero de acuerdo a lo mencionado anteriormente debió eluir junto a la fracción no retenida. No obstante no se descarta que pueda ser el pico menor que se adsorbió a la Sepharose Q. Sin embargo este pico menor de actividad PGasa5 casi se solapa con PGasaI' (están ligeramente corridos) y por lo tanto podría ser que PGasaI' tenga cierta actividad a pH 5,0. Está en curso un trabajo de Tesis para purificar y clonar PGasaI' lo que permitirá elucidar esta situación. En caso de que PGasaI' sea activa tanto a pH 2,0 como a pH 5,0 la división entre PGasas ácidas y no ácidas basadas en su actividad relativa frente al pH deberá modificarse. Mas allá de los resultados, podemos concluir que el aumento de la actividad PGasa2 en el medio PL, en comparación con el medio Glu, puede ser atribuido principalmente a la inducción de PGasaI' (ver Tabla 1).

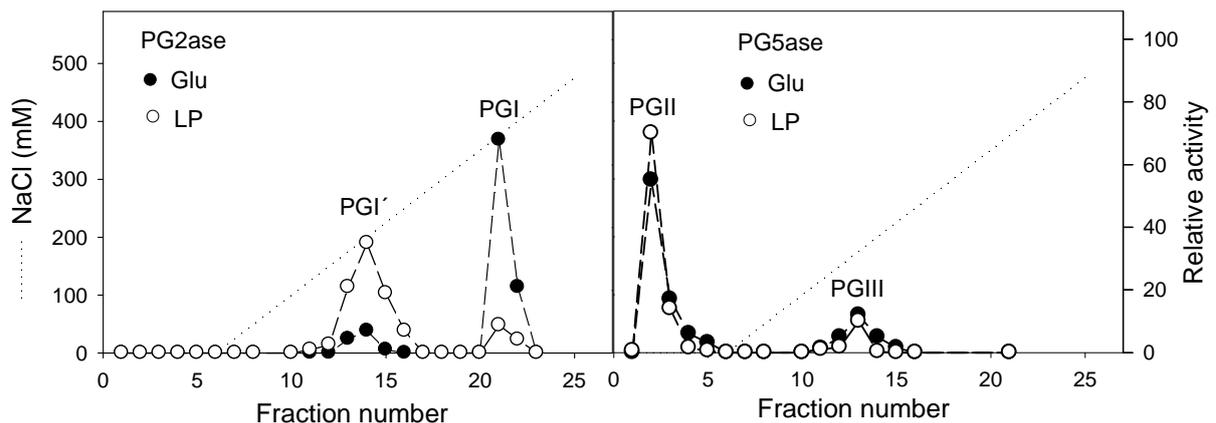


Figura 2.3 Perfil de elución de las actividades PGasa2 y PGasa5.

Muestra: 300 μ l de filtrado de cultivo ($10 \times$) de Glu o PL de 30 h. Columna: Resource-Q equilibrada con BAcNa (20 mM, pH 5,0). Luego de la aplicación de la muestra se lavó la columna con 5 volúmenes de BAcNa y luego se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 a 500 mM en BAcNa) a un flujo de 1,0 ml/min. Se colectaron fracciones de 1 ml. Ambas PGasas se midieron a pH 2,0 y 5,0. Las actividades de las fracciones se expresaron como un porcentaje del total de la PGasa2 o PGasa5 recuperada.

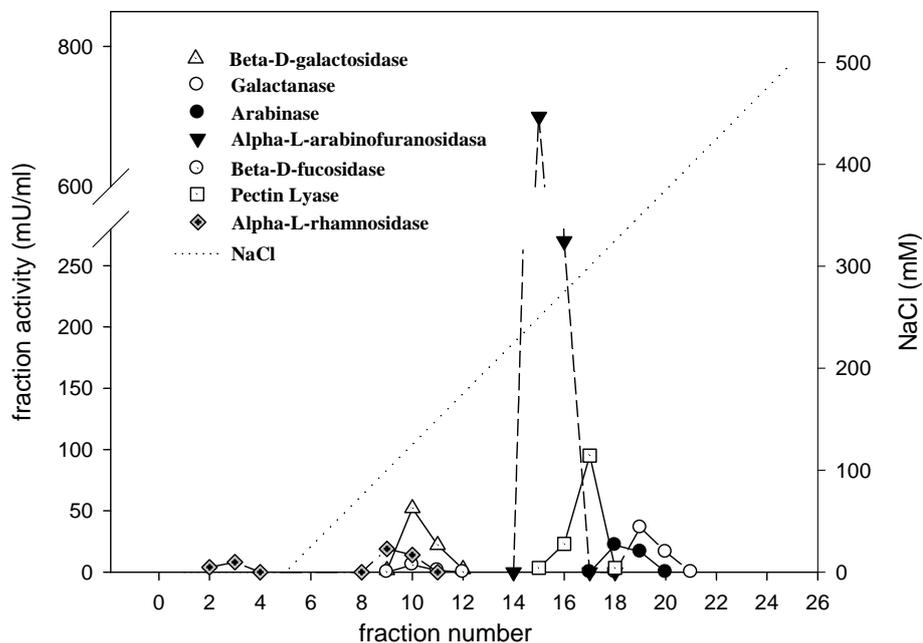


Figura 2.4 Perfil de elución de pectinasas de *A. kawachii* en Resource Q.

Muestra: 500 μ l de filtrado concentrado 10 \times del medio PL, a las 30 h de cultivo. Las condiciones cromatográficas fueron similares a las descritas en la Figura 2.3. Las actividades ARAasa y GALasa se determinaron por Somogyi-Nelson luego de incubar 950 μ l de sustrato (0,2 % ARA o GAL en BAcNa pH 5,0 con 50 μ l de las fracciones por 2 h a 37°C.

Pectinliasa

Se detectó solamente un pico con actividad de PeL a pH 5,0 en ambos medios. Utilizando la fracción 17 correspondiente al pico y mediante ensayos viscosimétricos con pectina cítrica GM 53 se demostró que esta actividad es del tipo endo. El pH óptimo con pectina cítrica como sustrato fue 5,0, con valores del 8 % y 23 % de actividad residual a pHs 2,5 y 5,5, respectivamente. Resulta interesante resaltar la abrupta caída en la actividad a pHs superiores a 5,0, con valores prácticamente no detectables a pH 6,0. Por el contrario, la disminución de la actividad a valores de pHs inferiores al óptimo es mucho más gradual. El PM determinado por SDS-PAGE resultó ser 75 kDa, valor este substancialmente superior al reportado para la mayoría de las PeL fúngicas (Yadav et al., 2009). En este sentido, la posibilidad de que se trate de un dímero no debiera ser descartada. Esta es la primera descripción de la actividad de PeL producida por *A. kawachii*, como consta en la publicación (Vita et al., 2009) que se anexa a la presente Tesis.

Pectinesterasa

Con respecto a la actividad PE, se observó un único pico (fracciones 10-12, no mostradas) cuya fracción media sin actividad PGasa mostró un pH óptimo frente a pectina cítrica GE 53 de 4,5. Una observación muy interesante fue que la actividad PE retuvo el 25 % de la actividad máxima a pH 2,0, propiedad esta que la diferencia de otras PEs fúngicas y que le podría significar una potencial aplicación en la clarificación de jugo de limón. Esta característica motivó la realización de estudios más profundos sobre la PE de *A. kawachii*, particularmente su producción, caracterización y uso, los cuales se encuentran descritos en los Capítulos 3 y 4 de esta tesis.

Arabinasas y Arabinofuranosidasa

A. kawachii produjo al menos 2 enzimas capaces de hidrolizar los enlaces α -L-arabinosil (Fig. 2.4) ya que las actividades ARAasa y ARFasa eluyeron en dos picos separados. El pico con actividad ARFasa no mostró actividad ARAsa incluso después de incubar esta fracción con arabano por un tiempo de 8 h. Por lo tanto, una actividad tipo exo de la ARFasa sobre este sustrato podría ser descartada al menos teóricamente. Las múltiples formas de ARFasa detectadas en los cultivos de diversos hongos difieren en su especificidad de sustrato (Saha, 2000). Koseki y colaboradores (Koseki et al., 2003) purificaron dos ARFasas (AkAbfA y AkAbfB) de cultivos de *A. kawachii* sobre salvado de trigo, utilizando condiciones cromatográficas similares a las empleadas aquí. El pH óptimo de las dos enzimas con *pnp*-Ara fue de 4,0 (el pH óptimo para la actividad ARFasa del cultivo en PL con el mismo sustrato, fue 3,5-4,0). AkAbfA y AkAbfB actúan sinérgicamente con la xilanasas en la degradación de arabinosilano. El rol exacto de la ARFasa inducida en el medio PL con respecto a la degradación tanto de pectina como xilano y la relación de esta ARFasa a las AkAbfA y AkAbfB aún debe ser establecido.

Por otro lado, el análisis mediante HPLC de los productos de hidrólisis obtenidos luego de la incubación del arabano tanto con el pool crudo de enzimas por un lado y con la fracción correspondiente al pico con actividad ARAasa por el otro (Fig. 2.5) mostró una degradación del sustrato hacia productos de menor PM y ausencia de arabinosa (t_r : 12,25 min). Este patrón de hidrólisis sugiere la presencia en esta fracción de una α -1,5-endo ARAasa (de Vries and Visser, 2001).

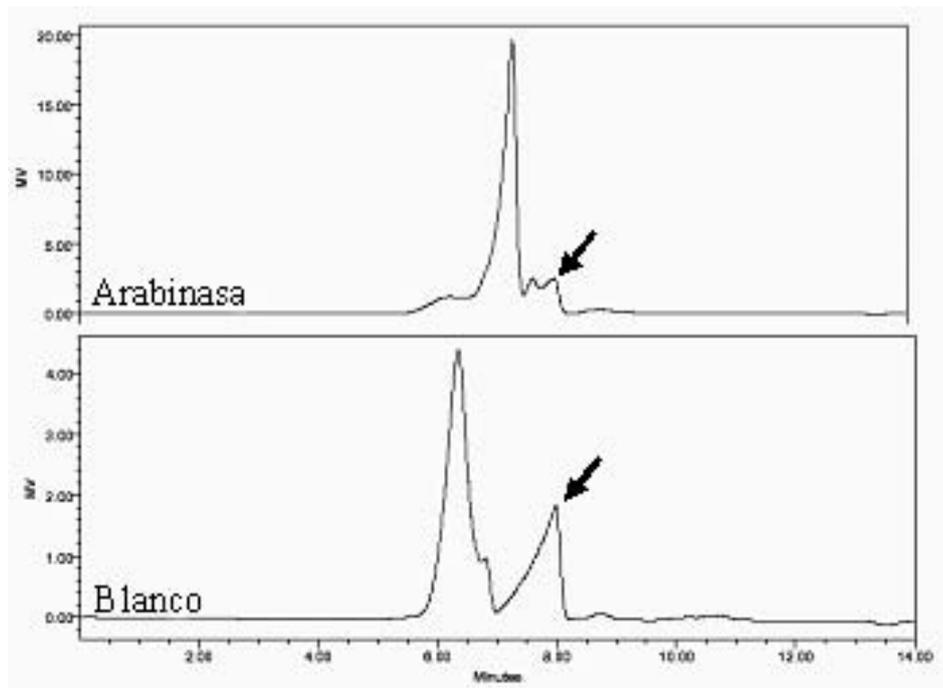


Figura 2.5 HPLC de los productos de reacción luego de incubar arabano con la fracción cromatográfica con actividad ARAasa.

Se incubó 1 ml de 0,2 % (p/v) de arabano en BAcNa (5 mM, pH 5,0) con 1,0 mU de ARAasa (fracción 18, Fig. 2.4) durante 2 h a 37°C. La hidrólisis estimada fue del ~1,0 %. Se eluyó con agua grado HPLC a 80°C a 0,8 ml/min. El pico presente tanto en el blanco como en el sustrato pertenece al acetato (flecha). El t_r de la arabinosa fue de 12,25 min (no mostrado).

Galactanasa y β -galactanasa

Como de puede observar en la Fig. 2.4 la actividad GALasa, que eluye conjuntamente con la ARAasa, eluyó separadamente de la actividad β -gal. El análisis mediante TLC de los productos de hidrólisis obtenidos luego de la incubación de galactano con la fracción correspondiente al pico con actividad GALasa (Fig. 2.6) mostró la formación de oligómeros y ausencia de galactosa, lo cual indicaría la presencia de actividad β -1,4-endogalactanasa en la fracción analizada (de Vries and Visser, 2001). Igualmente, luego de la incubación prolongada (8 h), de galactano con la fracción 10 con actividad β -gal, se pudo observar un incremento neto de los azúcares reductores en la mezcla de reacción revelando a su vez el análisis por TLC la presencia débil de galactosa y un pool de oligosacáridos como productos de degradación del galactano. Se concluye que la enzima con actividad β -gal también podría tener una acción tipo exo sobre el galactano.



Figura 2.6 TLC de los productos de degradación del galactano.

Se incubó 1 ml de galactano al 0,2 % en BAcNa (5 mM, pH 5,0) a 37°C por 2 h con 4,0 mU de GALasa (fracción 20, Fig. 2.4) y por 8 h con 2,0 mU β -gal (fracción 10, Fig. 4). La hidrólisis estimada de galactano fue del ~ 4,0 % y del 1,0 %, respectivamente.

Línea 1: blanco de sustrato (incubación: 2 u 8 h).

Línea 2: mezcla de reacción (galactano incubado con β -gal).

Línea 3: mezcla de reacción (galactano incubado con GALasa).

Línea 4: patrón de galactosa (1 g/l).

α -L-ramnosidasa y β -D-fucosidasa

Aunque estas dos enzimas no son clasificadas generalmente como pectinasas, podrían hidrolizar los residuos de ramnosa y fucosa presentes en las cadenas laterales de ciertas regiones de la pectina, como RGII (de Vries and Visser, 2001). En el perfil de elución de pectinasas de *A. kawachii* (Fig. 2.4) se detectó una única fracción activa con actividad β -D-fucosidasa que eluyó junto a la β -gal y dos fracciones activas con actividad α -Ram, una en el buffer de lavado (Ram II) y la otra en una fracción perteneciente al gradiente (Ram I). Ram I representó más del 95 % del total de la actividad α -Ram recuperada y es la principal α -Ram producida por *A. kawachii* en medio PL. La purificación posterior de esta enzima demostró que Ram I no tiene actividad β -D-glucosidasa (es decir, no se trata del complejo enzimático denominado naringinasa), tiene un pH óptimo para la *pnp*-Ram en el rango de 4,0-5,0, conservando el 10 % del máximo de actividad a pH 2,0 y es capaz de hidrolizar naringina y hesperidina, pero no quercitina. Ram I pareciera estar relacionada con la α -L-ramnosidasa

recientemente aislada, purificada y caracterizada en un cultivo de la misma cepa de *A. kawachii* (Koseki et al., 2008).

Arabinogalactanasa

La actividad AGasa expresada en los medios Glu y PL no pudo ser detectada en las fracciones cromatográficas a pesar de que AG puede ser hidrolizado por varias enzimas que actúan sobre ARA y GAL. La razón de este resultado resta por ser elucidada.

2.5 Conclusiones

En el presente capítulo se ha reportado la evidencia experimental respecto a que *A. kawachii* produce una serie de enzimas extracelulares que, junto con otras reportadas previamente por otros autores, son responsables de la degradación de la pared celular vegetal. Este hecho está en concordancia con, y justifica, la motivación de esta Tesis Doctoral mencionada en el Capítulo 1.

En conclusión, *A. kawachii* es una excelente fuente de enzimas degradadoras de pared celular vegetal, fundamentalmente por la amplia variedad de actividades enzimáticas producidas. De todas ellas, la actividad pectinesterasa no ha sido reportada hasta el presente además de ser activa a pHs fuertemente ácidos (pH: 2), por la cual podría ser considerada una extremozima. Estas razones justifican su elección para estudios más exhaustivos a los efectos de profundizar los conocimientos sobre ella (producción, caracterización y uso), todos estos aspectos que se muestran en los 2 capítulos siguientes.

2.6 Bibliografía

1. Albersheim, P. (1966) Pectin lyase from fungi. *Methods in Enzymology* 8, 628-631.
2. Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489.
3. Contreras Esquivel, J.C. Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. 2003. Universidad Nacional de La Plata.
Ref Type: Thesis/Dissertation
4. Contreras Esquivel, J.C., and Voget, C.E. (2004) Purification and characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J.Biotechnol.* 110, 21-28.
5. de Vries, R.P., and Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 65, 497-522.

6. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J., Krobers, P.A., and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
 7. Hayashi, T. (1958) The pectin enzyme produced by microorganisms. I. Pectin galacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Hakko Kôaku Zasshi* 36, 246-248.
 8. Herber, D., Phipps, P., and Strange, P. (1971). *Methods in Microbiology*, (Academic Press: London).
 9. Ito, K., Ogasawa, H., Sugimoto, T., and Ishikawa, T. (1992) Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 547-550.
 10. Iwano, K., Mikami, S., Fukuda, K., Shiinoki, S., and Shimada, T. (1986) The properties of various enzymes of Shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *J. Brew. Soc. Japan* 81, 490-494.
 11. Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimojo, H., and Ito, K. (1998) Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1938-1946.
 12. Kitamoto, K. (2002) Molecular Biology of *Koji* Molds. *Adv. Appl. Microbiol* 51, 129-146.
 13. Klavons, J., and Bennett, R. (1986) Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *Agriculture Food Chemistry* 34, 597-599.
 14. Kojima, Y., Sakamoto, T., Kishida, M., Sakai, T., and Kawasaki, H. (1999) Acid condition-inducible polygalacturonase of *Aspergillus kawachii*. *Journal of Molecular Catalysis B* 6, 351-357.
 15. Koseki, T., Mese, Y., Nishibori, N., Masaki, K., Fujii, T., Handa, T., Yamane, Y., Shiono, Y., Murayama, T., and Iefuji, H. (2008) Characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 1007-1013.
 16. Koseki, T., Okuda, M., Sudo, S., Kizaki, Y., Iwano, K., Aramaki, I., and Matsuzawa, H. (2003) Role of two α -L-arabinofuranosidases in arabinoxylan degradation and characteristics of the encoding genes from Shochu Koji Molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 232-241.
 17. Lee, C.H. Cereal Fermentations in Countries of the Asia-Pacific Region. Food and agriculture organization of the united nations. *FAO agricultural services. Bulletin N° 138*. 1999. Rome. Fermented cereals. A global perspective.
- Ref Type: Report
18. Mikami, S., Iwano, K., Shinoki, S., and Shimada, T. (1987) Purification and some properties of acid-stable α -amylases from shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *Agric. Biol. Chem.* 51, 2495-2501.

19. Nagamine, K., Murashima, K., Kato, T., Shimoi, H., and Ito, K. (2003) Mode of α -amylase production by the schochu koji mold *Aspergillus kawachii*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 67, 2194-2202 .
20. Ride, J.P., and Drysdale R.B. (1972) A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiological Plant Pathology* 2, 7-15.
21. Rojas, N., Ortiz, G., Baruque, D., Cavalitto, S., and Ghiringhelli, P. (2011) Production of heterologous polygalacturonase I from *Aspergillus kawachii* in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38, 1437-1447.
22. Saha, B.C. (2000) a-L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 403-423.
23. Smith, B.J. (1984). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, (The Humana Press Inc.Clifton: New Jersey).
24. Vita, C.E., Contreras Esquivel, J.C., and Voget, C.E. (2009) The pectolytic system of the industrial fungus *Aspergillus kawachii*. *Food Science and Biotechnology* 8, 1365-1370.
25. Voget, C.E., Vita, C.E., and Contreras Esquivel, J.C. (2006) One-step concentration and partial purification of non-acidic *Aspergillus kawachii* polygalacturonases by adsorption to glass fiber microfilters. *Biotechnol.Lett.* 28, 233-239.
26. Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., and Yadav, K.D.S. (2009) Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry* 44, 1-10.
27. Yagi, F., Fan, J., Tadera, K., and Kobayashi, A. (1986) Purification and characterization of carboxyl proteinase from *Aspergillus kawachii*. *Agric.Biol.Chem.* 50, 1029-1033.

Capítulo 3

Cultivos de *Aspergillus kawachii* para la producción de Pectinesterasa

3.1 Resumen

Se realizaron cultivos de *A. kawachii*, tanto en cultivos sólidos como en medios líquidos. Los medios sólidos incluyeron a) salvado de trigo suplementado con pectina, b) pomaza de limón, y c) perlita impregnada con un medio líquido conteniendo pectina. Los medios sólidos fueron caracterizados en relación a sus propiedades higroscópicas para ajustar sobre una base racional el contenido de agua de los cultivos. Los estudios en frascos agitados con diferentes FCE indicaron que la inducción de la PE en *A. kawachii* depende de la presencia de ácido galacturónico en el medio, por lo cual el mecanismo regulatorio de la síntesis de la enzima parece ser similar al descrito en otros *Aspergilli*. Los máximos niveles de actividad PE se encontraron en medios líquidos con una combinación de harina de soja y pectina. La proporción de ambos componentes en el medio fue optimizada utilizando un diseño experimental del tipo superficie de respuesta, en este caso un diseño central compuesto o diseño de Doehlert. La optimización se llevó a cabo empleando cultivos en frascos. Finalmente, se validaron los resultados de la optimización en un biorreactor tipo tanque agitado.

3.2 Introducción

La PE cataliza la hidrólisis de los ésteres de los ácidos carboxílicos metilados en la pectina, con formación de ácidos pécticos y metanol como productos de reacción. Es producida por una amplia variedad de plantas y microorganismos (Markovic and Jornvall, 1992; Friedrich et al., 1992), aunque las comerciales son de origen fúngico, particularmente del género *Aspergillus*. Su uso industrial está centrado fundamentalmente en procesos vinculados a la industria alimenticia, como son la elaboración de pectinas de bajo metoxilo y, particularmente, la clarificación de jugos cítricos (i.e.: limón) (Kashyap et al., 2001).

En el capítulo anterior se mostró que *A. kawachii* IFO 4308 produce una gran variedad de enzimas extracelulares relacionadas con la degradación de paredes celulares vegetales; entre

ellas, la pectinesterasa (PE, EC 3.1.1.11), que se induce en medios conteniendo pectina. En este capítulo se amplían los estudios sobre la inducción y producción de PE, utilizando tanto medios sólidos como líquidos, para finalmente proceder a la optimización de su producción en medio líquido mediante un método estadístico y su posterior validación con un cambio de escala.

En general, los hongos pueden cultivarse en medios líquidos (cultivos sumergidos) donde el micelio se encuentra completamente disperso en el medio acuoso o bien formando pellets. También, se los puede cultivar sobre la superficie de medios agarizados, o bien sobre medios particulados sin agua libre, sistema denominado fermentación en sustrato sólido (FSS). Desde el punto de vista fisiológico, la FSS se asemeja a las condiciones ambientales de crecimiento para los hongos filamentosos terrestres (Mudgett, 1986). La adaptación del hongo a este tipo de sistema de cultivo es debida a su capacidad de crecimiento en forma de hifas, la cual es favorable desde el punto de vista de la colonización y el aprovechamiento de nutrientes disponibles. La FSS ha sido satisfactoriamente utilizada en la producción de pectinasas fúngicas (Dinu et al., 2007;Castilho et al., 2000;Silva et al., 2005;Pedrolli et al., 2008). Su uso industrial se debe, entre otros factores, a los altos rendimientos enzimáticos y/o mayores productividades comparados con los alcanzados en medios líquidos (Andersen et al., 1995).

La FSS se puede realizar empleando sustratos naturales con alta capacidad de adsorber agua, como granos de cereales (arroz, cebada) u oleaginosas (soja), residuos agroindustriales (afrechos, pomazas de frutas) o bien utilizando un soporte poroso inerte impregnado con medio nutritivo. Algunos soportes empleados a tal fin son la perlita, cáñamo, pajas de trigo y/o arroz, etc. La elección del soporte depende, entre otros factores, de su capacidad de absorción de agua, porosidad y tamaño de partícula, que cumplen un rol fundamental en el control de humedad, temperatura y aireación del sustrato. En el presente trabajo se adoptó la FSS como sistema de cultivo empleando salvado de trigo y pomaza de limón como sustratos naturales y perlita como un sustrato artificial inerte poroso, impregnado con un medio nutritivo. La utilización de la perlita como material inerte ha sido recomendada en FSS ya que el conocimiento a priori de la composición del medio de cultivo empleado para su impregnación permite analizar en detalle los efectos del mismo sobre el crecimiento y la producción enzimática. Además, este sistema facilita la extracción de los productos extracelulares (Ooijkaas et al., 2000).

En el capítulo anterior se mostró que *A. kawachii* IFO 4308 produce una gran variedad de enzimas extracelulares relacionadas con la degradación de paredes celulares vegetales; entre ellas, la pectinesterasa (PE, EC 3.1.1.11), que se induce en medios conteniendo pectina. En este capítulo se amplían los estudios sobre la inducción y producción de PE, utilizando tanto medios sólidos como líquidos, para finalmente proceder a la optimización de su producción en medio líquido mediante un método estadístico y su posterior validación con un cambio de escala.

La realización de cultivos en medio líquido permitió poner en evidencia varios factores del medio de cultivo sobre la producción de PE. Así resultó interesante determinar el efecto inductivo de diferentes FCE y utilizar ciertos subproductos para obtener altos niveles de actividad enzimática. El medio con estos subproductos fue optimizado en su composición empleando diseños estadísticos. Por último, se validó la optimización mediante un cambio de escala llevaron a cabo cultivos en un biorreactor tipo tanque agitado.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Reactivos y soluciones

Glucosa (Glu), ramnosa (Ram), arabinosa (Ara), xilosa (Xil), galactosa (Gal), ácido galacturónico (AGA), pectina cítrica (Pec; 85 % de AGA anhidro, GM 53 %), ácido poligalacturónico (APG; sal sódica, 90 % de AGA anhidro), xilano (de madera de haya) y arabinogalactano (AG; de madera de alerce) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). La triptona fue de Difco (USA). El ramnogalacturonano (RG; de soja) fue obtenido de Megazyme International (Irlanda).

La harina de soja (HS) fue provista por Laboratorios Biagro S.A. (Las Heras, Argentina). La composición de HS varía año a año, con la variedad de soja procesada y depende del método de extracción del aceite. La composición del lote empleado en nuestro caso, que fue obtenida del proveedor, es la siguiente (% base húmeda): humedad 12,5, proteína ($N \times 6,25$) 42-47, materia grasa 2,5, fibra 3,5 y carbohidratos 20. El N asimilable de la harina de soja es de aproximadamente un 70-80 % (<https://www.cargill.com.ar/agro/Contenidos/Nota.asp?id=169&DsS=Oportunidades&DSC=Subproductos>).

El salvado de trigo (ST) fue obtenido de Molino Campodónico (La Plata, Argentina). La composición del ST también es variable. La composición del lote empleado, que fue

obtenida del proveedor, es la siguiente (% base húmeda): humedad 10, proteína (N × 6,25) 16, fibra 43, almidón 18, materia grasa 4,5 y cenizas 5,0.

La pomaza de limón (PL) fue obtenida de Citrinor S.A. (Tucumán, Argentina). La composición de la PL, que fuera determinada anteriormente en nuestro laboratorio para la partida utilizada, es la siguiente (% en base húmeda): agua 8,2, AGA 29,6, azúcares neutros 36 (Glu 50 %, Ara 20,5 %, Gal 14 %, Xil 7 %, manosa 6 %, Ram 1,7 % y fucosa 0,8 %) y proteínas 6,7 (Contreras Esquivel, 2003c).

La perlita expandida de uso agrícola (PERLOME®) fue provista por Laboratorios Biagro S.A. Perlita es un nombre genérico que designa un cierto tipo de roca o vidrio natural. Su principal característica es que al ser calentada a temperaturas superiores a 800°C sufre un proceso de expansión (por evaporación del agua ligada) que incrementa su volumen entre 4 y 20 veces respecto al original (perlita expandida). El material resultante es de color blanco, posee alta porosidad, pH neutro y puede absorber varias veces su peso en agua.

Los búferes utilizados fueron: citrato-fosfato (BCP; ácido cítrico 50 mM, fosfato disódico 25 mM, ajustado a pH 5,5 con NaOH) y acetato de sodio (BAcNa; 50 mM ácido acético ajustado a pH 5,5 con NaOH). Cuando fue requerido, dichos búferes se diluyeron y/o su pH se modificó al valor deseado mediante el agregado de HCl.

3.3.2 Microorganismo e inóculo

La cepa y el procedimiento de preparación de los conidios para sembrar los medios líquidos y sólidos fueron los descriptos en el capítulo anterior.

3.3.3 Determinaciones analíticas

La medida de glucosa se realizó por el método enzimático glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener S.A.I.C., Rosario, Argentina), la de los carbohidratos totales por la técnica del fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), la de los azúcares reductores por Somogyi-Nelson y la del AGA por la técnica de *m*-hidroxidifenilo (mhdf) (Blumenkrantz and Asboe-Hansen G., 1973). La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando albúmina bovina como estándar. La biomasa fúngica se determinó directamente mediante la evaluación del peso seco o indirectamente analizando el contenido de glucosamina de los sólidos en suspensión (Aidoo et al., 1981).

3.3.4 Cultivos en sustrato sólido

3.3.4.1 Materiales utilizados

Salvado de trigo: Se utilizó la fracción retenida por tamiz 50 (partículas mayores a 300 μm).

Pomaza de limón: Las semillas se separaron manualmente y el material restante fue triturado mecánicamente con un procesador de alimentos y finalmente tamizado, empleando la fracción 80 + / 100 – (partículas que pasan la malla de 180 μm (+80) y se retienen en la malla de 150 μm (-100)).

Perlita: se utilizó perlita como material inerte. La misma fue lavada con agua corriente y luego con agua destilada. Finalmente, se secó a 80°C en estufa y se tamizó, utilizándose la fracción 80 + / 100 –. La densidad aparente de este material es 0,16 g/cm³.

3.3.4.2 Propiedades de hidratación de los materiales utilizados como sustratos sólidos

Las propiedades de hidratación se determinaron por gravimetría en la fracción seleccionada de cada uno de los materiales, a saber:

Capacidad de retención de agua: se pesaron 2 g de muestra y se le agregaron 15 ml de agua, luego se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente, luego de lo cual el agua se separó gravimétricamente mediante filtración por tela (voile de nylon). Luego se pesaron 5 g de material húmedo, se lo secó en estufa a 80°C por 24 h y se determinó el contenido de humedad por diferencia de peso. Esta determinación también se llevó a cabo sobre los materiales autoclavados, tanto secos como impregnados con agua o una solución 0,2 N de HCl en la proporción 1,5 ml de líquido por g de sólido (Hours and Sakai, 1994). Las 3 muestras se autoclavaron (20 min, 121°C) y el material resultante se secó en estufa a 80°C por 24 h. A estos 3 materiales tratados y secos se les determinó la capacidad de retención de agua del modo antes descrito.

Isotermas de desorción de agua: para la determinación de las isotermas los materiales autoclavados con agua (perlita o PL) o con HCl 0.2 N se embebieron Posteriormente la perlita se embebió con medio estéril de la siguiente composición (g/l): pectina 5,0; triptona 2,5; K₂HPO₄, 1,0; KCl, 0,5; MgSO₄·7H₂O, 0,5 y FeSO₄·7H₂O, 0,01, pH: 4,0; el afrecho con agua o solución de pectina (5 g/l pectina cítrica en agua) y PL con agua. La cantidad de líquido incorporado a cada material correspondió al 90 % de su capacidad de retención de agua. Las cajas de Petri ubicadas en recipientes herméticos se colocaron en estufa a 25°C bajo diferentes condiciones de humedad relativa durante 6 días, tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio (Contreras Esquivel, 2003b). Estas condiciones de humedad relativa se obtuvieron empleando

soluciones de glicerol-agua cuyas composiciones fueron derivadas de la Ley de Raoult (válida para soluciones diluidas), a saber:

$$a_w = n_1 / (n_1 + n_2)$$

donde n_1 y n_2 corresponde a moles de agua y de glicerol, respectivamente.

Una vez establecido el equilibrio, el contenido de agua del material se determinó a 80°C y se expresó como g de agua por g de material seco. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.3.4.3 Cultivos con salvado de trigo

Los cultivos se realizaron en cajas de Petri de vidrio ($\varnothing = 100$ mm, $h = 20$ mm) en las cuales se colocaron 5 g de salvado seco y 7,5 ml de HCl 0,2 N. Las cajas se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min, se secaron a 80°C y se impregnaron con 15 ml de HCl 0,2 N o una solución de pectina cítrica (5 g/l en 0,2 N de HCl). Posteriormente, las cajas se inocularon con 0,2 ml de una suspensión de conidios en Tween 80 al 0,05 % de manera de obtener una concentración de $\sim 10^5$ conidios/g húmedo. El medio se mezcló exhaustivamente y las cajas se incubaron en atmósfera saturada a 30°C. El muestreo se realizó a las 12, 24, 30, 36 y 48 h, tomando 3 cajas a la vez. Sus contenidos se mezclaron cuidadosamente y luego se tomaron 10 g del material fermentado, el cual se extrajo con 40 ml de agua con agitación durante 10 min. Se midió el pH de la suspensión, se llevó a 5,0 y se filtró a través de tela. El proceso de extracción se efectuó también utilizando soluciones de NaCl (0,1 – 0,5 M). El material sólido retenido se re-extrajo con otros 40 ml de agua (o de solución de NaCl) y se repitió la filtración. Los extractos de la primera y segunda extracción se juntaron, centrifugaron para eliminar restos sólidos en suspensión y la solución resultante se llevó a volumen (100 ml) con agua. Un pequeño volumen de dicho extracto ($\sim 5 - 10$ ml) se desalinizó mediante una columna PD-10 equilibrada con BAcNa (20 mM, pH 5,0) y luego se liofilizó. Para el análisis de la actividad enzimática los extractos se resuspendieron con agua deionizada una concentración $10 \times$ respecto del extracto original, es decir a la concentración aproximada correspondiente al medio sólido. El remanente del material fermentado presente en las cajas de Petri se secó a 60°C hasta peso constante para calcular su contenido de sólidos (materia seca). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.3.4.4 Cultivos con pomaza de limón

Los cultivos se realizaron en cajas de Petri ($\varnothing = 60$ mm, $h = 15$ mm) conteniendo 0,5 g de PL que fueron esterilizadas por autoclavado (15 min, a 121°C). Luego se llevaron a estufa

(60°C hasta peso constante) y una vez seca la PL se inoculó con 3 ml de agua o de una solución de nutrientes (con la concentración de conidios necesaria para alcanzar $\sim 1 \times 10^5$ conidios/g de material húmedo inicial). La solución de nutrientes fue de la siguiente composición (g/l): triptona, 2,5; K_2HPO_4 , 1,0; KCl, 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01, pH: 4,0. Las cajas inoculadas fueron incubadas en atmósfera saturada a 30°C. Los tiempos de cosecha fueron: 0, 30, 48 y 96 h. Transcurrido este plazo, se procesaron los cultivos. El contenido de cada caja se mezcló exhaustivamente, se tomaron 2 g del material fermentado, el cual se extrajo con 8 ml de agua con agitación durante 30 min, se midió el pH, se llevó a pH 5,0 en caso de ser necesario y se filtró por tela de nylon. El procesamiento del filtrado y del resto de medio fue similar al descrito previamente para los cultivos con salvado de trigo.

3.3.4.5 Cultivos con perlita

Los cultivos se realizaron en cajas de Petri de vidrio ($\varnothing = 60$ mm, h = 15 mm) en las cuales se colocaron 2,5 g de perlita y 7,5 ml de agua destilada. Las cajas se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min, se secaron a 80 °C y se impregnaron con 11,5 ml de medio líquido conteniendo conidios en la cantidad requerida para alcanzar $\sim 1 \times 10^5$ conidios/g de material húmedo inicial. El medio líquido conteniendo 5 g/l de pectina cítrica como FCE fue descrito en el Cap. 2. Las cajas fueron incubadas a 30°C en atmósfera saturada de humedad a 30°C. Los tiempos de cosecha fueron: 0, 30, 48 y 96 h. Transcurrido este plazo, se procesaron los cultivos. El contenido de cada caja se mezcló exhaustivamente, se tomaron 2 g y se resuspendieron en 8 ml de agua. La suspensión se agitó vigorosamente por 30 min, se midió el pH, se llevó a pH 5,0 en caso de ser necesario y se filtró por tela de nylon. El procesamiento del filtrado y del resto de medio fue similar al descrito previamente para los cultivos con salvado de trigo.

3.3.5 Cultivos en medio líquido

3.3.5.1 Efecto de la FCE

Los ensayos se realizaron en erlenmeyers de 1000 ml con 100 ml de medio de cultivo cuya composición se describió en el Cap. 2. En este caso, la concentración de la FCE y de la FN fue de 5 y 2,5 g/l, respectivamente. Las FCE ensayadas fueron: Glu, Ara, Gal, Xil, Ram, AGA, APG, Pec, RG, AG, ST, PL y HS. Las concentraciones empleadas para los casos

particulares de HS con pectina y ST con pectina fueron de 5 g/l (HS o ST) y 0,5 g/l (pectina), respectivamente. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El pH inicial del medio fue ajustado a 4,0 con solución de H_3PO_4 1 N. Los fosfatos y las FCE complejas (ST, PL y HS) fueron esterilizados por separado en autoclave 15 min a 121°C . Los azúcares simples se esterilizaron por filtración (membrana de acetato de celulosa, $0,22\ \mu\text{m}$). Luego de reconstituidos, los medios se inocularon con la suspensión de conidios para llegar a una concentración de 10^6 conidios/ml de medio. Los frascos se incubaron a 30°C en shaker a 200 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). El tiempo de cultivo fue de aproximadamente 30 h.

El muestreo se realizó tomando la totalidad del contenido de cada frasco, el cual se ajustó a pH 5,0 y se filtró a través de tela. En aquellos medios sin sólidos en suspensión, el micelio se lavó dos veces con 100 ml de agua destilada y se secó a 105°C para la determinación de biomasa. Alternativamente, en aquellos medios con sólidos en suspensión (ST, PL y HS) se midió el contenido de glucosamina en los sólidos secos (a 60°C) como índice de crecimiento celular. Se llevó a cabo una nueva filtración mediante microfiltros de fibra de vidrio ($\varnothing = 47\ \text{mm}$, tamaño de poro nominal: $0,45\ \mu\text{m}$, Osmonics) y el filtrado se dividió en dos partes. Una parte se congeló a -20°C para la determinación de azúcares. La otra se utilizó para la determinación de la actividad enzimática. Para ello, se liofilizó y resuspendió con agua deionizada a una concentración $10 \times$ respecto del medio original. Luego el concentrado se desaló (PD-10 equilibrada con BAcNa, 20 mM, pH 5,0) y se conservó a 5°C por no más de 3 días o bien se congeló a -20°C .

3.3.5.2 Efecto del pH inicial

En estos cultivos se ajustó el pH inicial del medio a 2,5 mediante el agregado de solución de H_3PO_4 1 N. En este caso, los cultivos se realizaron empleando Pec y PL como FCE. Los demás procedimientos empleados fueron los mismos descritos precedentemente.

3.3.5.3 Cinética de producción de PE en frascos

El mismo sistema y condiciones de cultivo se emplearon para el estudio de la cinética de producción de PE en frascos. En este caso, los cultivos se realizaron durante 48 h tomando muestras cada 6 h. Las FCE utilizadas fueron: Pec, PL y HS en concentraciones de 5 g/l. Además se ensayó HS suplementada con 0,5 g/l de Pec.

3.3.5.4 Cultivos en biorreactor

Los cultivos en biorreactor tipo tanque agitado se realizaron en un equipo Inceltech (LH Serie 210) sin deflectores, de 5,0 l de capacidad con 4,0 l de medio, provisto de control de pH (electrodo de vidrio, Mettler-Toledo) y monitoreo del oxígeno disuelto (electrodo polarográfico, Mettler-Toledo). La agitación se reguló automáticamente entre 200 a 400 rpm de modo de mantener el oxígeno disuelto por encima del 30 % de saturación. La temperatura a 30°C, el pH se mantuvo a 4,0 con solución de H₂SO₄ (2,0 N) o de NaOH (2,0 N) según corresponda y la aereación se ajustó a 0,8 l de aire por min (20°C, 101,3 kPa). El fermentador se esterilizó en autoclave (15 min, a 121°C) con parte del medio de cultivo conteniendo la FCE y los fosfatos. El resto de los componentes se esterilizó por separado y se incorporaron junto con el inóculo. El medio fue inoculado con 10⁶ conidios/ml. La toma de muestra para el análisis se realizó descartando los primeros 10 ml para luego tomar volúmenes de 35 ml, aproximadamente. Estas muestras se procesaron del mismo modo que el descrito anteriormente.

3.3.6 Determinación de actividades enzimáticas

La actividad PE se determinó tanto mediante la técnica del verde de bromocresol (Vilariño et al., 1993) como por la del alcohol-oxidasa (Klavons and Bennett, 1986) según corresponda. También se determinaron actividades de PeL, AGasa, PGasa, CMCasa y xilanasa según la metodología descrita en el capítulo anterior.

3.3.7 Optimización estadística de la producción de PE mediante el diseño de Doehlert

La optimización de la producción de PE en el medio líquido con HS y Pec se realizó utilizando un diseño experimental del tipo superficie de respuesta, en este caso un diseño de Doehlert (ver Anexo). Los cultivos se realizaron empleando la metodología descrita (ver 3.3.5.1).

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Fermentaciones en sustrato sólido (FSS)

Se empleó un sistema de cultivo alternativo, como es el caso de la FSS, con el objetivo de desarrollar una fermentación más simple a la vez de obtener extractos más concentrados respecto de la actividad PE. En este estudio se utilizaron ST y PL como sustratos sólidos, que son a su vez nutrientes para el hongo, y perlita como soporte inerte impregnado con medio de cultivo. La ventaja teórica de este último sistema es que el material que forma la estructura

porosa es inerte, manteniendo de algún modo su estructura durante el cultivo. En la FSS es imprescindible el control de la humedad del medio, ya que en este tipo de cultivo el agua no está libre pero tiene que estar disponible para el crecimiento microbiano. En los trabajos publicados sobre FSS es común indicar la humedad inicial del medio sólido (generalmente como % en base húmeda) sin una justificación clara al respecto. En nuestro caso se llevaron a cabo una serie de determinaciones sobre las propiedades hídricas de los materiales para establecer sobre una base racional el contenido de agua requerido para el cultivo. Los materiales para la FSS son, en general, porosos y con cierta capacidad de retención de agua (CRA). Esta capacidad expresa la máxima cantidad de agua, en ml, que puede ser retenida por gramo de material seco en presencia de un exceso de agua bajo la acción de una fuerza patrón, en nuestro caso la gravedad. Este concepto se aplica a diversos sistemas como el suelo o materiales como fibra dietética (Stephen and Cummings, 1979;McAunley, 2005).

En una primera experiencia se determinó la CRA de ST, PL y perlita sin ningún tratamiento o previamente autoclavados, situación esta más real ya que los medios se esterilizan por calor y el tratamiento térmico puede modificar la estructura del sólido y por ende sus propiedades hídricas. En este último caso los materiales se autoclavaron solos o impregnados con agua o una solución de HCl 0,2 N en la proporción 1 parte de material con 1,5 volúmenes de líquido. Los datos obtenidos se indican en la Tabla 3.1. Los valores de CRA para los materiales sin tratar se encuentran en el rango reportado en bibliografía(Chen et al., 1988;Lario et al., 2004;McCleart, 2001).

Tabla 3.1 Capacidad de retención de agua a 25°C para perlita, salvado de trigo y pomaza de limón sometidos a diferentes tratamientos.

	g agua / g material seco			
	Sin tratar	Autoclavado	Autoclavado con agua	Autoclavado con HCl 0,2 N
Perlita	4,3 ^a	3,3 ^b	4,9 ^a	3,9 ^a
Salvado de trigo (ST)	5,8 ^a	2,9 ^b	6,0 ^a	4,6 ^c
Pomaza de limón (PL)	9,7 ^a	10,0 ^a	11,6 ^b	11,8 ^b

Los materiales una vez autoclavados se secaron y la capacidad de retención de agua se determinó según 3.3.4.2. Los números con igual letra dentro del mismo material no difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Para ST y perlita, estos valores no difieren significativamente de los correspondientes al material autoclavado impregnado con agua o solución de HCl, pero si del autoclavado seco.

Estos resultados sugieren que la presencia de líquido durante el autoclavado protege de algún modo la estructura del material. Si bien estadísticamente no es significativa, la menor retención de agua en el ST autoclavado con HCl respecto al agua podría explicarse por la hidrólisis de los polímeros, en particular el almidón. En el caso de la PL los resultados son difíciles de evaluar debido al fenómeno de gelificación que ocurre en este tipo de material. La alta capacidad de retención de agua de la PL en comparación con ST y perlita, está relacionada en parte con la presencia de pectina ya que este polisacárido es altamente higroscópico (Boulos et al., 2000).

La PL presentó consistencia de gel luego del autoclavado, particularmente cuando fue impregnada con líquido, fenómeno revelador de la presencia de pectina solubilizada. Este fenómeno resultó no ser ventajoso, ya que la gelificación del medio eliminó la estructura porosa necesaria para un buen funcionamiento del medio como sustrato sólido.

Los valores de CRA obtenidos representan un límite superior para la cantidad de agua que se debe adicionar a estos materiales sin que aparezca agua libre. En esta condición se asume que todos o la mayoría de los poros intrapartícula (generalmente microporos) y en parte los interpartículas (meso y macroporos) están llenos de agua. En esta situación de saturación el crecimiento del hongo probablemente no sea el óptimo ya que la aereación está fuertemente impedida. Para un óptimo crecimiento microbiano, el medio poroso debe contener suficiente cantidad de agua y aire y ambos estar disponibles. Por lo tanto es necesario disminuir el contenido de agua en el medio sólido, pero sin disminuir la a_w a valores incompatibles con el crecimiento. Esta información se puede obtener en forma orientativa de las isothermas de adsorción de agua que es la representación de la relación, en el equilibrio, entre la cantidad adsorbida y la humedad relativa ambiente a una temperatura constante. La humedad relativa ambiente en el equilibrio corresponde a la actividad acuosa del sólido. En la mayoría de los casos las isothermas de adsorción de agua de materiales porosos presentan histéresis, es decir las curvas son diferentes dependiendo si el equilibrio se obtiene por adsorción o desorción. En este estudio se determinaron las isothermas de desorción de agua ya que en general el medio se impregna con agua en exceso y la evaporación produce su reducción. El rango de a_w ensayado fue 0,96-0,99 que es el adecuado para el crecimiento fúngico en FSS (Raimbault, 1998).

Como el objetivo de estos estudios fue finalmente realizar el cultivo del hongo, los materiales luego de autoclavados y secados fueron impregnados con distintas soluciones nutritivas en cantidad equivalente al 90-95 % de la capacidad de retención de agua para

asegurar que no hubiera agua libre. La perlita se impregnó con el medio de cultivo que contiene triptona y pectina (Cap. 2) y el ST con HCl 0,2 N o con una solución de pectina (5 g/l de pectina cítrica en HCl 0,2 N), todas estériles. En el caso de la PL no se pudo determinar la isoterma de desorción de agua con certeza ya que los resultados obtenidos fueron variables e incongruentes. Esto podría deberse en parte a que, como se mencionó previamente, este material adquirió una consistencia gelatinosa como consecuencia del autoclavado. Las isotermas se observan en la Fig. 3.1.

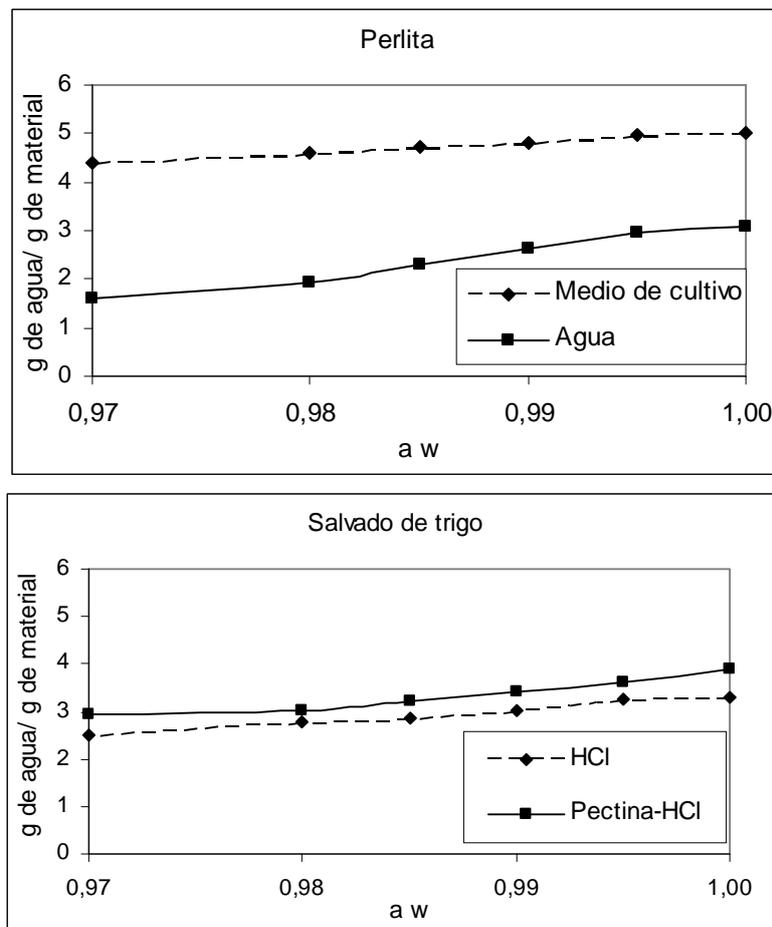


Figura 3.1 Isotermas de desorción de agua para perlita impregnada con agua o con medio de cultivo y salvado de trigo impregnado con HCl 0,2 N o con solución de pectina cítrica (5 g/l en HCl 0,2 N). Los materiales se autoclavaron humedecidos con agua (perlita) o solución de HCl 0,2 N (ST) en proporción 1,5 ml de líquido por cada g de material seco, se secaron en estufa a 80°C y se impregnaron con las soluciones indicadas en cantidad equivalente al 90-95 % de la capacidad de retención de agua (~ 4,5-4,8 y 4-4,2 ml por g seco para perlita y ST, respectivamente). Las mezclas se incubaron a 25°C durante 6 días en recipientes herméticos bajo distintas condiciones de humedad relativa en el rango 0,97-1,0, luego de lo cual se secaron para medir la humedad residual.

Como puede observarse, el contenido de humedad de la perlita y el ST con pectina incubados en una atmósfera saturada ($a_w=1,0$) fueron de 5,0 y 3,8 ml por g, respectivamente,

que corresponden, dentro del error experimental, aproximadamente al valor inicial. Los valores de humedad para ST impregnado con pectina son ligeramente superiores al ST sin pectina en todos los puntos de la isoterma, lo cual es consistente con las propiedades hídricas del polímero. No obstante en el valor con $a_w = 1,0$ deberían coincidir ya que en esta condición no hay teóricamente intercambio de agua entre el sólido y la atmósfera, por lo tanto esta diferencia se atribuye a la preparación de la muestra. Para el crecimiento de *A. kawachii* se seleccionó un valor inicial de a_w del medio de 0,98, que es un valor típico de las FSS con medio impregnado (Oriol et al., 1988). De acuerdo a las isotermas y tomando el valor de humedad con una $a_w = 1,0$ como referencia, para lograr el valor de a_w de 0,98, la humedad de los soportes no debe ser inferior a 4,6 g de agua por g de material seco para la perlita embebida con medio de cultivo, y de 2,8 y 3,0 g de agua por g de material seco para el salvado embebido con HCl y con pectina en HCl, respectivamente. En el caso del salvado estos valores de humedad inicial corresponden aproximadamente a un 79 % de su capacidad de retención de agua, mientras que en el caso de la perlita es de un 90 %. Esto indica que el control de humedad en el medio con perlita es crítico.

3.4.1.1 Cultivos con salvado de trigo

El cultivo sobre salvado de trigo mostró que *A. kawachii* coloniza en 36 h prácticamente todo el medio sólido (Tabla 3.2), resultado similar al encontrado por Hours & Sakai (Hours and Sakai, 1994). Los extractos obtenidos utilizando agua como líquido extractante no mostraron actividad PE para todos los tiempos de cultivo analizados. Dados estos resultados negativos se consideró la posibilidad de que la PE pudiera quedar adsorbida a la matriz sólida, fenómeno probable para aquellas enzimas extracelulares producidas por FSS. Por lo tanto, se efectuó la extracción utilizando soluciones de NaCl de diferente concentración (0,1 a 0,5 N) asumiendo que las interacciones proteína/matriz sólida podrían ser de tipo electrostático (polares, puente de H, iónicas). De este modo, un incremento en la fuerza iónica de la solución extractante tendría que desplazar la proteína hacia el medio líquido. Nuevamente, no se detectó actividad PE con ninguna de las soluciones extractantes empleadas para todas las muestras de cultivo analizadas. En principio, este resultado se puede atribuir a la falta de componentes que induzcan la actividad PE en el ST. Simultáneamente, se determinaron otras actividades enzimáticas empleando agua como extractante. Como se puede observar en la Fig. 3.2, se encontraron valores crecientes con el tiempo de cultivo de actividades relacionadas con la degradación de la celulosa (CMCasa), xilano (xilanasas) y

también de la pectina como AGasa, PGasa y PeL. La presencia de PeL en estos cultivos no es consistente con los resultados obtenidos en los medios líquidos y con la hipótesis de ausencia de inductores en el medio. Distinta es la situación de la PGasa y AGasa, que fueron las únicas actividades pectolíticas encontradas en los medios líquidos con glucosa (Cap. 2), y por lo tanto su presencia en el medio ST es consistente con una expresión constitutiva de las proteínas responsables de tal actividad.

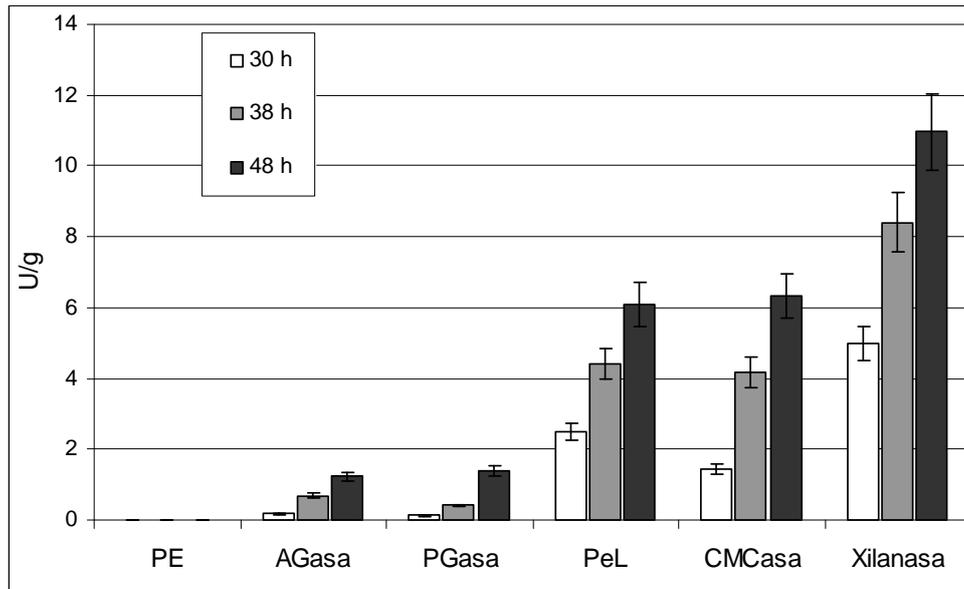


Figura 3.2 Actividades enzimáticas (PE, AGasa, PGasa, PeL, CMCasa y Xilanasa) expresadas en unidades enzimáticas por gramo húmedo de material fermentado, detectadas a diferentes tiempos de cultivo en extractos acuosos provenientes de cultivos sólidos de *A. kawachii* sobre salvado de trigo.

En vista de lo anterior se realizaron cultivos impregnando el ST con una solución de pectina cítrica (5 g/l en HCl 0,2 N). En este caso, se realizó la extracción de la enzima con agua encontrándose actividad PE ya a las 30 h de cultivo, con un máximo a las 96 h de cultivo de 61,6 mU/g de sustrato húmedo. El pH del cultivo medido en el máximo de actividad fue 8,4 habiéndose consumido en dicho período un 38 % de la pectina inicial del medio.

De este modo, queda en claro que la ausencia de PE en el medio ST no fue un problema de extracción de la enzima, sino más bien la ausencia de inductores en el medio. No obstante, esta situación no explica la presencia de PeL en los cultivos sin pectina.

3.4.1.2 Cultivos con pomaza de limón

Para los cultivos con PL, al no poder estimar la cantidad de agua requerida para obtener un valor inicial de a_w de 0,98, se tomó una relación arbitraria de líquido a sólido

correspondiente al 50 % de la capacidad máxima de absorción de agua de la PL. En la práctica, esta relación significa 6 g de líquido por gramo de sólido. Los cultivos de *A. kawachii* sobre PL embebida solamente con agua no mostraron desarrollo del hongo. La PL es un subproducto de la industria juguera y, evidentemente, carece de algunos nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. Por ello, se decidió impregnar la PL con el medio líquido empleado en el Cap. 2 sin FCE. Como era de esperar, el hongo colonizó totalmente el sustrato detectándose a las 96 h de cultivo una actividad PE de 15,5 mU/g sustrato húmedo y un pH del medio de 8,3.

3.4.1.3 Cultivos con perlita

Por último, se decidió estudiar la producción de PE sobre un material inerte, como la perlita, embebido con medio líquido conteniendo pectina como FCE. Las condiciones iniciales de los cultivos fueron de 4,6 ml de medio / g perlita seca y pH 4,2. En este caso, *A. kawachii* se desarrolló cubriendo totalmente la superficie del soporte. La actividad PE se detectó a partir de las 48 h, con un máximo a las 96 h de 3,06 mU / g húmedo, pH 8,1 y un consumo de pectina del 66 %.

Es interesante destacar que en el tiempo de cultivo cuando se registró el máximo de actividad PE (96 h), los valores de pH fueron marcadamente alcalinos (~ 8,0). Según lo observado en los cultivos líquidos, la alcalinización está asociada al agotamiento de la FCE rápidamente asimilable; sin embargo, en este caso el consumo de pectina fue incompleto. Es factible, en el caso de la perlita, que una parte del medio quedara retenida en el interior de las porosidades del sustrato de un modo físicamente inaccesible para el hongo. Estudios similares realizados en nuestro laboratorio con el mismo sistema de cultivo empleando hongos alcalinofílicos autóctonos (*Acrostalagmus luteo-albus* y *Clonostachys rosea*) mostraron un consumo de pectina del orden del 95 % (Rojas et al., 2011b). De lo anterior se puede presumir que el grado de asimilación de nutrientes del interior de las porosidades de la perlita podría depender, entre otros factores, de la especie fúngica en estudio. En el medio con PL, el consumo de pectina no se pudo calcular ya que la extracción de las muestras sólidas de proceso se realizó fundamentalmente para recuperar la PE producida y no la pectina remanente (en este caso, el proceso de extracción se debería de llevar a cabo en condiciones más extremas de pH y temperatura, probablemente incompatibles con la estabilidad de la enzima). Sin embargo, el aumento del pH indicaría una limitación en la FCE. La misma podría deberse a que la pectina se consumió totalmente o bien que la misma se volvió

inaccesible físicamente al hongo. Esta última posibilidad resulta factible teniendo en cuenta que el desarrollo fúngico ocurrió sobre la superficie del medio sin una colonización evidente sobre el interior del material sólido. Debe recordarse que, luego del tratamiento térmico, la PL pierde su forma particulada tornándose en un material gelatinoso.

3.4.2 Cultivos en frascos

3.4.2.1 Efecto de la FCE en la producción de PE

Los resultados de los cultivos en FSS y en medio líquido (Cap. 2) demostraron que la producción de PE por *A. kawachii* está asociada a la incorporación de pectina al medio de cultivo. En un ensayo posterior se reemplazó la Glu (responsable de la represión de muchos genes inducibles) por cantidades equivalentes de glicerol (típico sustrato que no presenta represión catabólica) y no se observó actividad PE (datos no mostrados). De estas experiencias se concluyó que la no expresión de PE en los medios con Glu es la ausencia de inductor. Partiendo de estos datos, resultó interesante analizar qué componente(s) de la pectina es/son responsable(s) del fenómeno de inducción. Desde un punto de vista químico, la pectina empleada como FCE es básicamente AGA parcialmente esterificado, con cierta proporción de azúcares neutros. A su vez, la PL es una fuente de pectina soluble de similar composición que la Pec, pero que también contiene otros componentes de la pared celular vegetal que podrían solubilizarse parcialmente durante el autoclavado y que eventualmente podrían potenciar la inducción. Para determinar de manera más precisa qué componentes del medio contribuyen a la inducción de PE, se realizaron cultivos en frascos conteniendo el medio base con triptona y sales suplementado con cada uno de los azúcares simples que están presentes en la pectina: Gal, Ara, AGA, Ram y Xil. También se ensayaron los polisacáridos pécticos purificados como APG, RG y AG y metanol. La referencia fue un cultivo sin carbohidratos asumiendo en este caso que el crecimiento depende totalmente del aporte de N y C de la triptona. La evaluación del efecto de APG y metanol sobre la producción de PE resultó interesante considerando que son los productos de la reacción enzimática. La concentración de metanol elegida (0,1 g/l) resultó del cálculo que considera la desesterificación total de la pectina empleada (5 g/l). En el estudio se incorporaron también cultivos con HS, en este caso los medios no se suplementaron con triptona ya que el subproducto es rico en nitrógeno. La HS se evaluó sola o en combinación con pectina. Como control se emplearon medios con FCE definidas o complejas. Como control positivo de la producción de PE se emplearon medios conteniendo Pec o PL y como negativo el medio con

Glu o ST. El crecimiento fúngico se determinó por medida del peso seco en aquellos medios sin sólidos en suspensión. La actividad PE se determinó a las 30 h de cultivo. Los resultados se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Crecimiento de *A. kawachii* e inducción de PE en distintos medios de cultivo.

FCE ^a	Peso seco (g/l)	Consumo de FCE (%)	Actividad PE* (mU/ml)
Sin adición ^b	0,61	-	0
Arabinosa	2,98	40	0
Galactosa	0	0	0
Xilosa	3,94	78	0
Ramnosa	0,95	24	0
Acido galacturónico	1,38	55	20,6
Acido poligalacturónico	2,67	87	15,5
Metanol	0,71	-	0
Ramnogalacturonano	0,81	-	0
Arabinogalactano	0,84	-	0
Salvado de trigo con pectina ^c	~ 4,5		5,2
Harina de soja (sin triptona)	~ 3,0		124,2
Harina de soja con pectina ^c (sin triptona)	-	-	159,4
Controles (+)			
Pectina	2,85	90	23,3
Pomaza de limón	-	-	24,2
Controles (-)			
Glucosa	4,31	95	0
ST	~ 3,0	-	0

^a Las concentraciones iniciales de azúcares o polisacáridos fueron de 5 g/l, metanol 0,1 g/l, ST y HS ~ 0,6-0,7 g/l.

^b Medio base con triptona y sales.

^c Pectina agregada al 10 % del componente mayoritario. Los azúcares reductores se determinaron por Somogyi-Nelson y la de AGA, APG y pectinas por mhdf.

*Determinada mediante la técnica de la alcohol oxidasa.

0: no detectable en las condiciones de ensayo empleadas. -: no determinado.

El tiempo de los cultivos fue de 30 h y se realizaron por triplicado.

El medio sin fuente de C mostró un cierto crecimiento fúngico que estuvo asociado al consumo de la triptona, un digerido pancreático de caseína que aporta aminoácidos como única fuente de C y N. Esto se observó también en el medio con metanol cuya concentración es despreciable desde el punto de vista del crecimiento celular. Algunas FCE como AG y RG prácticamente no fueron asimiladas mientras que en el medio con Gal el crecimiento fue completamente suprimido. Cuando se agregó Glu al medio con Gal, el hongo creció consumiendo únicamente la Glu (datos no mostrados). Se concluyó por lo tanto que la Gal inhibe el crecimiento cuando está presente como única FCE y no es asimilada en presencia de otra FCE como es la Glu. La falta de crecimiento de hongos cultivados con Gal ha sido observada en otros casos como *Penicillium marneffeii*, en el cual se especula que la causa sería la acumulación intracelular de uno o más metabolitos de la Gal (Wong SS et al., 2001). Es interesante resaltar que el hongo produce enzimas que degradan el AG, por lo tanto el escaso crecimiento en este sustrato indica que estas enzimas son producidas en niveles importantes cuando están presentes en el cultivo azúcares rápidamente asimilables. En el caso del RG, el resultado es consistente con los resultados obtenidos en el Cap. 2, que sugieren que *A. kawachii*, al menos en las condiciones experimentales empleadas, no produce enzimas que degradan este RG de soja. En relación a las otras fuentes ensayadas, el consumo de FCE en los medios con Glu, Pec, APG, y Xil fue > 75 %, con AGA y Ara fue cercano al 50 % y muy bajo con Ram (24 %).

En todos los casos, la forma de crecimiento fue en pellets cuyo tamaño dependió de la FCE (Fig. 3.3). En la foto se puede observar el crecimiento en pellets con distintas FCE solubles. No queda en claro la causa de la diferencia en el tamaño de los pellets, pero es factible que dependa de la naturaleza de la fuente de C ya que el crecimiento de la biomasa en el medio con glucosa y arabinosa fueron comparables, pero los pellets del cultivo con xilosa fueron la mitad de tamaño de los observados con glucosa.

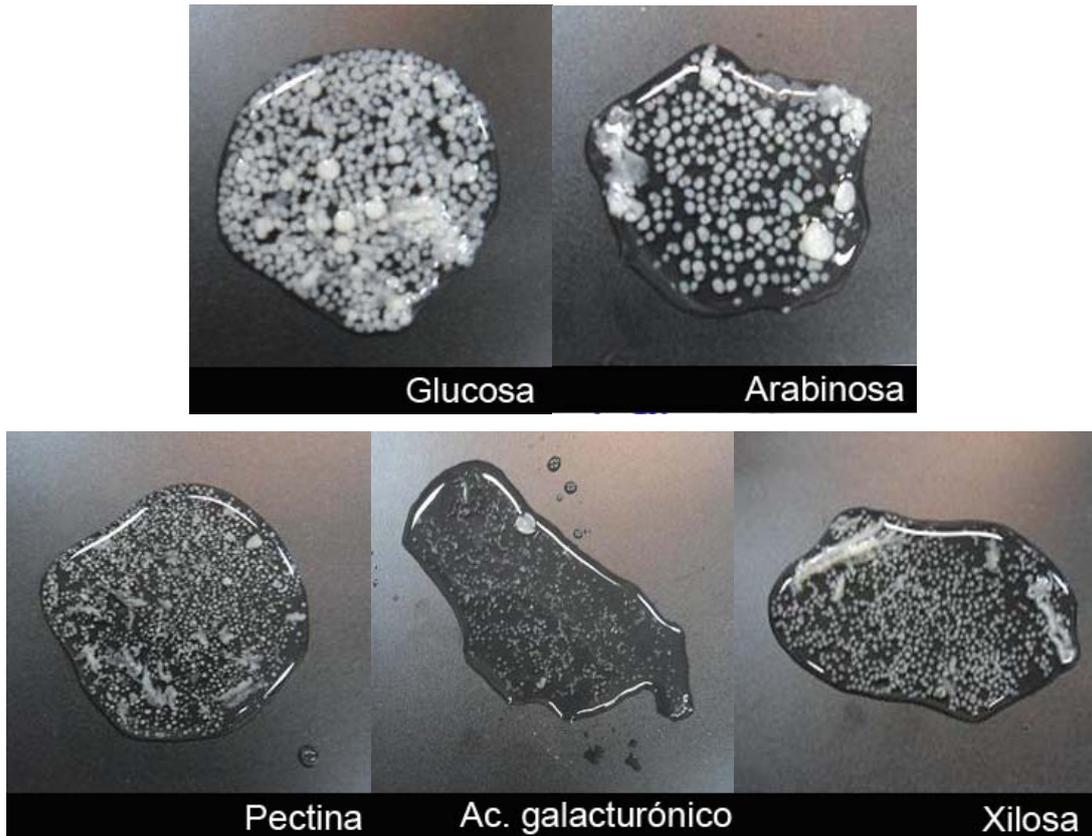


Figura 3.3 Fotografías de muestras de cultivos de *A. kawachii* en medio líquido utilizando diferentes FCE solubles. Los cultivos se cosecharon a las 30 h.

En las FCE complejas, con sólidos en suspensión, el crecimiento fue importante tanto con HS como ST. Los valores de glucosamina en estos medios indican una biomasa del orden de 3,0 g/l, excepto en el caso de la HS suplementada con pectina en el cual la biomasa fúngica alcanzada a las 30 h de cultivo fue de 4,5 g/l. Particularmente, el crecimiento fúngico encontrado en HS indica que este material posee un balance adecuado de C y N.

La producción de PE se observó en los medios conteniendo AGA, ya sea en forma de monómero, polímero purificado (APG) y HS que también contiene pectina. En los primeros (AGA y APG) se alcanzaron niveles de actividad PE de 20,6 y 15,5 mU/ml, respectivamente, que son similares a los medios empleados como control positivo. Por su parte los cultivos con HS como única fuente de C y N dieron niveles de actividad sorprendentemente altos (124,2 mU/ml) y, particularmente, cuando la HS fue suplementada con pectina (159,4 mU/ml). No se detectó actividad PE en el medio con ST solo pero si, aunque una baja actividad, cuando estuvo suplementado con pectina lo cual confirma los resultados de la FSS realizada con este sustrato.

Los resultados obtenidos demuestran que en *A. kawachii* opera un mecanismo similar al descrito en otros Aspergilli (i.e. *A. niger*) en relación a la necesidad de la presencia en el medio de AGA (o sustancias que lo contienen) como inductor sobre la síntesis de pectinasas (de Vries and Visser, 2001). Existen evidencias que el AGA es la molécula clave para la inducción de ciertas enzimas involucradas en la degradación de pectina como algunas PGasas, pectin liasas, ramnogalacturonasas e incluso la PE (Parenicová, 2000). Es probable que algún producto del catabolismo microbiano del AGA sea el verdadero inductor de la PE, como ocurre con otras enzimas pectolíticas (Martinez-Trujillo et al., 2009).

Los altos niveles de actividad PE en HS son llamativos ya que este sustrato no contiene homogalacturonano y las regiones de la pectina que si contienen residuos de AGA como el xilogalacturano son bastante refractarias a la degradación por PGasas (Huisman et al., 2003). Sin embargo, también se han reportado casos positivos de producción de PE por otros Aspergilli (i.e. *A. foetidus*) crecidos en este material sin suplementación alguna (Cavalitto et al., 1996). Empleando la misma cepa que en este estudio, Kojima y col., 1999 (Kojima et al., 1999) produjeron en un medio con HS al menos tres PGasas, según el pH inicial del medio, por lo tanto es probable que el pool de PGasas obtenido en estos cultivos contenga enzimas tanto constitutivas como inducibles.

Es evidente que *A. kawachii* produce enzimas que degradan los polisacáridos pécticos complejos de la HS generando el inductor de la PE. En este sentido sería muy interesante el aislamiento y purificación de estas enzimas, posiblemente novedosas, involucradas en la degradación de la pectina de soja. Los altos niveles de actividad PE indican que HS aporta otros componentes que podrían actuar sinérgicamente en la inducción de la enzima. En este sentido, se han reportado diferentes ejemplos sobre el efecto inductor de la HS, tanto en forma completa como mediado por de alguno(s) de sus componente(s), sobre el crecimiento microbiano y/o la producción de enzimas. Por ello, la HS resulta ser uno de los ingredientes más empleados a nivel industrial en la formulación de medios de cultivos, tanto líquidos como con sólidos en suspensión para la producción de enzimas y otros metabolitos (Asenjo and Merchuk, 1995).

3.4.2.2 Efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de PE

Es conocido que el pH inicial del medio de cultivo puede afectar la producción de enzimas, particularmente las extracelulares, especialmente las pectinasas fúngicas (Peñalva et al., 2008). Los resultados anteriores motivaron la realización de experimentos para determinar

si el pH (inicial) del medio de cultivo ejercía algún efecto sobre la producción de PE. Para ello se realizaron cultivos de *A. kawachii* utilizando Pec y PL como FCE, tanto a pH inicial 4,0 (control) como 2,5. La actividad PE se determinó en muestras tomadas a las 36 h de cultivo. La medida de PE se realizó mediante la técnica de la alcohol oxidasa a dos pHs diferentes, pH 5,0 (control) y 2,5. La medida de actividad enzimática a dos pHs diferentes en diferentes muestras puede indicar la presencia de más de una proteína con la misma actividad enzimática (Voget et al., 2006). Los resultados obtenidos mostraron que en los cuatro medios la actividad PE medida tanto a pH 5,0 (24-27 mU/ml) como a 2,5 (5,8-6,5 mU/ml) fue similar, por lo tanto no se puede realizar ninguna hipótesis sobre la posible presencia de isoenzimas en los distintos medios de cultivo.

3.4.2.3 Cultivos glucosa – pectina

La represión catabólica de una enzima inducible es la ausencia de inducción en presencia de una FCE fácilmente asimilable, la cual generalmente es la Glu. Por ello, el fenómeno se conoce como represión por glucosa o C. Resultó interesante determinar si la glucosa reprimía la síntesis de la PE en presencia de pectina. Para ello, se realizaron cultivos empleando ambas FCE en la misma concentración (2,5 g/l de cada una). La cinética de consumo de ambas FCE y la actividad PE se determinaron durante el cultivo (40 h). Como se observa en la Fig. 3.4, la pectina (medida como AGA) y la Glu se consumieron simultáneamente. A las 30 h de cultivo el consumo de ambas FCE fue prácticamente total, lo que se tradujo en un aumento en la velocidad de incremento del pH. La PE se detectó en el cultivo a partir de las 18 h y luego de alcanzar un máximo a las 30 h disminuyó drásticamente en coincidencia con el remarcado aumento del pH. La razón de esta disminución no es evidente, pero podría estar relacionada con la estabilidad de la enzima a pHs cercanos a la neutralidad. Esta situación contrasta con los resultados de los cultivos en medio sólido en los cuales la máxima actividad fue observada a las 96 h con un pH del medio de ~ 8,0. Esto demuestra las diferencias importantes entre los dos sistemas de cultivo. Este ensayo reveló que en las condiciones de cultivo empleadas no se observa represión de la síntesis de PE por Glu y confirma que el mecanismo principal que controla la producción de enzima es la inducción.

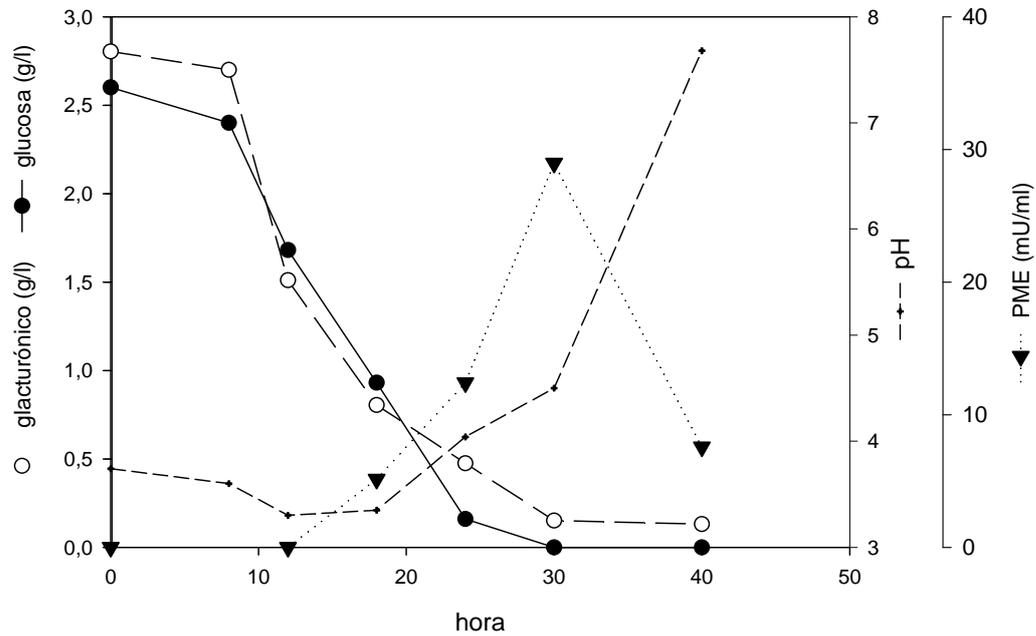


Figura 3.4 Crecimiento y producción de PE por *A. kawachii* en medio con glucosa y pectina.

3.4.3. Cinética de producción de PE en frascos y fermentador

En frascos: Se estudió la cinética de producción de PE en los medios con HS y HS/pectina, en este último caso la concentración de pectina fue del 10 % (p/p) respecto a HS. Como referencias se emplearon los medios con pectina o PL ya estudiados anteriormente. En la Fig. 3.5 se muestra la evolución de la actividad PE en los 4 medios de cultivo.

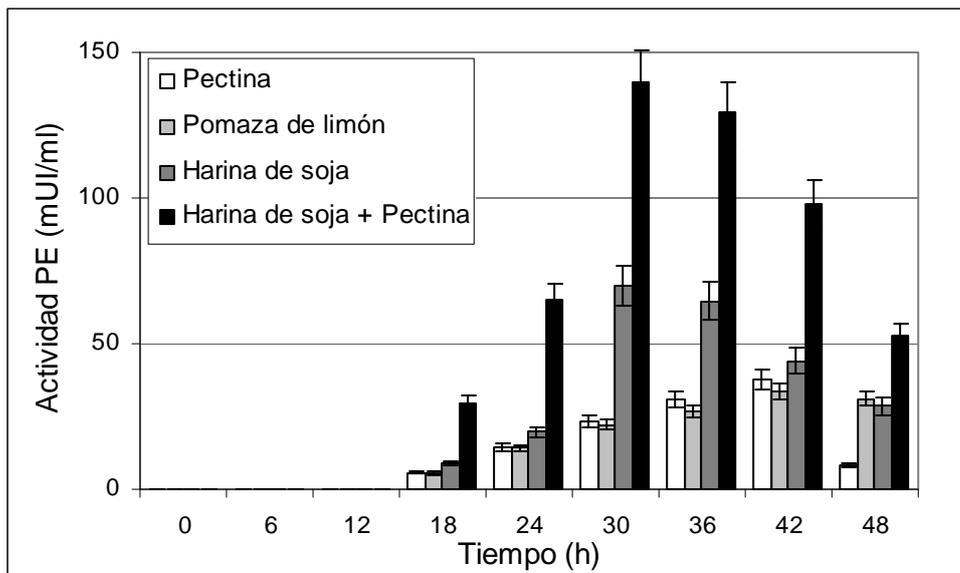


Figura 3.5 Evolución de la actividad de la PE en distintos medios líquidos.

Las actividades enzimáticas de los medios con HS fueron superiores a los medios de referencia independientemente del tiempo de cultivo. La presencia de HS redujo el tiempo en el cual se alcanzó la actividad máxima de 42 a 30 h. Si comparamos la actividad de los medios en este ensayo con el anterior (Tabla 3.2) observamos que los valores difieren aunque la diferencia es menor en el medio HS/pectina (140-160 mU/ml) que en el medio HS (70-125 mU/ml). Probablemente, la presencia de pectina minimice el efecto negativo de otros factores que pueden afectar negativamente la producción de la enzima y que aun no se han establecido.

En fermentador: se realizaron cultivos en biorreactor para determinar el cambio de escala en la producción de PE. El cultivo de hongos filamentosos en fermentadores tipo tanque agitado tiene cierta complejidad ya que los esfuerzos de corte del agitador pueden provocar la ruptura del micelio. Esta ruptura es mucho más problemática en hongos cenocíticos, esto es aquellos que no poseen tabiques en sus hifas. En nuestro caso, *A. kawachii* es un hongo tabicado, pero igualmente la posibilidad de daño mecánico debido al agitador debe de tenerse en cuenta. Por otra parte, el posible daño mecánico es mucho más perjudicial cuando el crecimiento fúngico se lleva a cabo en forma de micelio filamentosos disperso. En nuestro caso, el crecimiento es en forma de pellets lo cual, nuevamente, es un factor positivo. Igualmente, y de modo precautorio, se tomaron medidas para el armado y operación del fermentador considerando posibles cambios en la estructura de los pellets debidos al efecto de impacto de la paleta del agitador. Por ello, se decidió realizar los cultivos retirando los deflectores (baffles) y a bajas rpm. Además, se controló la cantidad de oxígeno disuelto a valores mayores del 20 % durante todo el proceso aunque cuando el crecimiento es en forma de pellets, la restricción de oxígeno puede ocurrir más bien por limitaciones difusionales dentro del pellet que en la interfase gas-líquido (Doran, 1998). Para una mejor comparación con los frascos agitados se empleó el medio con pectina (más reproducible) ya que es factible cuantificar el crecimiento por medida del peso seco.

En la Fig. 3.6 se muestra el curso del cultivo y la evolución de la actividad PE en tanque agitado. Nuevamente, *A. kawachii* creció formando pellets de modo similar a los cultivos en frascos, pero en este caso con un tamaño ~ 1,5 mm, menor en comparación con los típicos 3 mm de tamaño final observados en frasco. Un mayor esfuerzo de corte en el biorreactor que en los erlenmeyers podría considerarse, tentativamente, como causa de esta diferencia. No obstante, el peso seco en ambos sistemas fue muy parecido, lo mismo que el

consumo de la FCE y la actividad PE. Esta similitud quizás pueda deberse al hecho que sin deflectores, la fluidodinámica en el fermentador no fue tan diferente a la del frasco agitado.

Es interesante mencionar que en este caso también se observa el máximo de actividad PE (35,4 mU/ml) a las 42 h de cultivo, ambos valores similares a los encontrados en los cultivos en frascos. Este máximo es también seguido de una caída en la actividad. Anteriormente se había postulado que dicha disminución podría deberse a la inestabilidad de la enzima frente al incremento en los valores de pH. Sin embargo, en este caso el pH se controló automáticamente a un valor de 4,0, con lo cual no se puede aplicar la anterior hipótesis. Así, los cultivos en fermentador a pH controlado no mostraron una superioridad respecto a los realizados en frascos (actividad PE máxima y tiempos de cosecha) a pesar de la marcada disminución en el tamaño de los pellets. Por ello, se puede estimar que este cambio no afecta significativamente a la fisiología del hongo, al menos en cuanto a la producción de PE en las condiciones empleadas y el empleo de un tanque agitado sin deflectores es apropiado para el cambio de escala.

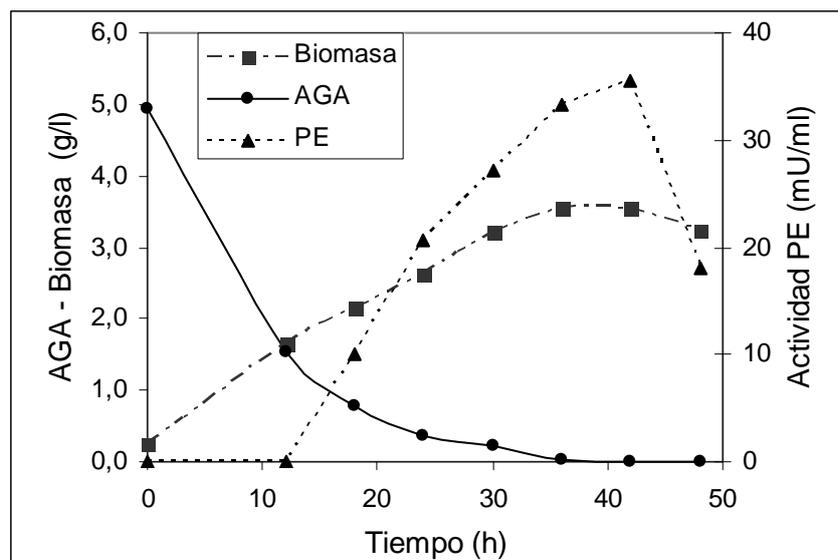


Figura 3.6 Crecimiento de *A. kawachii*, consumo de pectina (AGA, g/l) y actividad PE en biorreactor tipo tanque agitado sin deflectores utilizando pectina (5 g/l) como FCE. pH controlado a 4,0. Concentración de oxígeno disuelto > 20 % de saturación.

3.4.4 Optimización de la producción de PE en medio con harina de soja y pectina

En las últimas décadas los métodos estadísticos han sido aplicados a la optimización de medios para procesos biotecnológicos. Estos métodos incluyen diseños de bloques y factoriales a fin de identificar aquellos componentes que poseen algún efecto sobre la variable que se desea optimizar seguido de uno o más ensayos de superficie de respuesta para obtener

las concentraciones de los componentes estudiados que magnifiquen total o localmente la variable deseada (Kennedy and Krouse, 1999). La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otra. Esta metodología, por otra parte, permite determinar efectos principales e interacciones entre variables con relativamente pocos experimentos.

Anteriormente se observó que la máxima producción de PE de *A. kawachii* se alcanzó en el medio con harina de soja suplementado con pectina (5 y 0,5 g/l, respectivamente) obteniéndose ~ 140 mU/ml a las 30 h de cultivo en frascos. Se decidió por lo tanto optimizar la concentración de ambos componentes utilizando el diseño estadístico de Doehlert (Doehlert, 1970) El primer diseño de Doehlert se realizó centrado el polígono en las variables concentración de HS (7,5 g/l) y de pectina (0,75 g/l). En la Tabla 3.3 se muestran los resultados de la actividad PE para los 9 valores del ensayo determinada a las 30 h de cultivo.

Tabla 3.3 Primer diseño de Doehlert y actividad PE resultante para las 2 variables ensayadas: harina de soja y pectina.

Ensayo	Harina de soja		Pectina		Actividad PE (mU/ml)
	Codificado	(g/l)	Codificado	(g/l)	
0	0	7,5	0	0,75	215,3
0'	0	7,5	0	0,75	225,1
0''	0	7,5	0	0,75	220,2
1	0	7,5	1	1,25	381,7
2	0,866	10,0	0,5	1,00	303,4
3	0,866	10,0	-0,5	0,50	176,2
4	0	7,5	-1	0,25	244,7
5	-0,866	5,0	-0,5	0,50	391,5
6	-0,866	5,0	0,5	1,00	518,7

El resultado del análisis de varianza (ANOVA) y la estimación de los coeficientes para un modelo de segundo orden se presentan en la Tabla 3.4. Los valores se presentan por separado para cada efecto principal y las diferentes interacciones. Los efectos que presentan un valor de $P < 0,05$ son significativos con un nivel de confianza del 95,0 %. El modelo ajustado representó adecuadamente los datos ya que, la carencia de ajuste (lack of fit) no fue significativa con un valor de $P > 0,05$. La regresión fue significativa con un coeficiente de

determinación (R^2) de 0,95. La ANOVA muestra que la interacción $HS \times P$ no fue significativa. Curiosamente, la concentración de HS mostró un efecto negativo sobre la producción de PE. En contraposición el aumento de P tuvo un efecto positivo, pero no se encontró un valor óptimo.

Tabla 3.4 Valor de los coeficientes, calculados por ANOVA, en el modelo obtenido de acuerdo al 1er diseño de Doehlert. $R^2 = 0,95$.

Variables	Coeficientes	P
Constante	220,2	
P	88,1	0,0010
HS	-124,3	0,0005
P^2	93,0	0,0023
$P \times HS$	0	1,0000
HS^2	138,7	0,0010

En la Fig. 3.7 se representa la superficie que ajustó el modelo en la cual se puede observar como el aumento de HS disminuye la producción de PE en el rango de concentraciones de HS analizado (5-10 g/l).

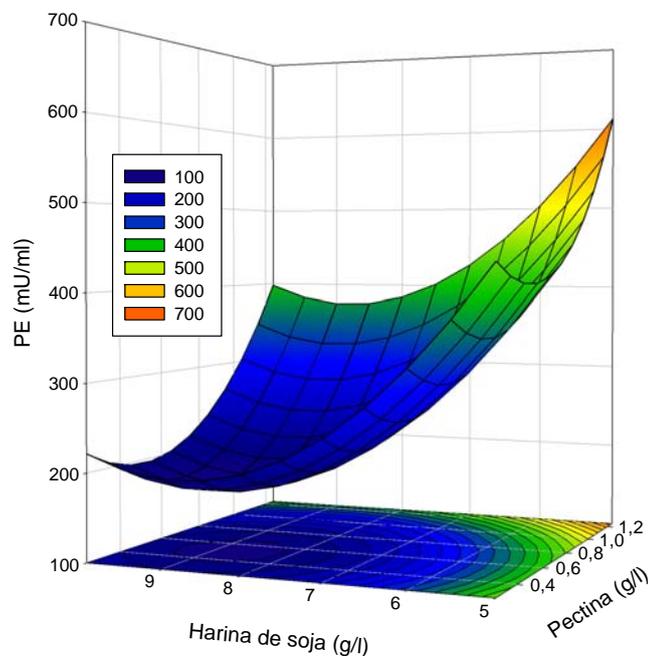


Figura 3.7 Efecto la concentración de harina de soja y pectina en la producción de PE de *A. kawachii*. Primer diseño experimental de Doehlert.

Teniendo en cuenta estos datos se llevó a cabo un nuevo diseño de Doehlert tomando como punto central el extremo de máxima actividad PE, decir con valores de 1 g/l pectina y de 5 g/l de harina de soja. Se seleccionaron 3 concentraciones de pectina y 5 concentraciones de harina de soja. En la Tabla 3.4 se muestran los valores utilizados en dicho ensayo y los resultados de la actividad enzimática hallada. El resultado del análisis de varianza (ANOVA) y la estimación de los coeficientes para un modelo de segundo orden se presentan en la Tabla 3.8. El único factor significativo fue P^2 pero con un valor de $P \sim 0,05$ lo cual sugiere que nos movimos en una región de concentración de factores en las cuales el modelo no puede hacer ninguna predicción. Por lo tanto se decidió realizar un tercer diseño, aunque tomando como punto central la relación de concentración HS/pectina 5/0,5 que dio el mayor nivel de actividad PE en el segundo diseño. En la Tabla 3.4 se muestran los valores utilizados en dicho ensayo y los resultados de la actividad enzimática hallada.

Tabla 3.4 Segundo diseño de Doehlert y actividad PE resultante para las 2 variables ensayadas: harina de soja y pectina.

Ensayo	Harina de soja		Pectina		Actividad PE (mU/ml)
	Codificado	(g/l)	Codificado	(g/l)	
0	0	5,0	0	1,00	473,6
0'	0	5,0	0	1,00	546,4
0''	0	5,0	0	1,00	510,0
1	0	5,0	1	1,50	582,9
2	0,866	7,5	0,5	1,25	437,1
3	0,866	10,0	-0,5	0,75	582,9
4	0	5,0	-1	0,50	728,6
5	-0,866	2,5	-0,5	0,75	546,4
6	-0,866	2,5	0,5	1,25	582,9

Los valores de los coeficientes para el segundo polinomio obtenido con estos datos así como también los valores del análisis de variancia se observan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Valor de los coeficientes, calculados por ANOVA, en el modelo obtenido de acuerdo al 2do diseño de Doehlert. $R^2 = 0,95$.

Variabes	Coficientes	P
Constante	510,0	
P	66,8	0,0864
HS	-31,5	0,2721
P ²	145,8	0,0482
P × HS	-105,2	0,1293
HS ²	-12,2	0,7497

Tabla 3.6 Tercer diseño de Doehlert y actividad PE resultante para las 2 variables ensayadas: harina de soja y pectina.

Ensayo	Harina de soja		Pectina		Actividad PE (mU/ml)
	Codificado	(g/l)	Codificado	(g/l)	
0	0	5,0	0	0,50	669,4
0'	0	5,0	0	0,50	710,0
0''	0	5,0	0	0,50	715,1
1	0	5,0	1	1,00	912,9
2	0,866	7,5	0,5	0,75	202,9
3	0,866	10,0	-0,5	0,25	507,1
4	0	5,0	-1	0,00	30,4
5	-0,866	2,5	-0,5	0,25	1014,3
6	-0,866	2,5	0,5	0,75	710,0

El resultado del análisis de varianza (ANOVA) y la estimación de los coeficientes para un modelo se indican en la Tabla 3.7

Tabla 3.7 Valor de los coeficientes, para la tercer experiencia, calculados por ANOVA, en el modelo obtenido de acuerdo al diseño de Doehlert.

Variables	Coefficientes	p
Constante	698,2	
P	192,7	0,0056
HS	-292,8	0,0024
P ²	-226,5	0,0100
P × HS	-0,1	0,9986
HS ²	-43,9	0,1945

En este experimento, al igual que en el primero, tanto la concentración de pectina como la de harina de soja tienen un efecto significativo, aunque opuestos, para la actividad PE, mientras que no se encontró efecto significativo en las variables cuadráticas (P² y HS²) o la interacción P × HS. La superficie de respuesta que representa la ecuación que ajusta el modelo se puede observar en la Fig. 3.8.

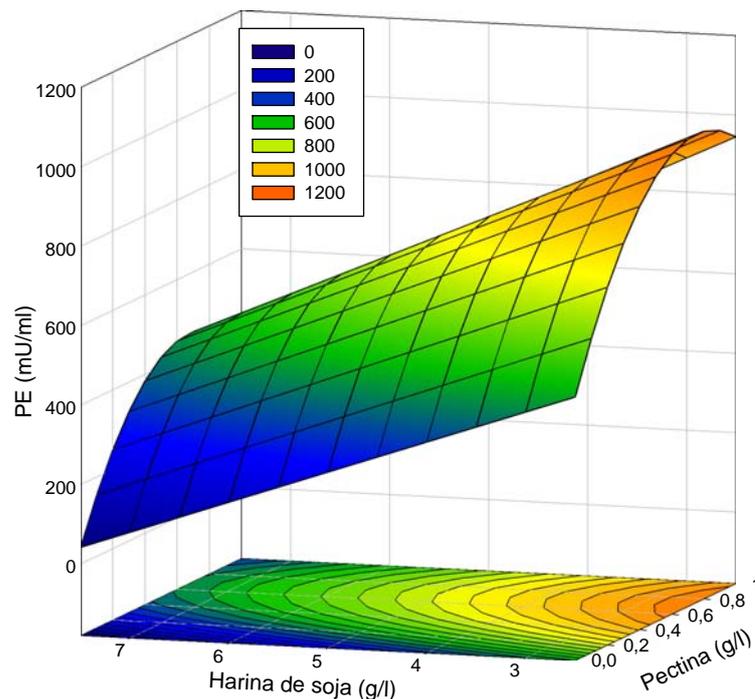


Figura 3.8 Efecto la concentración de harina de soja y pectina en la producción de PE de *A. kawachii*. Tercer diseño experimental de Doehlert.

Así se llegó a la mejor combinación, para esta serie de experimentos, de harina de soja y pectina, es decir 2,5 g/l y 0,25 g/l, respectivamente. Estos valores no corresponden al máximo del polinomio el cual podría alcanzarse con nuevos diseños; sin embargo, los valores obtenidos implican una substancial mejora respecto de los de partida. Es importante resaltar

cual es la magnitud de la mejora. La actividad enzimática en la condición inicial (punto central del 1er diseño) fue del orden de 200 mU/ml que es un valor típico de los ensayos que se hicieron con HS suplementada con pectina. Luego de la optimización la actividad obtenida fue de ~ 1000 mU/ml lo cual es considerable si tenemos en cuenta que solo se variaron dos componentes del medio.

Los diseños estadísticos como el empleado son empíricos es decir funcionan como caja negra y no explican las causas de la interacciones entre los factores. La concentración óptima de HS y pectina probablemente refleje un balance entre el efecto inductor de la pectina (hasta un cierto límite) y parcialmente de la HS y el efecto de represión que tiene la HS cuando su concentración aumenta mas allá de un cierto límite.

3.4.5 Comparación de la cinética de producción de PE en Erlenmeyers y fermentadores empleando el medio optimizado

La combinación de concentraciones de harina de soja (2,5 g/l) y pectina (0,25 g/l) encontradas luego de la optimización estadística previamente descrita fue utilizada en cultivos de 48 h de duración, tanto en frascos como en planta, para la producción de PE. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3.9. En ambos casos, el perfil de actividad PE observado fue similar, se detectó actividad PE a partir de las 12 h de cultivo con el máximo a las 42 h. Sin embargo a diferencia de lo observado con el medio con pectina, se obtuvo una mayor actividad PE en fermentador que en frascos. Esto indica claramente que un adecuado balance de un medio de cultivo puede poner en evidencia el beneficio que un cambio de reactor o de escala puede producir sobre los rendimientos de un cultivo.

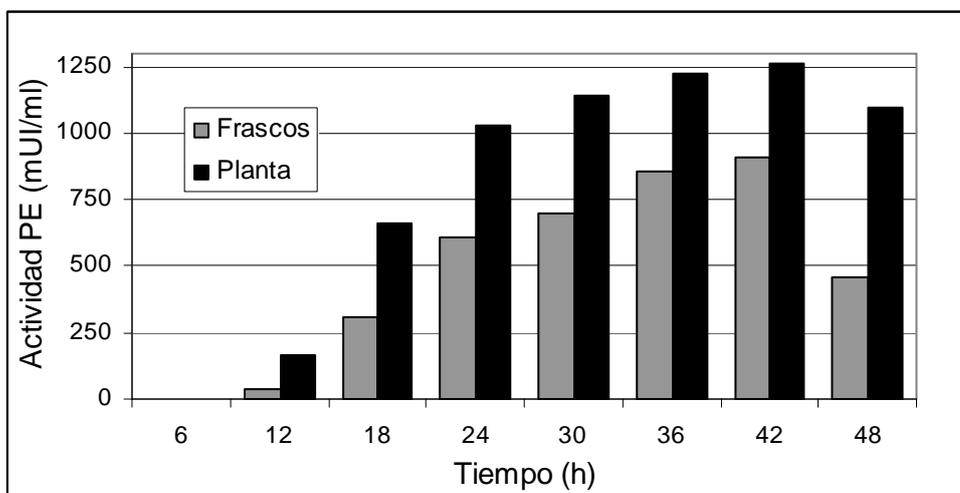


Figura 3.9 Actividad PE de *A. kawachii* utilizando harina de soja y pectina como FCE, en cultivos en erlenmeyer y fermentador.

3.5 Conclusiones

Aspergillus kawachii produce actividad pectinesterasa en cultivos sólidos empleando pomaza de limón y perlita impregnada en medio líquido (conteniendo pectina como FCE) y particularmente en afrecho de trigo con pectina donde se alcanzó la máxima actividad.

En medio líquido la PE se expresó en presencia de pectina o de algún componente derivado que la contenga. Así, la actividad PE resultó positiva en cultivos donde la FCE fue: ácido galacturónico, pectina, pomaza de limón y harina de soja. La harina de soja mostró una superioridad en la actividad de PE encontrada, que a su vez se incrementa en presencia de pectina.

El pH inicial del medio de cultivo no afecta la producción de PE, alcanzándose valores comparables en cultivos tanto a pH 4,0 como a pH 2,5.

Cuando se analizaron cultivos mixtos empleando pectina-glucosa como FCE, los resultados revelaron que no se observa represión de la síntesis de PE por glucosa y se confirma que el control de la producción es principalmente de naturaleza inductiva.

La producción de PE en harina de soja-pectina se optimizó utilizando el método de superficie de respuesta. Se partió de un medio inicial (conteniendo HS 5,0 g/l y pectina 0,5 g/l) y se estableció un medio optimizado (con HS 2,5 g/l y pectina 0,25 g/l) en el cual se alcanzó una actividad PE 6 veces mayor respecto al medio inicial. De esta manera, no sólo se logró un aumento en la producción de PE, sino también una reducción en la cantidad de FCE empleada en el medio de cultivo.

Los cultivos de *A. kawachii* en fermentador revelaron una producción de PE mayor que la encontrada en frascos erlenmeyeres, utilizando la misma composición de medio, a todas las horas de cultivo analizadas.

3.6 Bibliografía

1. Aidoo, K.E., Hendry, R., and Wood, B.J.B. (1981) Estimation of fungal growth in solid state fermentation system. *European Journal Applied Microbiology* 12, 6-9.
2. Andersen, A.K., Larsen, B., and Grasdalen, H. (1995) Sequential structure by ¹H NMR as a direct assay for pectinesterase activity. *Carbohydrate Research* 273, 93-98.
3. Asenjo, J.A., and Merchuk, M.D. (1994). *Bioreactor System Design*, (Marcel Dekker: New York).
4. Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489.

5. Boulos, N.N., Greenfield, H., and Wills, R.B.H. (2000) Water holding capacity of selected soluble and insoluble dietary fibre. *International Journal of Food Properties* 3, 217-231.
6. Castilho, L.R., Medronho, R.A., and Alves, T.L.M. (2000) Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 71, 45-50.
7. Cavalitto, S.F., Arcas, J.A., and Hours, R.A. (1996) Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnology Letter* 18, 251-256.
8. Chen, H., Rubenthaler, G.L., Leung, H.K., and Baranowsky, J.D. (1988) Chemical, physical, and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. *Cereal Chem.* 65, 244-247.
9. Contreras Esquivel, J.C. Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. 2003. Universidad Nacional de La Plata.
Ref Type: Thesis/Dissertation
10. de Vries, R.P., and Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 65, 497-522.
11. Dinu, D., Nechifor, M.T., Stoian, G., Costache, M., and Dinischiotu, A. (2007) Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *Journal of Biotechnology* 131, 128-137.
12. Doehlert, D.H. (1970) Uniform shell designs. *Applied Statistics* 231-239.
13. Doran, P. (1998). *Bioprocess Engineering Principles*, (: London).
14. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J., Krobers, P.A., and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
15. Friedrich, J., Cimerman, A., and Steiner, W. (1992) Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger* on sucrose. *Food Biotechnology* 6, 207-216.
16. Hours, R.A., and Sakai, T. (1994) Protopectinase production in solid state culture of *Aspergillus awamori*. *Biotechnology Letters* 16, 721-726.
17. Huisman, M.M.H., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2003). Pectin substances from soybean cell walls distinguish themselves from other planta cell wall pectins. In: *Advances in Pectin and Pectinase Research*. Voragen et al, ed. (Kluwer Academic : The Netherlands), pp. 159-168.
18. Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., and Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* 77, 215-227.
19. Kennedy, M., and Krouse, D. (1999) Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* 23, 456-475.

20. Klavons, J., and Bennett, R. (1986) Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *Agriculture Food Chemistry* 34, 597-599.
21. Kojima, Y., Sakamoto, T., Kishida, M., Sakai, T., and Kawasaki, H. (1999) Acid condition-inducible polygalacturonase of *Aspergillus kawachii*. *Journal of Molecular Catalysis B* 6, 351-357.
22. Lario, Y., Sendra, E., García-Pérez, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., and Pérez-Alvarez, J.A. (2004) Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5, 113-117.
23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
24. Markovic, O., and Jornvall, H. (1992) Disulfide bridges in tomato pectinesterase: variations from pectinesterases of other species; conservation of possible active site segments. *Protein Sci.* 1, 1288-1292.
25. Martínez-Trujillo, A., Aranda, J.S., Gómez-Sánchez, C., Trejo-Aguilar, B., and Aguilar-Osorio, G. (2009) Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 40-47.
26. McAunley, A. Basic soil properties. 2005. Montana State University.
Ref Type: Report
27. McCleart, B.V. (2001). *Advances Dietary Fiber Technology*, (Blackwell Science Ltd. Oxford).
28. Mudgett, R.E. (1986). Solid State Fermentation. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, ed. (Mo Graw Hill: New York, Londres, Paris), pp. 66-83.
29. Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., and Rinzema, A. (2000) Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *TIBTECH* 18, 356-360.
30. Oriol, E., Schettino, B., Viniegra-Gonzales, G., and Raimbault, M. (1988) Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *Journal of Fermentation Technology* 66, 57-62.
31. Parenicová, L. Pectinases of *Aspergillus niger*: A Molecular And Biochemical Characterisation. 2000. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.
Ref Type: Thesis/Dissertation
32. Pedrolli, D.B., Gomes, E., Monti, R., and Carmona, E.C. (2008) Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. *Appl.Biochem.Biotechnol.* 44, 191-200.

33. Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, I., and Arst, H.N.Jr. (2008) Review: Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology* 16, 291-300.
34. Raimbault, M. (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1.
35. Rojas, N., Ortiz, G., Baruque, D., Cavalitto, S., and Ghiringhelli, P. (2011) Production of heterologous polygalacturonase I from *Aspergillus kawachii* in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38, 1437-1447.
36. Silva, D., Tokuioshi, K., da Silva Martins, E., da Silva, R., and Gomes, E. (2005) Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry* 40, 2885-2889.
37. Stephen, A.M., and Cummings, J.H. (1979) Water-holding by dietary fibre in vitro and its relationship to faecal output in man. *Gut*. 20, 722-729.
38. Vilariño, C., Hours, R.A., and Cascone, O. (1993) Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol* 26, 107-110.
39. Voget, C.E., Vita, C.E., and Contreras Esquivel, J.C. (2006) One-step concentration and partial purification of non-acidic *Aspergillus kawachii* polygalacturonases by adsorption to glass fiber microfilters. *Biotechnol.Lett.* 28, 233-239.
40. Wong, S.S., Ho, T.Y., Ngan, A.H., Woo, P.C., Que, T.L., and Yuen, K.Y. (2001) Biotyping of *Penicillium marneffe* reveals concentration-dependent growth inhibition by galactose. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1416-1421.

Capítulo 4

Pectinesterasa de *Aspergillus kawachii*: purificación y caracterización

4.1 Resumen

Se purificó la pectinesterasa (PE) de *A. kawachii* (IFO 4308) a partir de un medio de cultivo líquido (con pectina como FCE e inductor). La purificación se realizó a partir del sobrenadante concentrado y desalinizado mediante cromatografías sucesivas de intercambio catiónico, aniónico y catiónico con gradiente expandido. Se obtuvo un único pico de actividad PE.

La enzima purificada se caracterizó con respecto las propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y catalíticas más relevantes. El PM de la PE resultó ser de 44,5 kDa (por SDS-PAGE) y de 54 kDa (por exclusión molecular, columna S-100). El PI de la enzima fue de 3,8 por IEF. El zimograma reveló que la banda posee actividad de PE. La enzima probablemente no está glicosilada (no se retiene en Concanavalina A). La PE mantuvo el 70 % de actividad residual luego de 1 h a 50°C, siendo inactivada a 70°C. Su pH óptimo es 4,5. Además posee un 25 % de su actividad máxima a pH 2, propiedad inusual para las PE. El efecto inactivante observado a bajos valores de pH se revierte substancialmente luego de la reincubación a pH 5,0. El agregado de diferentes sustancias presentes en el jugo de limón (fructosa, sacarosa, pectina y proteínas) como así también jugo de limón natural aumentó la estabilidad de la enzima a pH 2,5, en tanto que glucosa y citrato la disminuyeron. Los diferentes cationes ensayados no incrementaron la actividad enzimática, en tanto que K^+ , Zn^{+2} y Fe^{+3} la disminuyeron substancialmente. Los parámetros cinéticos fueron: $K_m = 0,1692$ mg/ml y $V_{max} = 8,5172$ μ mol/min·ml. Se determinó que el modo de acción de la enzima fue aleatorio, similar a otras PE de origen fúngico. Se obtuvo la huella peptídica de la PE pero no fue posible identificar a la proteína en las bases de datos disponibles. La clarificación de jugo de limón natural fue satisfactoria y más efectiva en comparación con la PE de *A. aculeatus*, otorgándole una potencial aplicación en la industria de jugos cítricos.

4.2 Introducción

La pectinesterasa (PE, EC 3.1.1.11) es una enzima que cataliza la desesterificación de la pectina, componente fundamental de la pared celular vegetal, con formación de metanol y pectina con un menor grado de desesterificación. La PE juega un papel primordial en la degradación completa de la pectina ya que potencia la actividad de las poligalacturonasas y las pectatoliasas al formar regiones conteniendo residuos de ácido galacturónico desesterificados. Por otra parte, las características fisicoquímicas de la pectina se encuentran en buena medida determinadas por el grado de esterificación y la distribución de los grupos metoxilos (Christgau et al., 1996). Así, la PE cumple un rol fundamental, modulando las características de la pectina, alterando su grado de esterificación y su degradabilidad. El conocimiento y control de estos procesos resulta fundamental en la industria de la pectina y en el procesamiento de los materiales vegetales que la contiene. La PE juega un rol importante en Tecnología de Alimentos debido a su actividad sobre diversas materias primas vegetales. Se utiliza en combinación con otras pectinasas (poligalacturonasas y/o pectatoliasas) para depolimerizar pectina tanto en procesos de clarificación de jugos de fruta de pepita (i.e. manzana y pera) como en la reducción de la viscosidad de otros productos alimenticios. Hay otros casos en los cuales la PE se utiliza sola como son la clarificación seguida de concentración de jugos cítricos (limón) y en la elaboración de pectinas de bajo metoxilo. Otros usos incluyen la gelificación de frutas (Kashyap et al., 2001) y la modificación de la textura y reología de productos frutales y vegetales (Javeri et al., 1991).

Tal como se indicara en el Capítulo 2, *A. kawachii* produce PE en medios con pectina cuya actividad se expresa en un rango de pH comprendido entre 2,0 y 5,5. En este capítulo se describe la purificación y propiedades de la única PE producida por este hongo en los medios con pectina. Los resultados sugieren que es una enzima interesante para su empleo en la clarificación de jugos cítricos, particularmente de limón donde se requiere el uso de enzimas con altos valores de actividad y estabilidad a pHs muy bajos (alrededor de 2). Finalmente, se demostró su superior capacidad clarificante respecto a un preparado comercial equivalente.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Reactivos y soluciones

Buffer cítrico fosfato (BCP): ácido cítrico 50 mM, fosfato disódico 25 mM, ajustado a pH 6,0 con NaOH. Se lleva a los diferentes pHs con HCl. Buffer NaAc (BNaAc): ácido acético 20 mM ajustado con NaOH.

Se utilizaron 2 tipos de pectinas SIGMA del mismo origen (cítrico) con diferentes grados de metoxilación (GM), a saber: pectina de cáscara de citrus (P 9135) y pectina esterificada de cáscara de citrus (P 9561).

El rojo de rutenio y las membranas de celulosa para diálisis (corte 12400 Da) fueron obtenidos de Sigma. Los rellenos para columnas cromatográficas Sepharose Q Fast Flow, Sepharose SP, Fast Flow Sephacryl S-100, Conavalina A - Sepharose 4B (ConA-Sepharose), Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B fueron obtenidos de Pharmacia Biotech, como así también las columnas PD-10, los patrones de proteína de bajo peso molecular (14,4 a 94 kDa) para electroforesis, los anfolitos para isoelectroenfoque (IEF) en el rango pH 2,5–5,0 (Pharmalyte) y los patrones de bajo pI (3,6 a 9,3).

La 2,4-pentanodiona (acetil acetona, A 3511) y la alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (A 2404) fueron de Sigma.

El porcentaje de ácido galacturónico se determinó por el método de *mhd*f (Blumenkrantz and Asboe-Hansen G., 1973) y el de pentosas por el del orcinol (Herbert et al., 1971). El porcentaje de humedad se determinó a 60°C para evitar la degradación térmica de la pectina.

La determinación del GM de las pectinas se llevó a cabo por el método titulométrico (Singthong et al., 2004). Para ello se disolvieron 500 mg de pectina en 100 ml de agua destilada. A dicha solución se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0,1 N (V inicial). Luego se agregaron 10 ml de NaOH 0,5 N y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min (desesterificación química de la pectina). El NaOH remanente se neutralizó con HCl 0,5 N. Finalmente, se realizó una segunda titulación con NaOH 0,1 N (V final). El GM se calculó de la siguiente manera:

$$GM (\%) = \left(\frac{V_{final}}{V_{final} + V_{inicial}} \right) \times 100$$

4.3.2 Pectinesterasa comercial

Se utilizaron 2 PE comerciales, a saber: una (de origen fúngico) de *Aspergillus aculeatus* (Novoshape, Novo Nordisk, Denmark) y otra (de origen vegetal) de cáscara naranja (P 5400, Sigma).

4.3.3 Condiciones de cultivo

Se realizó un cultivo líquido de 42 h de *A. kawachii* en un medio con pectina cítrica, triptona y sales en las condiciones descritas en el capítulo 2, en frascos agitados. La

concentración de la pectina y triptona fueron de 5,0 y 2,5 g/l, respectivamente y el pH inicial 4,0. Este fue el material de partida para la purificación de la PE.

4.3.4 Purificación de la PE

Todos los procedimientos de cromatografía en columna se realizaron utilizando un equipo AKTA-FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) a temperatura ambiente. Las etapas del proceso de purificación se describen a continuación:

Aislamiento primario: Se procesaron en total de 2,8 litros de medio. La biomasa y los sólidos en suspensión se separaron mediante filtración a través de tela (voile de nylon) y posterior centrifugación ($6.000 \times g$, 10 min, 4°C). El sobrenadante se llevó a pH 5,0 con HCl 0,5 N y se concentró por evaporación a presión reducida utilizando un rotavapor (Büchi, Suiza) a 42°C . Posteriormente, las proteínas del medio concentrado se precipitaron con acetona en una relación 1:2,5 (medio:acetona) a 4°C durante 6 h con agitación continua. El precipitado obtenido se separó por centrifugación a $6000 \times g$ durante 20 min, resuspendiéndose finalmente en BAcNa, pH 5,0. Para clarificar la solución resultante, la misma se filtró a través de membranas de fibra de vidrio borosilicato ($\varnothing = 47$ mm, diámetro nominal de poro: $0,45 \mu\text{m}$, G15WP04700, Osmonics™) en un sistema de filtración por vacío. Estas membranas contienen una resina acrílica como ligante (binder) según información técnica del fabricante.

Desalinizado I: La solución de proteína clarificada se pasó por una columna G-25 ($1,6 \times 70$ cm) con 90 ml de gel equilibrada con buffer citrato de sodio (20 mM, pH 3,0). El caudal de elución fue de 1 ml/min y el volumen de fracción recolectado fue de 10 ml.

Cromatografía de intercambio catiónico (CIC) I: Las fracciones recolectadas de G-25 con actividad PE se juntaron en un pool común y se aplicaron a la columna Sepharose-SP ($2,6 \times 15$ cm) con 60 ml de relleno, equilibrada con buffer citrato de sodio (20 mM, pH 3,0). Bajo estas condiciones la actividad PE se adsorbió a la columna. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente de NaCl, de 0 a 0,5 M en buffer citrato de sodio (20 mM, pH 3,0), equivalente a 2 volúmenes de columna con un caudal de 5 ml/min. El volumen de fracción recolectada fue de 5 ml.

Desalinizado II: Las fracciones con actividad PE provenientes de la CIC I, se combinaron y el pool resultante se desalinizó mediante la columna G-25 equilibrada con BNaAc (20 mM, pH 5,0).

Cromatografía de intercambio aniónico (CIA): El eluido de la CIC I desalinizado se aplicó a una columna de Sepharose Q (2,6 × 10 cm) con 50 ml de relleno, equilibrada con BNaAc (20 mM, pH 5,0). En esta condición, la actividad PE se adsorbió a la columna siendo la misma eluida con un gradiente de NaCl (0 a 0,5 M) en BNaAc (20 mM, pH: 5,0). Las fracciones colectadas fueron de 3 ml.

Desalinizado III: Las fracciones con actividad PE provenientes de la CIA, se combinaron y el pool resultante se desalinizó mediante la columna G-25 equilibrada con buffer citrato de Na (20 mM, pH 3,0).

Cromatografía de intercambio catiónico II (CIC II): La solución del desalinizado III se aplicó nuevamente a la columna Sepharose-SP, pero en esta oportunidad, la actividad adsorbida se eluyó con un gradiente lineal expandido de NaCl (0,1 M a 0,25 M) en buffer citrato de Na (20 mM, pH 3,0), utilizando 3 volúmenes de columna.

Diálisis: Las fracciones con actividad PE del CIC II se juntaron y dializaron por 24 h en BNaAc (5,0 mM, pH: 5,0). El dializado se distribuyó en pequeños volúmenes y se liofilizó (Liofilizador Rificor L-3, Argentina). Cuando fue necesario, el liofilizado se resuspendió en agua deionizada y se conservó (por no más de 48 h) a 4°C hasta su utilización.

4.3.5 Técnicas analíticas y bioquímicas

4.3.5.1 Técnicas de medida de actividad pectinesterasa

4.3.5.1.1 Técnica de verde de bromocresol

La determinación de la presencia de actividad PE se realizó mediante la técnica del verde de bromocresol (VB). Para ello, se mezcló 800 µl de una solución al 0,5 % de pectina cítrica (GM 53) conteniendo VB al 0,017 % con 20 µl de solución de enzima, ajustada a pH 5, en la celda del espectrofotómetro (Beckman DU 640, EE.UU.). Se determinó la disminución de absorbancia de la mezcla de reacción a 617 nm, a 37°C, durante 5-15 min (Vilariño et al., 1993).

4.3.5.1.2 Técnica de alcohol oxidasa

La actividad de PE se cuantificó utilizando solución al 0,5 % de pectina cítrica (P 9135, Sigma) en BCP ajustada al pH en estudio. Se utilizó 190 µl de pectina al 0,5 % en BCP al pH deseado, se agregó 10 µl de solución de enzima y se incubó a 37°C durante 30 min. El

metanol liberado en la mezcla de reacción se cuantificó por el método de la alcohol oxidasa (AO) (Klavons and Bennett, 1986) según se detalla a continuación.

La reacción enzimática se detiene mediante el agregado de buffer Tris-HCl pH 9,0 para llevar a pH 7,0, luego se agregan 300 µl de solución de AO (conteniendo 0,66 U/ml) y se incuba a 25°C durante 20 min. El formaldehído liberado se revela mediante el agregado de 500 µl de solución de 2,4-pentanodiona (20 mM) en acetato de amonio (2 M) e incubación (15 min a 60°C) para formar un producto de condensación coloreado (3,5-diacetil-1,4-dihidro-2,6-metilpiridina). Se deja enfriar a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 412 nm. Como patrón se utiliza una curva de calibración de metanol en el rango de 0 a 10 mM.

La unidad de actividad PE se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un µmol de metanol por minuto en las condiciones de reacción establecidas.

4.3.5.2 Determinación de proteínas

Las proteínas solubles se determinaron según la técnica de Lowry (Lowry et al., 1951).

4.3.5.3 Técnicas electroforéticas

4.3.5.3.1 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

El análisis mediante SDS-PAGE se realizó utilizando la unidad Mighty Small II (Hoefler SE 260, Amersham) de acuerdo a las condiciones de corrida descritas por Smith (Smith, 1984). La tinción de las bandas se realizó tanto con Azul Brillante de Coomassie o bien con plata dependiendo de la sensibilidad requerida. Para la determinación del PM se utilizaron patrones de bajo PM conteniendo proteínas en el rango de 14,4 a 94,0 kDa (Sigma).

4.3.5.3.2 Electroforesis nativa de proteínas

Se siguió el procedimiento descrito anteriormente sin hervir las muestras, aboliendo el empleo de SDS y β-mercaptoetanol.

4.3.5.3.3 Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo utilizando el sistema Multiphor II (Amersham) a 8°C. El gel se preparó con anfolitos adecuados para el rango de pH 3-10, según las indicaciones del fabricante. Como buffer catódico se utilizó una solución de H₂SO₄ (0,1 M) y como buffer anódico una solución de NaOH (0,1 M). Los patrones de pI

correspondieron al rango de pH 3,6 a 9,3. Para visualizar las bandas del IEF, el gel se tiñó con azul de Coomassie.

4.3.5.4 Cromatoenfoco

El cromatoenfoco (CE) es una cromatografía de intercambio iónico en la cual la muestra adsorbida se eluye por cambios de pH. En el CE aniónico, las proteínas se adsorben a la columna a valores de pH mayores que su pI y luego se desorben mediante la elución con un gradiente descendiente de pH. En nuestro caso, el CE se realizó utilizando una columna mono P (intercambiador aniónico débil). Para la primer corrida se utilizó como buffer de inicio bis-Tris-HCl (0,025 M, pH 6,3) y como eluyente polibuffer 74® (Amersham) diluido 1/10 a pH 4,0. La segunda corrida se realizó en las mismas condiciones que la anterior pero se utilizó como eluyente polibuffer 74® diluido 1/10 a pH 3,0. La columna se lavó con NaOH 5,0 M (1-2 ml) previamente a ser equilibrada con el buffer de inicio. La cantidad de muestra inyectada fue de 0,5-2,0 ml y el gradiente se efectuó con un caudal de 1 ml/min.

4.3.5.5 Zimograma

Se colocó un gel de agarosa al 1,0 % conteniendo pectina al 0,1 % en BCP, pH 5,0, sobre el gel nativo o el IEF y se incubó a 37°C durante 1 h. Transcurrido dicho lapso, el gel de agarosa/pectina se lavó varias veces con agua destilada y se tiñó con rojo de rutenio al 0,02 %. Luego se procedió a la decoloración con agua destilada hasta la aparición de las bandas reveladoras de actividad PE sobre la pectina. Toda la operación se realizó siguiendo la técnica de Ried, con modificaciones (Ried and Collmer, 1985).

4.3.5.6 Determinación de PM mediante cromatografía de exclusión molecular (CEM)

Para la determinación del PM de la PE mediante CEM se utilizó la columna Sephacryl S100 (XK16/70) equilibrada con BNaAc, pH 5,0, conteniendo 0,15 M de NaCl. El volumen de muestra inyectado fue de 0,5 ml y el caudal 1,0 ml/min. Se colectaron fracciones de 10 ml. Para la calibración de la columna se emplearon patrones de bajo PM (13,7 a 67,0 kDa). Para la determinación del volumen total (V_t) y del muerto (V_o) se utilizaron CoCl_2 y azul dextrano, respectivamente. La recta de calibración se obtuvo graficando $K_{av} [(V_e - V_o)/(V_t - V_o)]$ en función del log PM. El K_{av} relaciona el volumen de elución (V_e) de una molécula con el volumen total disponible. Para el cálculo del PM mediante regresión lineal se utilizó el programa estadístico MINITAB.

4.3.5.7 Determinación de glicosilación

La posible glicosilación de la PE se determinó mediante un ensayo de adsorción a Conavalina A-Sepharosa. La matriz de afinidad se cargó en una columna de 5 ml (HR 5/10) siendo acondicionada de acuerdo al protocolo descrito por Raab (Raab, 1992). Una vez inyectada la muestra (500 μ l), la columna se lavó con 10 ml del buffer de equilibrio y luego con BAcNa (0,1 M, pH 5,5) conteniendo α -metil-manósido 0,5 M. Las fracciones colectadas fueron de 1 ml.

4.3.6 Propiedades de la enzima

4.3.6.1 Estabilidad térmica

La estabilidad de la PE se determinó incubando 4,3 μ g de PE purificada en BCP, pH 5,0, durante 1 h a diferentes temperaturas en el rango de 40°C a 80°C. Transcurrido dicho tiempo, la muestra de enzima se enfrió en baño de hielo-agua y la actividad residual se determinó mediante la técnica del VB.

4.3.6.2 pH óptimo

El pH óptimo de la PE se determinó utilizando 0,5 % de pectina cítrica (GM 53 %) en BCP en el rango de pH 2,0 a 6,0 a 37°C. El BCP se llevó a pH 6,0 con NaOH y luego se disminuyó el pH con HCl a cada uno de los pHs de medida. La actividad se determinó empleando la técnica de la alcohol oxidasa.

4.3.6.3 Estabilidad al pH

Para estudiar de la estabilidad al pH se colocaron 8,7 μ g de PE en BCP (rango de pH 2,0 a 5,0, volumen final 100 μ l), a 37°C durante 60 min a cada pH. Cumplido dicho tiempo, las muestras fueron rápidamente enfriadas en baño de hielo, mezcladas con 100 μ l de BCP, pH 5,0. La actividad residual fue determinada utilizando la técnica del VB. Para determinar la reversibilidad de la actividad PE luego de la incubación a distintos pHs, cada una de las fracciones de la enzima preincubada a cada pH fue llevada a pH 5,0, durante 1 h a 37°C. Luego de transcurrido dicho tiempo se midió la actividad residual. También se determinó la cinética de inactivación a pH 2,5 (valor cercano al del pH del jugo de limón: \sim 2,6) de las PEs de *A. kawachii* y de *A. aculeatus*. Las muestras fueron tomadas cada 30 min, llevadas a pH 5,0 para seguidamente determinar la actividad residual por la técnica del VB. El tiempo total de incubación fue de 2 h.

Se estudió el efecto de algunas sustancias representativas presentes en el jugo de limón sobre la estabilidad de PE. Las PE de *A. kawachii* y de *A. aculeatus* se incubaron durante 1 h a pH 2,5 con cada una de las siguientes sustancias, todas presentes en concentraciones similares en el jugo de limón: albúmina (como equivalente de las proteínas del jugo) 1 g/l, glucosa 5 g/l, fructosa 9 g/l, sacarosa 2 g/l, pectina 5 g/l y ácido cítrico 40 g/l. El efecto total de todos los componentes del jugo de limón real se determinó mediante incubación de la PE en jugo de limón obtenido en el laboratorio mediante un exprimidor de piña fija a partir de limones comerciales (*Citrus limon* var. Lisbon). El jugo de limón obtenido fue filtrado por tela (voile de nylon) para eliminar remanentes de pulpa en suspensión y utilizado inmediatamente.

4.3.6.4 Clarificación de jugo de limón

Los ensayos se realizaron sobre jugo de limón obtenido como se detalló anteriormente. Las enzimas evaluadas fueron una muestra purificada de la PE de *A. kawachii* y un preparado comercial desalado de *A. aculeatus* a modo de comparación.

Sobre 100 ml de jugo se adicionaron 100 μ l de cada una de las soluciones enzimáticas con 3,38 mU/ml en ambos casos, equivalentes a 100 μ g/ml de proteína (PE de *A. aculeatus*) y a 37 μ g/ml de proteína (PE de *A. kawachii*). Las clarificaciones se realizaron a 37°C durante 24 h. Las muestras se centrifugaron a 365 \times g, 10 min en un tubo cónico graduado de 10 ml. La evolución de la clarificación se llevó a cabo tanto por medida de la transmitancia a 650 del sobrenadante como por medida del volumen del sedimento (%) luego de centrifugar.

4.3.6.5 Efecto de diferentes cationes en la actividad PE

Para estudiar el efecto de los cationes en la actividad PE, el sustrato (pectina cítrica, GM 53) al 0,5 % se dializó frente a agua destilada y posteriormente se agregó cantidad suficiente de NaOH 0,5 M hasta alcanzar pH 5,0. Luego se incorporó cada catión a ensayar en la mezcla de reacción (concentración final, 0,1 mM). Los cationes ensayados individualmente (y las sales utilizadas en cada caso) fueron: Na⁺ (NaCl), K⁺ (KCl), Mg⁺² (MgCl₂·6H₂O), Ca⁺² (CaCl₂·2H₂O), Cu⁺² (CuSO₄·5H₂O), Mn⁺² (MnCl₂·4H₂O), Zn⁺² (ZnSO₄·7H₂O), Fe⁺³ (FeCl₃·6H₂O) y un testigo sin el agregado de catión. La actividad se determinó mediante la técnica de VB.

4.3.6.6 Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m sobre pectina cítrica (GM 53 %) se realizó en BCP, al pH óptimo, a 37°C, utilizando concentraciones de sustrato en el

rango de 1 a 20 mg/ml. El metanol liberado se determinó mediante el método enzimático de la AO. El ajuste al modelo de Michaelis-Menten se verificó mediante regresión no lineal utilizando el programa MINITAB o Sigma Plot. Para la comparación de las curvas del modelo entre diferentes enzimas se utilizó el test F.

4.3.7 Modo de acción

La PE purificada de *A. kawachii* se utilizó para desesterificar pectina en paralelo con 2 PE comerciales (de *A. aculeatus* y de cáscara de naranja). Previamente a su utilización ambas PE comerciales fueron desaladas mediante una columna PD-10 en BCP, pHs 5,0 y 7,0, respectivamente.

4.3.7.1 Desesterificación enzimática de la pectina cítrica

Se llevó a cabo la desesterificación enzimática continua con 20 ml de solución de pectina cítrica de alto metoxilo (al 0,5 %) a 37°C en un reactor termostatzado con agitación hasta alcanzar el GM deseado. La desesterificación se llevó a cabo a pH 5,0 (PE de *A. aculeatus* y de *A. kawachii*) y a pH 7 (PE de naranja). El pH de la mezcla de reacción se midió mediante pHmetro. El pH se mantuvo constante (pH requerido \pm 0,1 Unidad) con el agregado de NaOH 0,1 N. Concluida la desesterificación la solución de pectina resultante se calentó a 100°C durante 5 min para inactivar las enzimas. En los 3 casos se prolongó la reacción de desesterificación de modo de alcanzar un GM similar con el objetivo de comparar las propiedades de las pectinas desesterificadas. Se denominarán P Aa, P Ak y P Na a las pectinas desesterificadas con las PEs de *A. aculeatus*, de *A. kawachii* y de naranja, respectivamente.

4.3.7.2 Determinación del grado de metoxilación de las pectinas

El GM de las pectinas antes y después de la desesterificación enzimática se determinó por el método titulométrico descrito anteriormente.

4.3.7.3 Análisis de las pectinas desesterificadas

Se llevaron a cabo 2 tipos de cromatografías para analizar las 3 pectinas desesterificadas: exclusión molecular e intercambio aniónico, ambas a temperatura ambiente, a saber:

Cromatografía de exclusión molecular: se llevó a cabo en una columna Sepharose CL-6B (XK 16/70) equilibrada con buffer succinato de sodio (0,1 M, pH 4,5) con la adición de azida de sodio (0,02 %) como conservante. Se inyectaron 6 ml de la solución de pectina

desesterificada, previamente filtrada a través de membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro. El caudal de elución fue de 1 ml/min y el volumen de fracción recolectado fue de 5 ml.

Cromatografía de intercambio iónico: se utilizó una columna DEAE-Sepharose CL-6B (XK 26/15), equilibrada con buffer succinato de sodio (0,05 M, pH 4,5) con azida de sodio (0,02 %). Se inyectaron 8 ml de la solución de pectina desesterificada, previamente filtrada. La columna se lavó con 50 ml de buffer y el material retenido se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0,4 M, en 10 volúmenes de columna, 500 ml). El caudal de elución fue de 8 ml/min y el volumen de fracción recolectado fue de 10 ml.

4.3.7.4 Determinaciones analíticas

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Se determinó colorimétricamente ácido galacturónico (AGA) y azúcares neutros (expresados como arabinosa) por el método de mhdf (Blumenkrantz and Asboe-Hansen G., 1973) y orcinol (Herbert et al., 1971), respectivamente.

4.3.8 Análisis de huellas peptídicas

Para llevar a cabo dicho análisis se procedió a una digestión triptica *in situ* de las proteínas separadas por electroforesis (SDS-PAGE), coloreadas por la técnica de Azul de Coomassie coloidal. Las bandas se seleccionaron por el desarrollo de la actividad enzimática a través de un zimograma, se cortaron y almacenaron en tubos Eppendorf para su procesamiento. Se lavaron con agua MilliQ y acetonitrilo varias veces alternativamente hasta lograr su decoloración. Posteriormente se secaron a presión reducida. Se agregó ditioneitol e iodoacetamida en NH_4HCO_3 con el fin de bloquear y reducir el sitio activo de la enzima. La digestión se realizó con tripsina en buffer NH_4HCO_3 (100 mM, pH 7,8) durante 12 h, a 37°C. Los productos de degradación se disolvieron en ácido trifluoroacético (0,1 %, v/v), y se analizaron por MALDI-TOF MS mediante Espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF (Analyzer 4800, Applied Biosystems, Framingham, EE.UU.).

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Características de las pectinas

En la Tabla 4.1 se resumen las características principales de las pectinas utilizadas durante el desarrollo del capítulo. Los resultados de los parámetros analizados son similares a los encontrados en las especificaciones del proveedor.

Tabla 4.1: Caracterización de las pectinas utilizadas.

	Pectina (GM medio)	Pectina (GM alto)
Proveedor	Sigma	Sigma
Origen	Cítrica	Cítrica
Ácido galacturónico (%)*	84,5	83,0
Pentosas (%)*	15,1	26,8
Grado de esterificación (%)	56,9	87,3
Humedad (%)	11,5	7,9

* Expresados en base seca.

4.4.2 Pectinesterasa comercial

La PE comercial de *A. aculeatus* utilizada corresponde a más del 99 % de la proteína encontrada en SDS-PAGE realizado, como se puede observar en la Fig. 4.1. Esta enzima se utilizó para comparar sus características bioquímicas, cinéticas y modo de acción sobre pectina respecto de la PE purificada de *A. kawachii*. El peso molecular por SDS-PAGE resultó de 40 kDa comparable a la reportada por Christgau de 43 kDa (Christgau et al., 1996).



Figura 4.1 Análisis por SDS-PAGE de la PE de *A. aculeatus*. Calle 1: 3 µg de proteína desalada (PD-10, BCP, pH 5,0). Calle 2: Patrones de bajo peso molecular. Tinción: Azul Brillante de Coomassie.

4.4.3 Purificación de PE de *A. kawachii*

Los cultivos de *A. kawachii* utilizando pectina cítrica como FCE fueron seleccionados como material de partida para la purificación de la PE. En este medio el hongo produjo una

actividad de PE similar a la obtenida en el medio con pomaza de limón, pero con una menor concentración de proteína total (mayor actividad específica de PE) y menor actividad de otras enzimas interferentes.

Los primeros ensayos orientadores de la capacidad de PE de unirse a rellenos hidrofóbicos fueron realizados utilizando pequeñas columnas de 1 ml de volumen (HiTrap HIC Selection Kit, Pharmacia). En ellos se demostró que la actividad PE no se adsorbe a rellenos hidrofóbicos (i.e. Phenyl-Sepharose) incluso a fuerzas iónicas elevadas (1,8 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Por el contrario, la enzima puede ser retenida por rellenos de intercambio iónico según el pH de trabajo. Por lo tanto, la purificación de PE se basó en separaciones cromatográficas usando intercambiadores iónicos.

La primera estrategia de purificación de PE se llevó a cabo utilizando 2 cromatografías consecutivas, primero una de intercambio aniónico (Sepharose Q) seguida de otra de intercambio catiónico (Sepharose SP). No se brindan mayores detalles de este protocolo ya que no resultó en la purificación total de la PE. Sin embargo, el mismo fue altamente selectivo ya que se obtuvo una importante limpieza del material de partida y permitió la eliminación de las demás actividades enzimáticas producidas por el hongo (actividades de PGasa, PeL, ARFasa, β -gal, β -fucosidasa, α -Ram, AGasa, ARAasa y GALasa negativas en el extracto final) con un buen rendimiento en PE. El producto final obtenido mediante este procedimiento resultó de utilidad para la determinación de las propiedades de la PE en las cuales no es necesario utilizar una PE completamente purificada pero si libre de actividades enzimáticas contaminantes capaces de atacar la pectina.

La purificación completa de la PE se alcanzó mediante una estrategia diferente. En este caso, se partió de ~ 2,8 l de medio filtrado utilizando el procedimiento que se detalla en la Fig. 4.2. Como resultado del mismo se obtuvo finalmente una muestra homogénea de proteína según lo demuestran los análisis realizados tanto por SDS-PAGE como por IEF.

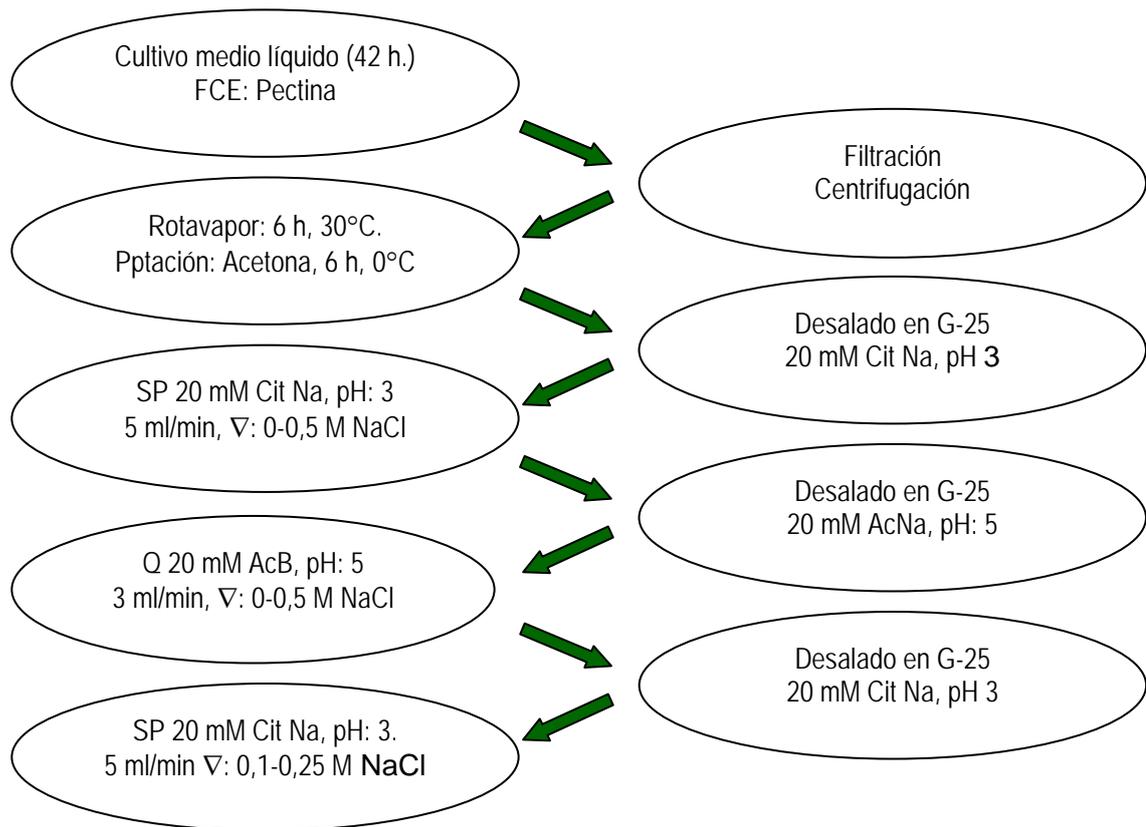


Figura 4.2 Esquema de purificación de PE de *A. kawachii*. Cit: citrato.

La primera etapa del proceso consistió en la separación de la biomasa fúngica del cultivo mediante filtración a través de tela y posterior centrifugación para eliminar partículas menores sedimentables. El sobrenadante fue seguidamente concentrado ($\sim 20 \times$) a presión reducida en evaporador rotatorio a 30°C sin pérdida significativa de la actividad (97 % de recuperación). Por el contrario, en la etapa siguiente de precipitación con acetona, el porcentaje de recuperación fue bajo (58 %) y la solución obtenida resultó ser coloreada, es decir esta etapa no eliminó los contaminantes coloreados del medio. El precipitado obtenido luego del agregado de acetona presentó un aspecto pastoso, siendo de difícil redisolución en BAcNa (20 mM, pH 5,0) quedando un residuo insoluble aún luego de 12 h de agitación en frío. Es muy probable que una parte substancial de la actividad enzimática perdida en esta etapa quede retenida en el residuo insoluble. Alternativamente, se ensayó la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En este caso, y dada la escasa hidrofobicidad de la proteína, la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ necesaria para precipitarla es muy cercana a la de saturación. Además, no se observó una precipitación significativa de proteínas contaminantes remanentes en la secuencia de concentraciones crecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por lo que tampoco se lograba un aumento en la

actividad específica. Por estas razones, se prefirió seguir con las siguientes etapas de purificación utilizando el material proveniente de la precipitación con acetona.

La columna de tamiz molecular G-25 (equilibrada con el buffer de la cromatografía catiónica) resultó efectiva para eliminar contaminantes coloreados, que resultaron ser de bajo PM. La columna G-25 también eliminó parte de los productos de degradación de la pectina, que eluyeron junto con los compuestos coloreados y las sales. En la Fig. 4.3 puede observarse el patrón de elución típico del precipitado con acetona en la columna G-25. Se pueden observar 2 fracciones que absorben en el UV. La primera correspondió a la fracción proteica acompañada por componentes coloreados del medio de cultivo producida por *A. kawachii*, con muy baja conductividad. La segunda fracción, que se acompañó por un pico de conductividad, correspondió a productos de degradación de la pectina e iones, componentes del medio de cultivo concentrados durante los procesos previos (rotavapor y acetona). Cabe destacar que la diálisis fue descartada porque se observó que la membrana era atacada por celulasas producidas por *A. kawachii* en este medio de cultivo.

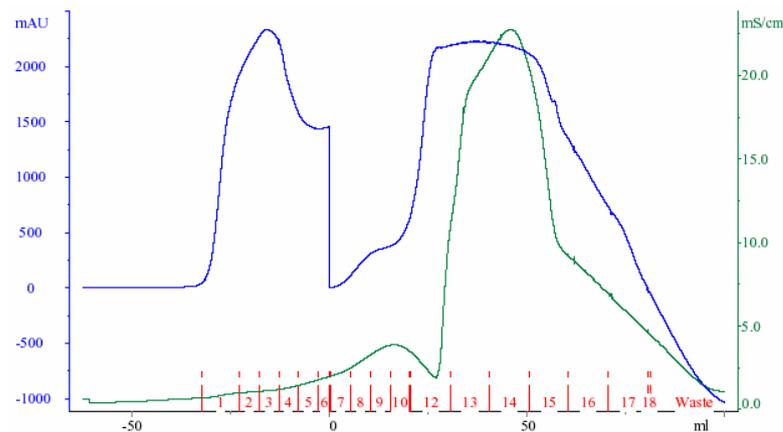


Figura 4.3 Perfil de elución del precipitado acetónico del cultivo de *A. kawachii* en cromatografía de exclusión. Se utilizó un relleno G25 (columna XK 26/70 con 90 ml de gel). Buffer: citrato de Na (20 mM, pH: 3,0). Caudal: 1 ml/min. Volumen de fracción recolectada: 10 ml. La actividad PE se encuentra en el primer pico de elución junto al pool proteico. Línea azul: absorbancia a 280 nm. Línea verde: conductividad. Registro obtenido por el sistema operativo del cromatógrafo.

El proceso de purificación se continuó mediante cromatografías iónicas sucesivas: catiónica (CIC I), aniónica (CIA) y catiónica expandida CIC II). En las corridas cromatográficas CIC I y CIA (Fig. 4.4), la PE eluyó como un pico único a una concentración de 0,27 M de NaCl en la cromatografía con Sepharose-SP y a 0,31 M de NaCl en la cromatografía con Sepharose-Q. Dadas las condiciones bajo las cuales se adsorbió la actividad PE a las columnas, era de esperar que el pI de la enzima estuviera comprendido

entre 3 y 5, suposición que fue posteriormente confirmada. Finalmente, se realizó una nueva corrida con la columna de intercambio catiónico, pero esta vez acotando el gradiente de NaCl entre 0,1 y 0,25 M. Las fracciones correspondientes al único pico con actividad PE se dializaron y liofilizaron para su posterior caracterización y uso. Cabe destacar que el proceso de liofilización no condujo a una pérdida detectable en la actividad enzimática.

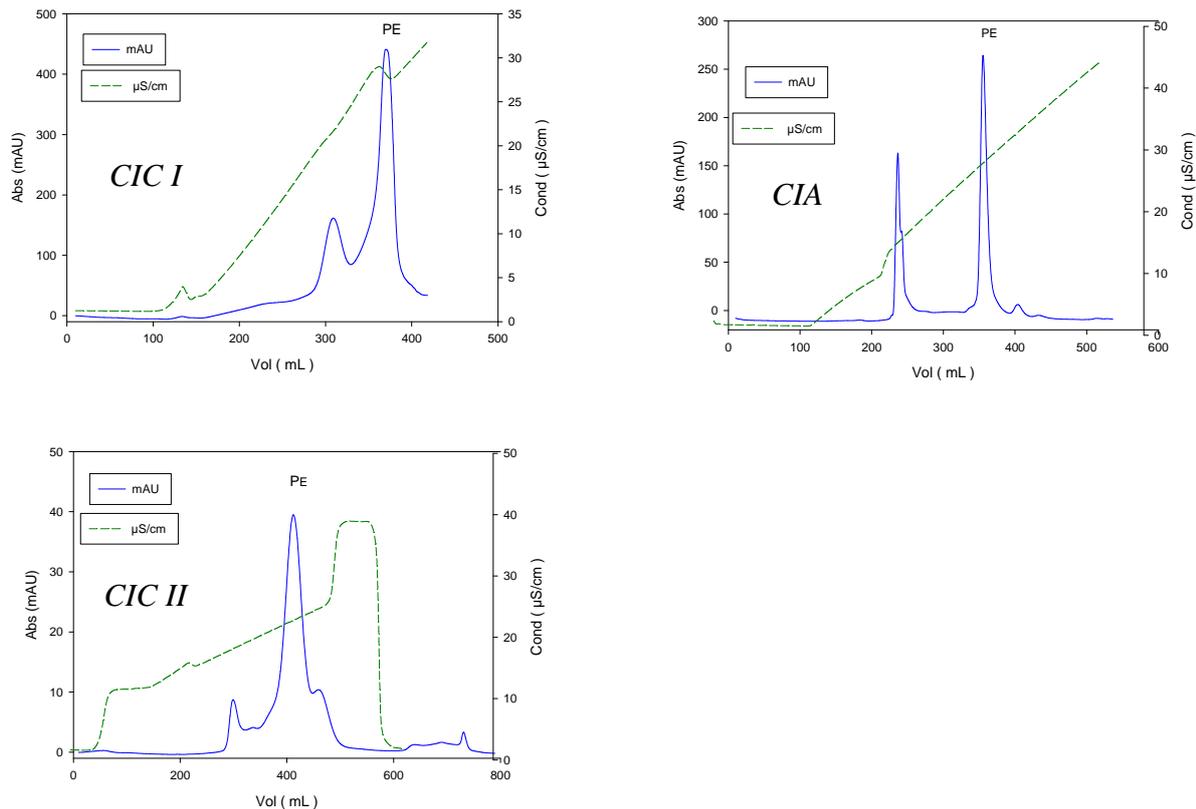


Figura 4.4 Cromatografías de intercambio iónico empleadas en la purificación de PE de *A. kawachii*.
CIC I: Sepharose-SP ($2,6 \times 15$ cm) con 60 ml de relleno, equilibrada con citrato de Na (20 mM, pH 3,0). Se aplicó un gradiente de NaCl, de 0 a 0,5 M en buffer (2 volúmenes de columna), con un caudal de 5 ml/min. Volumen de fracción recolectada: 5 ml.
CIA: El eluido de la CIC I desalinizado se aplicó a una columna de Sepharose Q ($2,6 \times 10$ cm) con 50 ml de relleno, equilibrada con acetato de Na (20 mM, pH: 5,0). Se eluyó con un gradiente de NaCl (0 a 0,5 M) en el mismo buffer de equilibrio. Volumen de fracción: 3 ml.
CIC II: El eluido de CIA se aplicó a la columna Sepharose-SP, se utilizó un gradiente lineal expandido de NaCl (0,1 M a 0,25 M) en citrato de Na (20 mM, pH 3,0), utilizando 3 volúmenes de columna. Volumen de fracción: 5 ml.

Los perfiles de elución de las cromatografías mostraron un único pico con una distribución simétrica de la actividad. Esta característica también se encontró para la PE de *A. niger* (Maldonado et al., 1994), *A. foetidus* (Kilara, 1982), *Clostridium multif fermentans* (Miller and Macmillan, 1970) y papaya (Lourenco and Cabutani, 1984), mientras que

Trichoderma reesei (Markovic et al., 1985), *Botrytis cinerea* (Marcus and Schefter, 1983) y *Phytophthora infestans* (Foster and Rasched, 1985) mostraron dos picos de actividad.

En la Tabla 4.2 se muestra el detalle de las diferentes etapas de purificación de la enzima. En la fracción final de purificación no se detectó ni actividad PGasa ni otras actividades pectolíticas presentes en el extracto crudo. Sin embargo, el rendimiento del procedimiento de purificación fue bajo. Es conocido que los *Aspergillus* producen varias enzimas pectolíticas, con propiedades cromatográficas similares (Maldonado et al., 1986; Maldonado et al., 1989b; Maldonado et al., 1989a; Maldonado et al., 1994), lo cual dificulta el proceso de purificación conduciendo a bajos rendimientos finales. Entonces, una forma de eliminar contaminantes durante los pasos cromatográficos sucesivos, fue seleccionar sólo las fracciones con máxima actividad de PE. Como consecuencia, el rendimiento final de purificación resultó menor de lo esperado. El rendimiento final fue de 100 µg de proteína, que representó menos del 0,001 % de la proteína total originalmente presente en el cultivo. La recuperación en términos de actividad fue del 4,4 %. La actividad específica fue de 124 U/mg proteína (método AO, condición estándar). La enzima resultó estable a la liofilización y al congelamiento-descongelamiento.

Tabla 4.2. Resumen de la purificación de la PE de *A. kawachii*.

Etapa de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación (%)	Purificación (×)
Cultivo	380,1	7792,1	0,03	100	1
Rotavapor	221,2	7383,1	0,64	97	1
Acetona	133,7	99,9	1,34	58	27
G25	154,2	29,8	5,0	67	106
SP-Desalado	67,4	8,9	7,57	30	155
Q-Desalado	54,0	1,9	28,10	24	576
SPexp-Desalado	16,9	0,1	123,8	7	2537

La muestra final obtenida mostró homogeneidad en SDS-PAGE (Fig. 4.5 A). Del mismo modo, el gel nativo de la muestra purificada mostró una única banda, la cual como era de esperar, presentó actividad PE como lo demuestra el zimograma (Fig. 4.5 B).

Resulta importante mencionar que se intentaron otras estrategias de purificación utilizando intercambiadores tipo IMAC (cromatografía de afinidad por metales

inmovilizados), donde otras enzimas pécicas sí se retienen y se purifican prácticamente en un solo paso (Navarro del Cañizo et al., 1994). En nuestro caso, la enzima tampoco se retuvo, razón por la cual la estrategia de purificación se centró en intercambios iónicos, como se detalló previamente.

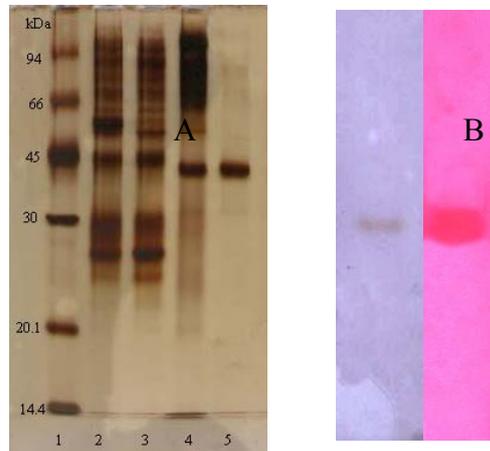


Figura 4.5 SDS –PAGE y PAGE con zimograma de la PE de *A. kawachii*.

A: Análisis por SDS-PAGE de la purificación de PE: Calle 1: Marcadores de bajo peso molecular. Calle 2: Precipitado con acetona (siembra 15 µg de proteína). Calle 3: SP-Sepharose, CIC I (12 µg de proteína). Calle 4: Q-Sepharose, CIA (12 µg de proteína). Calle 5: SP-Sepharose expandida, CIC II (3 µg de proteína).

B: Gel nativo y zimograma del gel nativo: El gel nativo se superpuso con un gel de agarosa al 2 % conteniendo 0,5 % de pectina en BCP, pH: 5,0, y se incubó a 37°C por 1 h. Luego se tiñó con rojo de rutenio al 0,02 %. El PAGE se tiñó con AgNO_3 .

El PM de la PE purificada de *A. kawachii*, calculado por SDS-PAGE se estimó en $44,53 \pm 1,12$ kDa (Fig 4.5A) en tanto que el obtenido del tamiz molecular con Sephacryl S-100 fue de $53,95 \pm 1,25$ kDa. Estas diferencias pueden deberse a una adsorción inespecífica de la enzima al Sephacryl que sobreestima el PM. Es dable mencionar que todos los PM reportados para PE fúngicas fueron determinados mediante SDS-PAGE y no por tamiz molecular. Por lo tanto, la diferencia antes mencionada no puede ser comparada. La PE de *A. kawachii* presentó un PM similar, determinados por SDS-PAGE, al de otras PEs fúngicas. Por ejemplo, la PE de *A. aculeatus* presentó un PM de 43 kDa (Christgau et al., 1996), las 2 PEs de *A. japonicus* presentaron un PM de 46 y de 47 kDa (Semenova et al., 2003) y finalmente la de *A. oryzae* (Kitamoto et al., 1999) presentó un PM de 38,5 kDa. Las PEs de otros orígenes, tales como vegetal (cítricos) y de insectos (gorgojo de arroz) presentaron un PM en el rango de 36 a 38 kDa (Christensen et al., 1998; Rillo et al., 1992; Shen et al., 1999). Es interesante resaltar que en ninguno de los casos se ha reportado la presencia de multímeros para PE. Se

puede concluir que la PE de *A. kawachii* es una proteína monomérica de modo similar a las demás PEs.

El IEF confirmó la homogeneidad de la muestra purificada con una sola banda con actividad PE (Fig. 4.6) cuyo pI se estimó en $3,8 \pm 0,1$. El mismo valor se obtuvo mediante CE empleando polibuffer 64 a pH 3,0. En este caso, la PE se recuperó en el tubo número 34 cuyo pH resultó de 3,74, valor coincidente con el encontrado por IEF. Este resultado resultó concordante con el reportado para otras PEs de origen fúngico, como la de *A. aculeatus* y las 2 PEs de *A. japonicus*, que presentaron el mismo pI de 3,8 (Christgau et al., 1996; Semenova et al., 2003).

Entre las líneas 1 y 2 fue sembrada una muestra de PE de *A. aculeatus* conteniendo 1 μg de proteína (Fig. 4.6). A su vez, entre las líneas 2 y 3 también fue sembrada una muestra de PE de *A. kawachii* conteniendo 0,6 μg de proteína. Sin embargo, en ambos casos no se detectó banda alguna con el azul de Coomassie, pero si se detectó en ambos casos actividad PE en el zimograma. Esto se atribuyó a la alta capacidad catalítica de ambas enzimas, que permitió su visualización no por detección de la proteína enzimática en si sino por la evidencia del producto de su actividad. En otras palabras, bajo las condiciones experimentales empleadas, y para este caso, el zimograma presentó una mayor sensibilidad que el IEF.

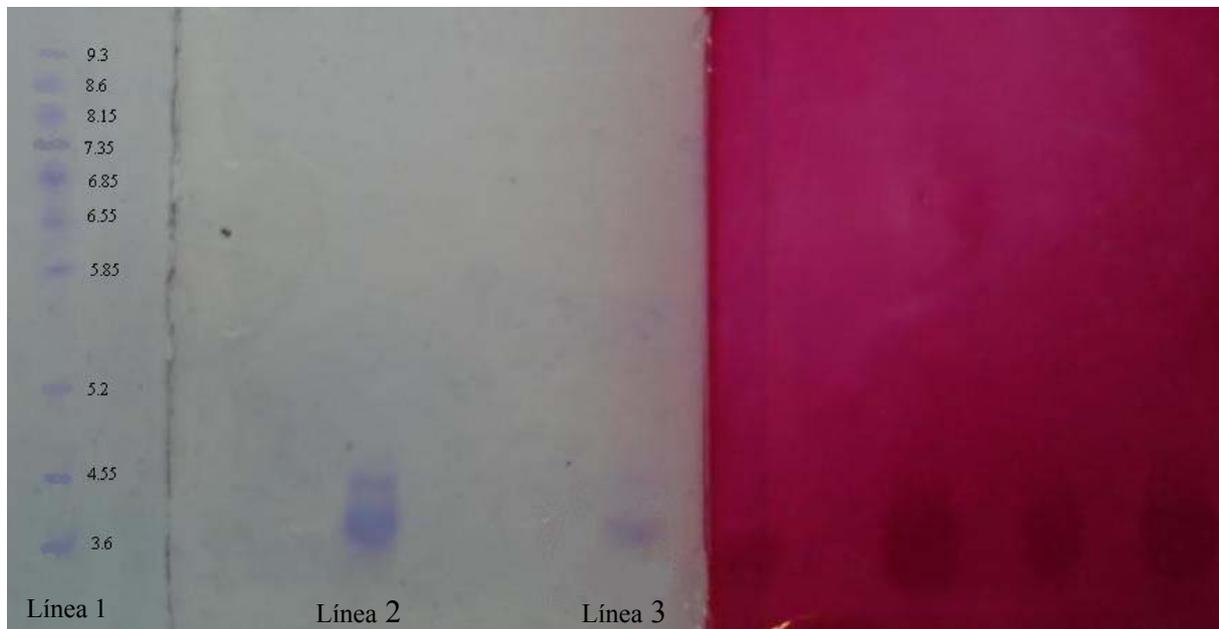


Figura 4.6 IEF de la PE de *A. kawachii*. Para la visualización de la actividad PE, el IEF se cubrió con un gel de agarosa conteniendo 0,5 % de pectina. Luego se tiñó con rojo de rutenio (0,02 % en agua). Para la determinación del pI, el IEF se tiñó con azul de Coomassie.

Línea 1: Marcadores de pI. Línea 2: PE comercial de *A. aculeatus* desalada (siembra: 5,0 μg proteína). Línea 3: PE de *A. kawachii* purificada (siembra: 3,0 μg proteína).

La Concavalina A es una proteína (lectina) aislada de leguminosas (*Canavalia ensiformis*) con la capacidad de unirse específicamente a glicoproteínas y polisacáridos conteniendo restos de glucosa y manosa. Ha sido utilizada para evaluar las características glicoproteicas de diversas pectinasas, tales como PGasas tanto de origen vegetal (Stratilova et al., 1996) como de origen fúngico (Raab, 1992; Stratilova et al., 1998). En nuestro caso, se empleó para determinar la posible presencia de una región glicosilada en la molécula de PE. El ensayo resultó negativo, es decir la enzima no se adsorbió a la columna, lo cual sugiere que PE no está glicosilada. Por el contrario, otras PEs reportadas se encuentran glicosiladas, como la expresada por *A. aculeatus* y por *A. niger* (Warren et al., 2002; Christgau et al., 1996).

4.4.4 Determinación de las propiedades catalíticas de la PE de *A. kawachii*

4.4.4.1 Estabilidad térmica

La determinación de la estabilidad térmica de la PE se realizó mediante incubación de la enzima purificada, en BCP (pH: 5,0), a diferentes temperaturas y evaluación de la actividad residual bajo condiciones estándar. Como se puede observar (Fig. 4.7) la enzima retuvo el 66 % de la actividad luego de ser incubada a 50°C durante 1 h. A temperaturas mayores la inactivación fue total. Estos resultados resultaron similares a los encontrados para la PE de *A. aculeatus*, en cuyo caso a 50°C la enzima perdió el ~ 80 % de la actividad y a 60°C la enzima también se inactiva completamente.

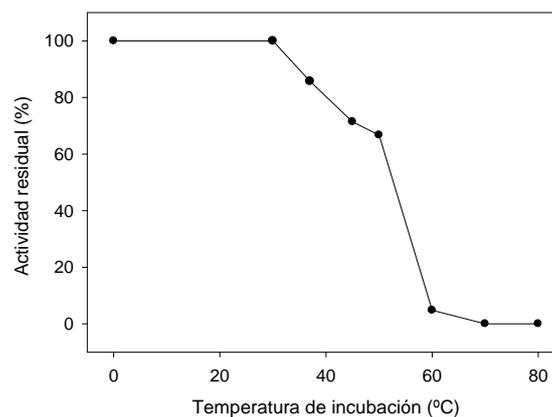


Figura 4.7 Estabilidad térmica de PE de *A. kawachii*. Se incubaron 171 µg de proteína/ml de BCP (pH 5,0, 1 h) a cada una de las temperaturas analizadas. Las muestras se colocaron nuevamente en un baño hielo-agua y finalmente se determinó la actividad residual por el método de VB.

4.4.4.2 pH óptimo

El pH óptimo de la PE se determinó utilizando como sustrato pectina cítrica (GM 53 %). La técnica elegida para la cuantificación de la actividad enzimática fue la del AO, ya que la del VB es dependiente del pH, variable aquí analizada. Al igual que otras PEs de *Aspergilli*, la actividad se observó en la región ácida, particularmente a valores de pH comprendidos entre 2 y 6. El valor del pH óptimo encontrado fue de 4,5 (Fig. 4.8). Resultó interesante el hecho de que el 25 % de la actividad máxima se conserva a pH 2,0, característica que reviste importancia para el potencial uso de la enzima en la clarificación de jugo de limón (con pH cercano a 2). Los pHs óptimos publicados de otras PEs de origen fúngico son de 4,6 para *A. aculeatus* y de 5,0 para *A. niger* (Christgau et al., 1996; Maldonado et al., 1994), valores algo mayores pero comparables al encontrado para la PE de *A. kawachii*. Los valores de pH óptimo para PEs de otros orígenes son más alcalinos. Por ejemplo, la PE de un insecto (gorgojo de arroz) muestra un pH óptimo en el rango de 6-7 (Shen et al., 1999), 8 para la PE de papaya (Lim and Chung, 1993) y 9 para la de mandarina (Rillo et al., 1992). El pH óptimo probablemente se encuentre relacionado con el contexto fisiológico en el cual cumple su rol cada una de dichas enzimas.

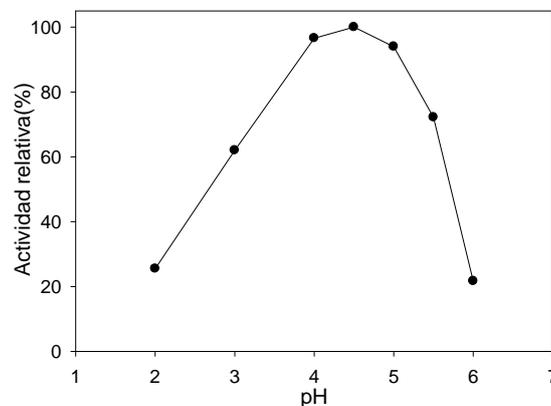


Figura 4.8 Efecto del pH en la actividad PE de *A. kawachii*. Sustrato: 0,5 % pectina cítrica (GM 53 %) en BCP a cada uno de los pHs estudiados. Se determinó la actividad enzimática por el método de la AO. Las actividades se expresaron como porcentaje referido a la actividad máxima a pH 4,5.

4.4.4.3 Estabilidad y reversión de la inactivación a pHs ácidos

En este estudio se incubó la PE de *A. kawachii* a diferentes pHs (2 a 5) durante 60 min a 37°C y la actividad residual a pH 5,0 se determinó tanto de modo inmediato como luego un período de “readaptación” de 60 min al nuevo pH. De este modo se intentó determinar si el pH durante la incubación ocasionaba algún efecto sobre la actividad enzimática, y en caso

afirmativo, si el mismo era reversible y qué grado. Simultáneamente, se utilizó a la PE comercial de *A. aculeatus* con el mismo fin ya que no se han encontrado reportes bibliográficos similares sobre dicho estudio, tanto para dicha enzima como para otras PEs microbianas.

En la Fig. 4.9 se observan los resultados obtenidos tanto de la PE de *A. kawachii* como de la de *A. aculeatus*. Resultó que tanto a pH 2,0 como a pH 3,0 la estabilidad de la PE de *A. kawachii* es mayor que la de *A. aculeatus*. Por ejemplo, los valores de actividad residual evaluados inmediatamente luego de incubar la enzima a pH 2,0 resultaron de un 39,6 % para el caso de la PE de *A. kawachii* frente a un 12,5 % para la de *A. aculeatus*. No se observan diferencias en los valores de actividad residual obtenidos cuando dichas enzimas fueron incubadas a pHs 4,0 y 5,0, valores ambos cercanos a los correspondientes pH óptimos.

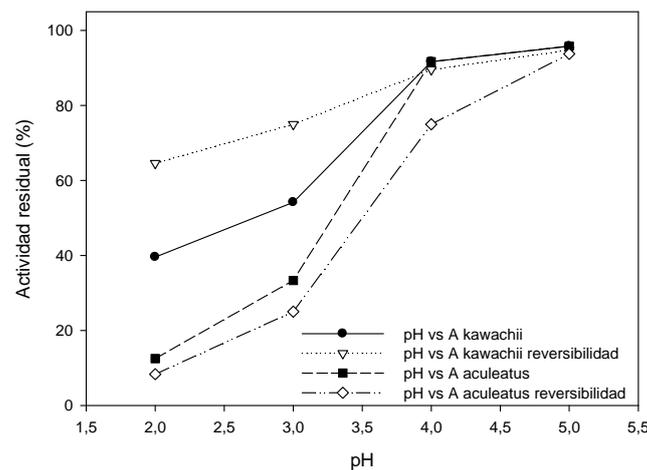


Figura 4.9 Estabilidad y reversibilidad al pH de PE de *A. kawachii*. Estabilidad: se incubó durante 1 h a cada uno de los pH a 37°C, se llevó a pH 5,0; se midió actividad residual por VB. Reversión: luego del paso anterior, se incubó 1 h a 37°C, pH 5,0 y se midió nuevamente la actividad remanente. Todas las actividades se expresaron como porcentaje de la actividad de cada una de las PEs medidas a pH 5,0.

Se estudió la reversión de la pérdida de la actividad ocasionada por el cambio de pH. Para ello, ambas enzimas preincubadas a los distintos pHs fueron posteriormente incubadas a pH 5,0 por 1 h a 37°C a los efectos de permitir una readaptación de la estructura proteica con la concomitante recuperación de su actividad a pH 5,0. Así se observó que la PE de *A. kawachii* presenta una mayor actividad, luego del período de readaptación recupera en mayor grado su actividad original. De este modo, la actividad recuperada es de alrededor de un 20 % mayor a pHs 2,0 y 3,0 cuando a la enzima se da un tiempo de readaptación a pH 5,0. Este resultado confirma que el efecto inactivante del pH ácido es parcialmente reversible para la

PE de *A. kawachii*. Es muy probable que como *A. kawachii* es capaz de crecer a valores de pH muy bajos, y que como PE es una enzima extracelular que debe de actuar y permanecer activa en dichos pHs, su estructura esté particularmente adaptada a dicho entorno. Como consecuencia de esta adaptación, son de esperar los resultados antes mencionados.

La PE de *A. aculeatus* mostró un comportamiento diferente. En este caso la actividad residual luego del período de readaptación a pH 5,0 fue menor que la determinada de modo inmediato. De este modo, cuando la enzima fue preincubada a pH 2,0 se observó una actividad residual de 12,5 % cuando se la evaluó inmediatamente y del 8,3 luego del período de readaptación. En este caso, pareciera que el efecto inactivante del bajo pH no se revierte al aumentar el mismo; más aún, pareciera que dicho efecto continúa aunque el pH se incrementa al valor original de 5,0. Estos distintos comportamientos entre las PE de *A. kawachii* y de *A. aculeatus* sugieren la posibilidad de diferencias estructurales entre ambas proteínas, más allá de una actividad catalítica común.

Una de las potenciales aplicaciones de la PE de *A. kawachii* es su utilización en la clarificación de jugo de limón. Este presenta normalmente un pH de alrededor de 2,5, por lo que resulta razonable determinar su estabilidad en el tiempo a dicho valor de pH en comparación con la PE de *A. aculeatus*. Como se puede observar en la Fig. 4.10, la PE de *A. kawachii* presentó mayor estabilidad a un pH 2,5 que la PE de *A. aculeatus* a todos los tiempos de incubación ensayados. Esta diferencia de estabilidad suma otra característica diferencial positiva a la PE de *A. kawachii* en comparación a la de *A. aculeatus* respecto a su potencial aplicación específicamente sobre jugo de limón.

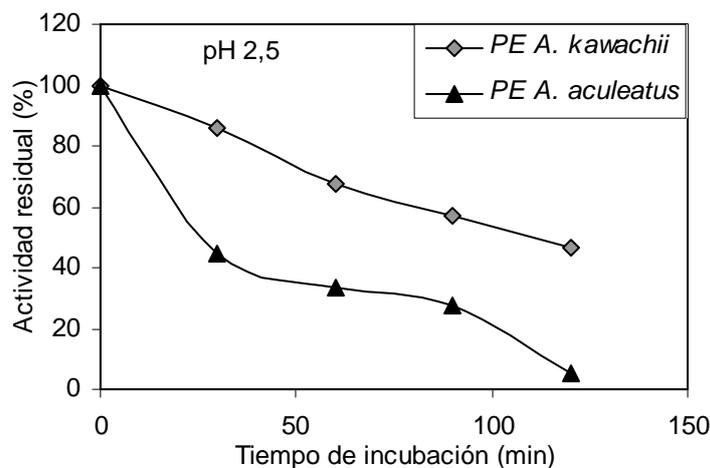


Figura 4.10 Estabilidad de PE de *A. kawachii* y de *A. aculeatus* a pH 2,5. La actividad residual se determinó por la técnica del VB luego de los diferentes tiempos de incubación.

Seguidamente se estudió el efecto de diferentes sustancias presentes en el jugo de limón, de modo individual como así también de jugo de limón natural, sobre la estabilidad de PE de *A. kawachii* y de *A. aculeatus*. Para descartar la posible interferencia de estas sustancias sobre la medida de actividad enzimática se tomó como referencia a la actividad de la enzima presente con el agregado de cada uno de los componentes a tiempo cero. En la Fig. 4.11 se muestra la actividad residual de ambas PE. Así, podemos observar que la PE de *A. kawachii* conserva un 66 % de la actividad original al cabo de 60 min de incubación a pH 2,5, valor esperable considerando los resultados previamente mostrados en la Fig. 3.9. Los componentes del jugo de limón que estabilizan a la PE de *A. kawachii* fueron los siguientes: fructosa (119 %), sacarosa (94 %), pectina (109 %) y albúmina (117 %, proteína representativa de las proteínas del jugo), mientras que el ácido cítrico (48 %) y la glucosa (32 %) tienen un efecto negativo sobre la estabilidad. Finalmente, el jugo de limón estabilizó a la enzima con un valor residual de actividad del 80 %. Por otra parte, la PE de *A. aculeatus* mostró una actividad residual del 35 %. Los únicos componentes que la estabilizaron fueron la fructosa (40 %) y la albúmina (46 %). El resto de los componentes presentó un efecto adverso sobre la actividad residual, por lo cual sería de esperar que el jugo de limón no tuviera un efecto estabilizante, tal cual fue encontrado (27 % de actividad residual).

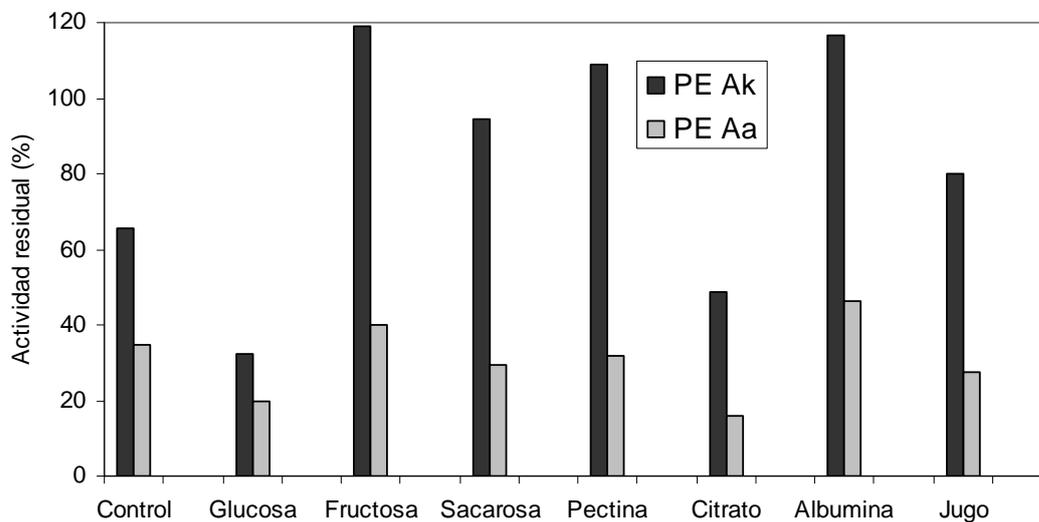


Figura 4.11 Efecto de diversas sustancias sobre la actividad de PE de *A. kawachii* (PE Ak) y de *A. aculeatus* (PE Aa). El ensayo se realizó a pH 2,5, durante 60 min, con las diferentes sustancias. Luego, se llevó a pH 5,0 y se determinó la actividad residual de PE por la técnica del VB.

4.4.4.4 Clarificación de jugo de limón

Se utilizó un jugo de limón obtenido en el laboratorio, cuyo pH inicial fue de 2,77, con una transmitancia a 650 nm del 13,6 % y un sedimento del 2,5 %.

Los ensayos de clarificación se realizaron con la misma actividad enzimática para ambas enzimas (3,38 mU/ml); sin embargo, las cantidades de proteína necesarias fueron substancialmente distintas en cada caso (37 $\mu\text{g/ml}$ para *A. kawachii* y 100 $\mu\text{g/ml}$ para *A. aculeatus*), revelando una importante diferencia entre las actividades específicas. La clarificación espontánea del jugo de limón (blanco) fue adjudicada a la PE endógena del mismo ya que no se sometió a ningún tratamiento térmico desnaturalizante previo al ensayo de clarificación. Por lo tanto, los valores obtenidos pueden considerarse como resultantes de la acción conjunta de la PE endógena y de la PE fúngica correspondiente.

Resulta evidente que una parte substancial de la clarificación se logra a las 3 h del proceso, alcanzando valores de transmitancia del 33, 37 y 52 % para el blanco, para la PE de *A. aculeatus* y para la PE de *A. kawachii*, respectivamente (Fig. 4.12). Luego, la velocidad de clarificación disminuye substancialmente, particularmente en el blanco (43 % de transmitancia a las 24 h). Por otra parte, la clarificación alcanzada por la PE de *A. kawachii* siempre fue mayor que con PE de *A. aculeatus*, tanto a tiempos cortos (3 h) como a tiempos largos de clarificación (24 h). Como se puede observar, la transmitancia alcanzada con la PE de *A. kawachii* fue de 69 % comparada con 55 % de *A. aculeatus* y 42 % de la clarificación espontánea del jugo de limón. Finalmente, el % de sedimentación acompañó en todo momento en paralelo a los aumentos de transmitancia, razón por lo cual no se muestran en la Fig. 4.12.

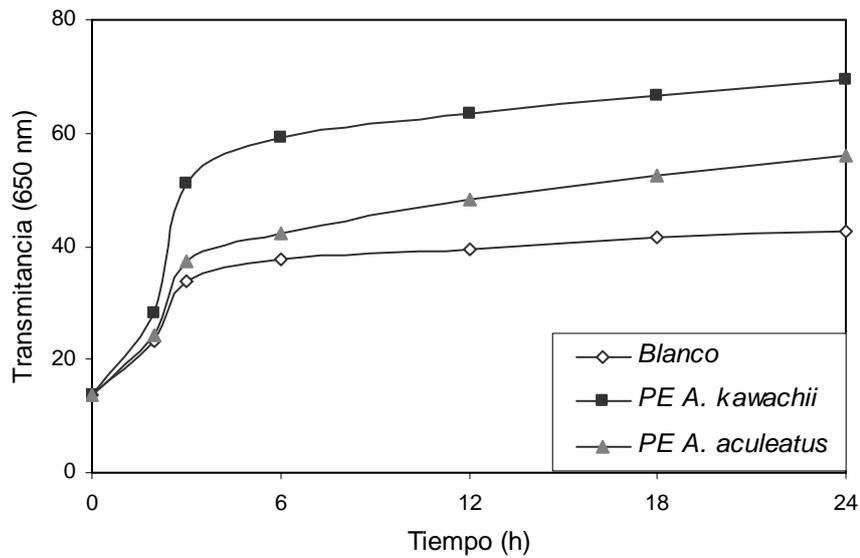


Figura 4.12 Clarificación de jugo de limón utilizando PE de *A. kawachii* y de *A. aculeatus*. El ensayo se realizó al pH del jugo de limón, a 37°C. Blanco: corresponde a la clarificación espontánea del jugo de limón.

4.4.4.5 Efecto de cationes en la actividad

En la Fig. 4.13 se puede observar la actividad de PE de *A. kawachii* resultante del agregado de diferentes cationes a la mezcla de reacción. Se tomó como control a la actividad de la PE medida en pectina al 0,5 % en agua sin el agregado de ningún catión. A la solución de pectina se le agregaron los diferentes cationes disueltos en alta concentración y llevados a pH 5,0 de forma tal de no modificar la concentración final del sustrato ni el pH de la mezcla de reacción. A concentraciones de 0,1 mM, los cationes de Na^+ , Cu^{+2} , y NH_4^+ no mostraron efecto con respecto al control, mientras que el agregado de Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} resultó en una actividad relativa del ~ 93 % y el de K^+ y Zn^{+2} en una del 77 %. Finalmente, el Fe^{+3} mostró la menor actividad relativa (55 %), que cayó al 13,9 % cuando se aumentó su concentración (10 ×).

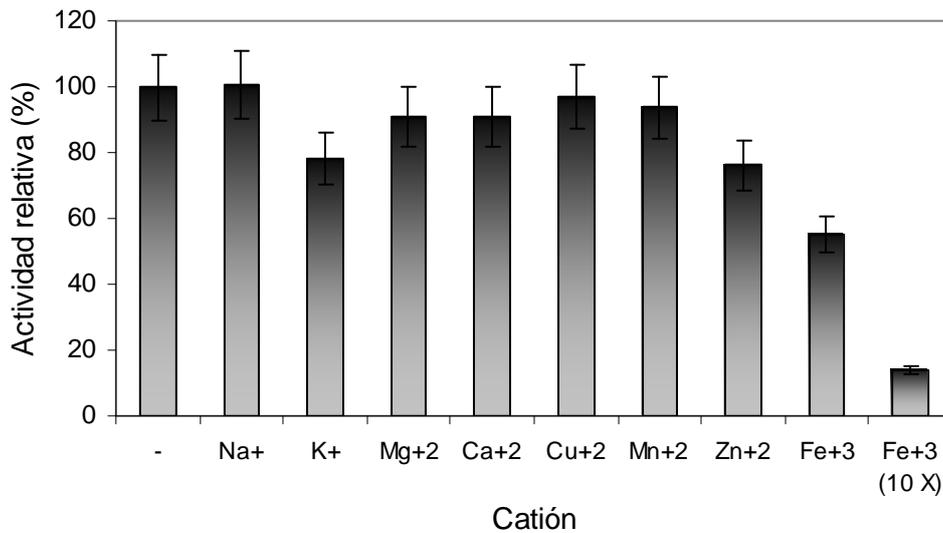


Figura 4.13 Efecto de la presencia de distintos cationes sobre la actividad relativa PE de *A. kawachii*. La actividad de PE se midió en pectina al 0,5 % con el agregado de los siguientes cationes: Na⁺ (NaCl), K⁺ (KCl), Mg⁺² (MgCl₂·6H₂O), Ca⁺² (CaCl₂·2H₂O), Cu⁺² (CuSO₄·5H₂O), Mn⁺² (MnCl₂·4H₂O), Zn⁺² (ZnSO₄·7H₂O) y Fe⁺³ (FeCl₃·6H₂O). La actividad se determinó mediante la técnica de VB. La concentración final de los cationes en mezcla de reacción fue de 0,1 mM (en el caso del Fe⁺³ también se midió a 1 mM).

Los reportes existentes sobre el efecto de cationes sobre otras PE de origen fúngico se realizaron en condiciones experimentales diferentes (la pectina utilizada como sustrato fue de otro origen y a otra concentración y las concentraciones de cationes ensayadas fueron mayores a las ensayadas en esta tesis). Por ejemplo, los cationes (K⁺, Na⁺, Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺² y Zn⁺²) no presentaron ningún efecto sobre la actividad de la PE de la bacteria fitopatógena *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik et al., 1996). En el caso del hongo *Botrytis cinerea* tanto el agregado de cationes monovalentes (Na⁺ y K⁺) como de divalentes (Ca⁺² y Mg⁺²) en concentraciones 20 y 120 mM, aumentó la actividad de la PE de 2-3 a 4 veces, respectivamente (Reignault et al., 1994). Finalmente, para la PE de *A. aculeatus*, la presencia de los cationes bivalentes (Mg⁺² y Ca⁺²) estimula la actividad de la enzima. El mayor efecto se observó a 50 mM MgCl₂ (200 % de la actividad sin Mg), y a 10 mM CaCl₂ (~ 150 % de la actividad sin Ca⁺²). Se encontró también que el NaCl estimula la actividad de la PE I en la concentración 75 mM (140 % de la actividad basal sin NaCl).

Los cationes bivalentes pueden afectar la actividad enzimática mediante la formación de complejos no covalentes con grupos disociados (carboxilatos) de la pectina desesterificada. Por lo tanto, la eliminación de los productos de reacción de la enzima podría tener como consecuencia el aumento concomitante de la actividad de las PE. Por otra parte, las sales pueden ejercer su efecto directamente sobre la enzima, probablemente debido a cambios en

los enlaces electrostáticos conduciendo a un cambio de la estructura terciaria de la enzima (Afifi et al., 2002; Palmer, 1991). También podría deberse a la participación de los grupos sulfidrilos en el sitio activo de la enzima.

En el caso de la PE de *A. niger* se encontró que es parcialmente inhibida por el Mg^{+2} y estimulada por Na^{+} . Los autores que realizaron este estudio consideraron que estos resultados son característicos de la PE de una cepa de *A. niger*, en particular la empleada por ellos, y que los mismos no podrían ser extrapolados a otras cepas (Maldonado et al., 1994).

4.4.4.6 Determinación de parámetros cinéticos de PE

En este caso se realizó la determinación de estos parámetros tanto de la PE de *A. kawachii* y como de la de *A. aculeatus*. En la Fig. 4.14 se observan las cinéticas de desesterificación de las 2 PE fúngicas. En ambos casos la desesterificación de la pectina respondió a una cinética de Michaelis-Menten. Se decidió realizar la determinación de los parámetros cinéticos de ambas enzimas ya que se hace muy difícil comparar los valores de K_m porque los reportados son altamente dependientes de las condiciones experimentales utilizadas en cada caso, tales como temperatura, concentración de sal, tipo y fuente de pectina y pH del medio de reacción (Maldonado et al., 1994; Christgau et al., 1996; Machova and Markovic, 1984). Los parámetros cinéticos determinados para la PE de *A. kawachii* fueron: $K_m = 0,1692$ mg/ml y $V_{max} = 8,5172$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$, y para la de *A. aculeatus* resultaron: $K_m = 0,2653$ mg/ml y $V_{max} = 9,736$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$.

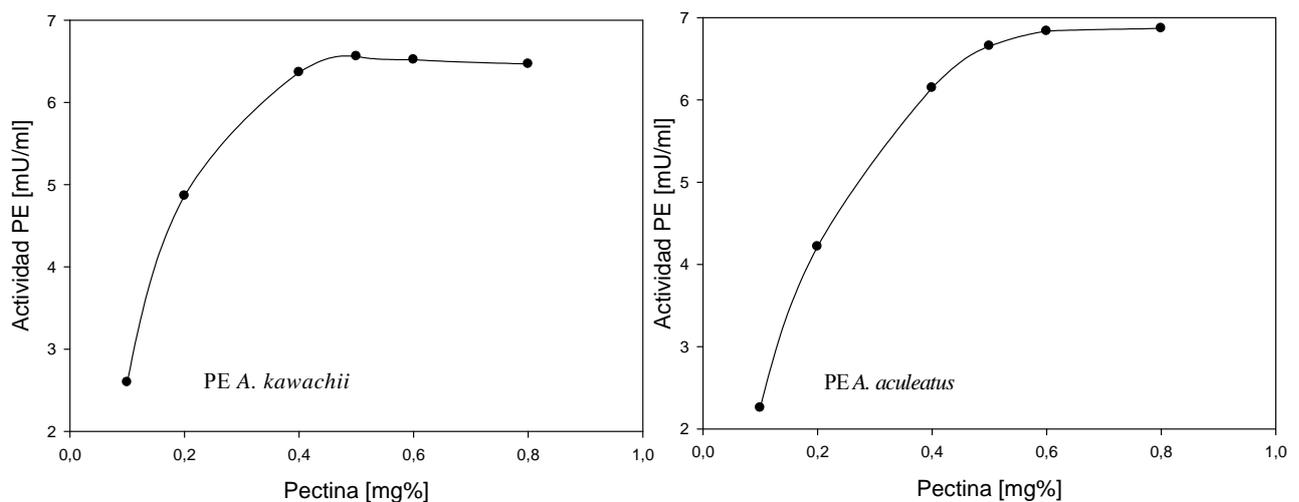


Figura 4.14 Representación de Michaelis-Menten de PE de *A. kawachii* y de *A. aculeatus*. Se determinó las cinéticas utilizando pectina de 53 % de GM al 0,5 % en BCP y se midió el metanol liberado por el método de la AO. Las concentraciones de sustrato abarcadas fueron en el rango de 1 a 20 mg/ml.

4.4.4.7 Modo de acción de PE

En esta experiencia se utilizó pectina de alto grado de esterificación (GM 87,1 %) para analizar el modo de acción de las enzimas sobre el sustrato. Para el proceso de desesterificación se emplearon tres pectinesterasas: dos de origen fúngico y una vegetal. El objetivo de la experiencia fue determinar el modo de desesterificación de la PE de *A. kawachii*, desconocido hasta el momento, en comparación con otros dos conocidos. En el laboratorio se contaba con las otras 2 PEs cuyo modo de acción se conocía con anterioridad y se utilizaron como referencia. La PE de *A. aculeatus*, que desesterifica a la pectina de forma aleatoria, y la PE de naranja, que lo hace en forma de bloque. Esta diferencia en el tipo de desesterificación, no en el grado, le confiere a la pectina resultante como producto una serie de características distintivas. Con las tres enzimas se alcanzó un grado de esterificación similar (~ 61 %).

Las pectinas desesterificadas mediante las 3 enzimas fueron analizadas por cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico. Así se pudieron comparar sus perfiles de elución en función de las correspondientes distribuciones de peso molecular (exclusión molecular) y de densidad de carga (DEAE-Sepharose). Para cuantificar la distribución de las pectinas desesterificadas se determinaron los contenidos de AGA por *mhdf* y de pentosas por orcinol, en las diferentes fracciones cromatográficas.

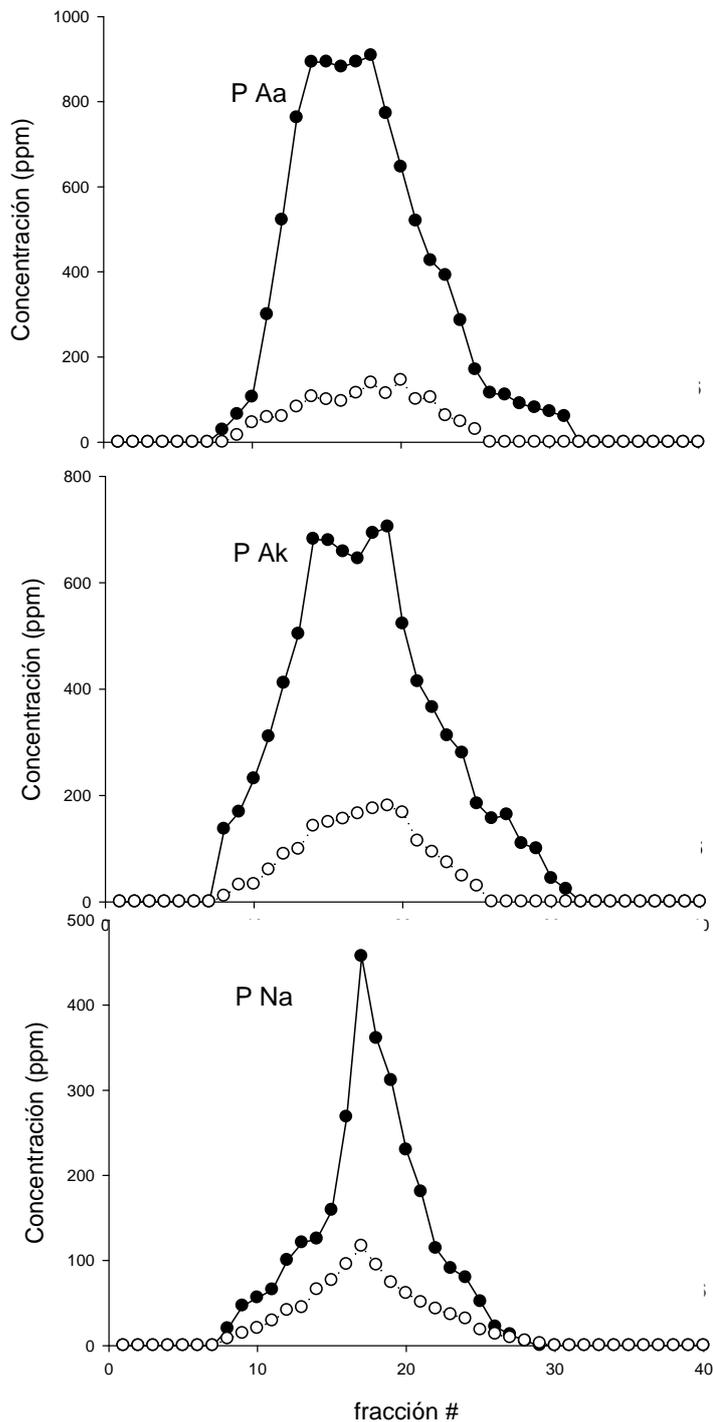


Figura 4.15 Cromatografía de exclusión molecular (Sephacrose CL-6B) de pectina desesterificada con PE de *A. aculeatus* (P Aa), de *A. kawachii* (P Ak) y de naranja (P Na). La desesterificación se llevó a cabo con pectina de 87,1 % de GM, se llegó a ~ 60 % de desesterificación en los tres casos.

●: AGA. ○: azúcares neutros.

En todos los casos el perfil de AGA fue acompañado por el de azúcares neutros, pero siempre en una menor concentración como se observa en las Figs. 4.15 y 4.16.

Los perfiles de la cromatografía de exclusión molecular de la pectina desesterificada por *A. aculeatus* y por *A. kawachii* mostraron una distribución amplia de volúmenes hidrodinámicos, lo que sugiere una distribución de peso moleculares amplia. Por otra parte, la distribución de peso moleculares de la pectina desesterificada por PE de naranja fue más homogénea que en los 2 casos anteriores, como se observa en la Fig. 4.15.

Los perfiles resultantes de la cromatografía de intercambio aniónico fueron semejantes para el caso de P Aa y P Ak. En este caso la distribución de fracciones se mostró como un pico angosto homogéneo, mientras que la distribución para el caso de P Na fue más amplia, eluyendo en un gran número de fracciones.

Como se puede observar, al comparar los perfiles de elución de las Figs. 4.15 y 4.16 se puede inferir que la PE de *A. kawachii* tiene un comportamiento similar a la de *A. aculeatus*. La PE de naranja se comporta de distinto modo, dando como resultado pectinas desesterificadas con características diferentes. Así podemos concluir que la PE de *A. kawachii* se comporta de manera semejante a la PE de *A. aculeatus*, y otras enzimas de origen fúngico, desesterificando en forma aleatoria a la pectina. Por el contrario, la PE de naranja, como otras PE de origen vegetal desesterifica en bloque. Resultados similares fueron hallados en estudios cromatográficos de pectinas altamente metiladas desesterificadas por diferentes PE (Ralet et al., 2002).

Se han estudiado por diversos métodos el patrón de desesterificación de la pectina por parte de la PE (De Vries J.A et al., 1983;Versteeg, 1979;2008;Grasdalen et al., 1996). Versteeg (Versteeg, 1979) caracterizó los fragmentos de los polímeros parcialmente desesterificados sometidos a hidrólisis por endo-PGs. (Markovic y cols. 1984) determinaron coeficientes αCa^{+2} (es una función compleja de la densidad de carga lineal de las macromoléculas) luego de la desesterificación enzimática.

De estas investigaciones se ha propuesto que las PE alcalinas de plantas superiores como tomate, naranja y alfalfa catalizan en forma lineal la desesterificación sobre la cadena llevando a la existencia de bloques de grupos carboxílicos. Por el contrario, las PE ácidas de origen generalmente fúngico desesterifican en forma aleatoria los carboxílicos esterificados de la pectina. También se han encontrado diversos estudios cuantitativos donde se utilizó espectroscopia 1H NMR para establecer la distribución de los grupos metoxilos en diferentes grados de esterificación de la pectina desesterificada que confirman lo anterior (Grasdalen et al., 1996;Andersen et al., 1995).

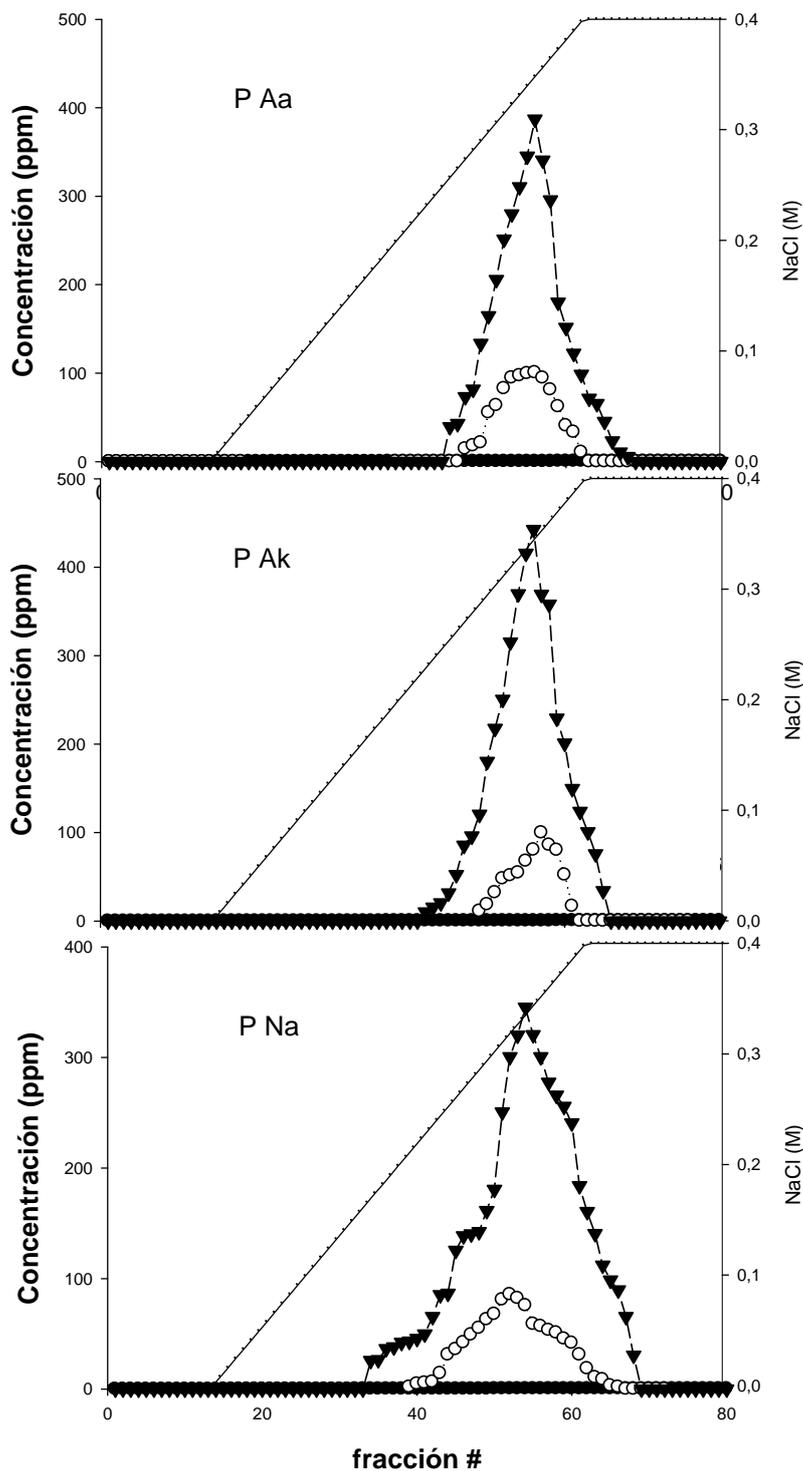


Figura 4.16 Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose CL-6B) de pectina desesterificada con PE de *A. aculeatus* (P Aa), de *A. kawachii* (P Ak) y de naranja (P Na). Se utilizó un gradiente de 0 a 0,4 M de NaCl. La desesterificación se llevó a cabo con pectina de 87,1 % de GM, se llegó a ~ 60 % de desesterificación en los tres casos.

▼: AGA. ○: azúcares neutros.

4.4.4.8 Análisis de huellas

El análisis de la secuencia N-terminal de la PE de *A. kawachii* no resultó exitoso debido al probable bloqueo del N-terminal, lo que acontece en más del 50 % de las proteínas eucariotas. Anteriormente, se mencionó que la enzima no fue retenida en la columna con Concavalina A, lo que indica que posiblemente no esté glicosilada. Sin embargo, podría presentar algún otro tipo de modificación que impide el análisis.

Para la realización de trabajos futuros, donde se intentará el clonado y la sobreexpresión de la enzima, se necesitaría contar con una secuencia parcial de esta proteína, para la cual se analizó la huella peptídica de la PE por MS/MS a partir de una digestión triptica. En este método, la proteína en estudio es hidrolizada mediante proteasas (comúnmente tripsina) para dar pequeños péptidos cuyas masas absolutas pueden determinarse mediante un espectrómetro de masas acoplado al detector adecuado (MALDI-TOF). Para ello se trabajó con la fracción pura del extracto enzimático para obtener la huella peptídica, como se puede observar en la Fig. 4.17 (peptide mass fingerprint, PMF) por MALDI-TOF MS (PMF MALDI-TOF MS). Esta técnica permite identificar posibles secuencias comunes, así como secuencias propias de enzimas de especies distintas. Con dicho mapa triptico y empleando la herramienta MASCOT4, que utiliza datos de espectrometría de masas para identificar proteínas en las bases de datos de secuencias primarias, se realizó la búsqueda bioinformática a fin de identificar la proteína original. Sin embargo, a pesar de haberse obtenido muy buenos datos de ms y ms/ms, no fue posible identificar en las bases de datos disponibles y de manera estadísticamente significativa a la proteína. Esto podría deberse a que el genoma de la especie involucrada no está aún disponible.

Algunas veces la identificación de las proteínas mediante PMF es imposible, debido entre otras razones a las lagunas existentes en las bases de datos, o la existencia de mezclas proteicas en la mancha (spot) seleccionada para la identificación. Para solucionar este problema, una posible alternativa es optar por una fragmentación de los péptidos obteniéndose la secuencia de aminoácidos correspondiente. Para ello, puede utilizarse una ionización tipo MALDI, mediante una segunda fragmentación (MALDI TOF/TOF) o “electrospray” (trampa iónica, cuadruplo, etc.). Este método de secuenciación de novo es la estrategia a seguir para identificar proteínas que provienen de organismos que no han sido secuenciados, o su secuencia no ha sido anotada. Mediante esta secuenciación se obtienen secuencias de aminoácidos que son comparadas con las secuencias existentes en las bases de datos en busca de secuencias homólogas. Aunque la proteína pueda no ser identificada o sea desconocida, la

información obtenida a partir de la secuenciación *de novo* puede ser utilizada para clonar el gen correspondiente. Esta estrategia alternativa será empleada en trabajos posteriores a los efectos de lograr el clonado y la sobreexpresión de esta enzima.

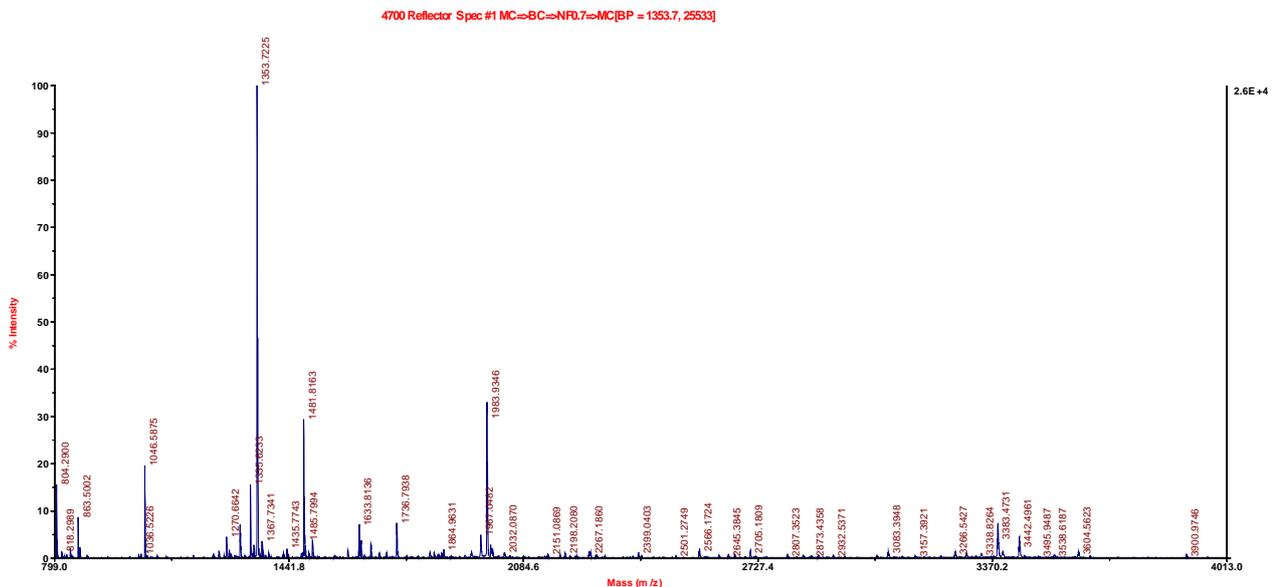


Figura 4.17 Espectro de masa de la PE de *A. kawachii* obtenido en modo reflector positivo.

4.5 Conclusiones

Se purificó la PE de *A. kawachii* utilizando cromatografías de intercambio iónico en forma secuencial ya que esta no se adsorbe en ninguna columna hidrofóbica. Se encontró una única banda en SDS-PAGE, en el gel nativo y en el IEF correspondiente a la actividad PE demostrada por zimograma tanto del gel nativo como del IEF. El PM de la PE resultó ser de 44,5 kDa (por SDS-PAGE) y de 54 kDa (por exclusión molecular). El PI de la enzima fue de 3,8 por IEF, encontrándose un valor similar por cromatoenfoque. No se adsorbió a la columna de Conavalina A, lo que sugiere que la enzima no se encuentra glicosilada.

La enzima no es capaz de actuar a temperaturas mayores a los 60°C. El pH óptimo resultó de 4,5, semejante a otras PE fúngicas, pero con una actividad residual del 25 % a pH 2, característica que permite considerar su potencial uso en la clarificación de jugo de limón. La PE mostró mayor estabilidad al pH ácido que la PE de *A. aculeatus*, y la pérdida de actividad revirtió substancialmente luego de una incubación a pH 5,0. Diferentes componentes del jugo de limón (fructosa, sacarosa, pectina y proteínas) como así también el jugo de limón natural incrementan la estabilidad de la enzima a pH 2,5. Los ensayos de

clarificación de jugo de limón demostraron que la PE de *A. kawachii* es eficiente y más efectiva que la de *A. acuelatus*.

La presencia de diferentes cationes en la mezcla de reacción no incrementó la actividad de la enzima, en tanto que K^+ , Zn^{+2} y Fe^{+3} la disminuyeron. La enzima mostró un mecanismo que se corresponde a una cinética tipo Michaelis-Menten ($K_m = 0,1692$ mg/ml y $V_{max} = 8,5172$ μ mol/min·ml). El modo de acción de la enzima (forma de desesterificación de la pectina de alto grado de esterificación) resultó ser aleatorio, al igual que el encontrado y reportado en otras PE de origen fúngico.

No se logró obtener la secuencia N terminal, ya que probablemente el N terminal se encuentre bloqueado como sucede en la mitad de de las proteínas eucariotas. Se obtuvo la huella peptídica de la PE; no obstante, no fue posible identificar a la proteína en las bases de datos disponibles.

4.6 Bibliografía

1. Afifi, A.F., Fawzi, E.M., and Foaad, M.A. (2002) Purification and general properties of pectinmethylesterase from *Curvularia inaequalis* NRRL 13884 in solid state culture using orange peels as an inducer. *Acta Microbiologica Polonica* 51, 237-245.
2. Aidoo, K.E., Hendry, R., and Wood, B.J.B. (1981) Estimation of fungal growth in solid state fermentation system. *European Journal Applied Microbiology* 12, 6-9.
3. Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D., and Prusky, D. (2004) Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65, 271-275.
4. Albersheim, P. (1965). The structure and function of the cell wall. In: *Plant Biochemistry*. J.Bonner, and J.Varner, eds. (Academic Press: New York), pp. 151-186.
5. Albersheim, P. (1966) Pectin lyase from fungi. *Methods in Enzymology* 8, 628-631.
6. Albersheim, P., Darvill, A.G., O'Neil, M.A., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (1996). *Pectins and pectinases*, (Elsevier Science B.V: Amsterdam).
7. Andersen, A.K., Larsen, B., and Grasdalen, H. (1995) Sequential structure by 1H NMR as a direct assay for pectinesterase activity. *Carbohydrate Research* 273, 93-98.
8. Asenjo, J.A., and Merchuk, J.C. (1995). Design, formulation and optimization of media. In: *Bioreactor System Design*. J.A.Asenjo, and J.C.Merchuk, eds. (Marcell Dekker: New York), pp. 89-138.
9. Baumann, J.W. (1981). Application of enzymes in fruit juice technology. In: *Enzymes and Food Processing*. G.G.Birch, and N.a.P.K.J.Blakebrough, eds. (Applied Science Publishers Ltd.: London), pp. 129-147.

10. Benen, J.A.E., Van Alebeek, G.-J.W.M., Voragen, A.G.J., and Visser, J. (2003). Pectic Esterases. In: Handbook of Food Enzymology. J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, and D.W.S. Wong, eds. (Marcel Dekke), pp. 849-856.
11. Benen, J.A.E., Vincken, J.-P., and Van Alebeek, G.-J.W.M. (2002). Pectins and their manipulation, (Sheffield Academic Press.).
12. Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., and Wheeler, D.L. (2002) GenBank. *Nucleic Acids Res* 30, 17-20.
13. Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489.
14. Bonnin, E., Renard, C., Thibault, J.-F., and Ducroo, P. (1997). Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisations alimentaires. In: *Enzymes an Aggro-Alimentaire*. V.Laneta-Ganda, ed. (Tech et Doc Lavoisier: Paris), pp. 167-200.
15. Bordenave, M. (1996). Analysis of pectin methyl esterases. In: Plant cell wall analysis. H.F.Linskens, ed. (Springer: New York), pp. 165-180.
16. Bosch, M., and Hepler, P.K. (2005) Pectin methyl-esterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* 17, 3219-3226.
17. Boulos, N.N., Greenfield, H., and Wills, R.B.H. (2000) Water holding capacity of selected soluble and insoluble dietary fibre. *International Journal of Food Properties* 3, 217-231.
18. Cameron, R.G., Baker, R.A., and Grohmann, K. (1998) Multiple forms of pectinmethylesterase from citrus peel and their effects on juice cloud stability. *Journal of Food Science* 63, 253-256.
19. Cameron, R.G., and Grohmann, K.J. (1996) Purification and characterization of a thermally tolerant pectin methylesterase from a commercial Valencia fresh frozen orange juice. *Agric.Food Chem.* 44, 458-462.
20. Cameron, R.G., Luzio, G.A., Goodner, K., and Williams, M.A.K. (2008) Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydrate Polymers* 71, 287-299.
21. Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res.* 37, 233-238.
22. Carpita, N., Tierney, M., and Campbell, M. (2001) Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant.Mol.Biol.* 47, 1-5.

23. Carpita, N.C., and Gilbeaut, D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowwring plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls durin growth. *The Plant Journal* 3, 1-30.
24. Carpita, N.C., and McCann, M.C. (2000). The cell wall. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B.B.Buchanan, and R.L.Jones, eds. (American Society of Plant Physiologists: Rockville), pp. 52-108.
25. Catoire, L., Pierron, M., Morvan, C., Hervé, C., and Goldberg, R. (1998) Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33150-33156.
26. Cavalitto, S.F., Arcas, J.A., and Hours, R.A. (1996) Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnology Letter* 18, 251-256.
27. Charnay, D., Nari, J., and Noat, G. (1992) Regulation of plant cell-wall pectin methyl esterase by polyamines-interactions with the effects of metal ions. *Eur.J.Biochem.* 205, 711-714.
28. Chellegatti, M.A.d.S.C., Fonseca, M.J.V., and Said, S. (2002) Purification and partial characterization of exopolysaccharidase I from *Penicillium frequentans*. *Microbiol.Res.* 157, 19-24.
29. Chen, H., Rubenthaler, G.L., Leung, H.K., and Baranowsky, J.D. (1988) Chemical, physical, and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. *Cereal Chem.* 65, 244-247.
30. Chiyogiku, K.K. (1982). Manufacture of wine-like sake, (Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 82 02,676 : Japan).
31. Christgau, S., Kofod, L., Halkier, T., Andersen, L., Hockauf, M., Dorreich, K., DALBØGE, H., and Kauppinen, S. (1996) Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzymes. *Biochem.J.* 319, 705-712.
32. Ciardiello, M.A., D'Avino, R., Amoresano, A., Tuppo, L., Carpentieri, A., Carratore, V., Tamburrini, M., Giovane, A., Pucci, P., and Camardella, L. (2008) The peculiar structural features of kiwi fruit pectin methylesterase: Amino acid sequence, oligosaccharides structure, and modeling of the interaction with its natural proteinaceous inhibitor. *Proteins* 71, 195-206.
33. Ciardiello, M.A., Tamburrini, M., Tuppo, L., Carratore, V., Giovane, A., Mattei, B., and Camardella, L. (2004) Pectin methylesterase from kiwi and kaki fruits: purification, characterization and role of pH in the enzyme regulation and interaction with the kiwi proteinaceous inhibitor. *J.Agric.Food Chem.* 52, 7700-7703.
34. Colquhoun, I.J., De Ruiter, G.A., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (1990) Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research* 206, 131-144.

35. Contreras Esquivel, J.C. Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. 2003a. Universidad Nacional de La Plata.
Ref Type: Thesis/Dissertation
36. Contreras Esquivel, J.C. Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. 2003b. Universidad Nacional de La Plata.
Ref Type: Thesis/Dissertation
37. Contreras Esquivel, J.C. Purification and characterization of *Aspergillus kawachii* polygalacturonases. 2003c. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
Ref Type: Thesis/Dissertation
38. Contreras Esquivel, J.C., Hours, R.A., Voget, C.E., and Mignone, C.F. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(1), 48-52. 1999.
Ref Type: Journal (Full)
39. Contreras Esquivel, J.C., and Voget, C.E. (2004) Purification and characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J.Biotechnol.* 110, 21-28.
40. Cook, P.E., and Campbell-Platt, G. (1993). *Aspergillus* and fermented foods. In: *The Genus Aspergillus*. K.A.Powell, R.A., and J.F.Peberdy, eds. (Plenum Press: New York), pp. 171-188.
41. D'Avino, R., Camardella, L., Christensen, T.M.I.E., Giovane, A., and Servillo, L. (2003) Tomato pectin methylesterase: Modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins* 53, 830-839.
42. De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellincampi, D., and Cervone, F. (1997). Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: *The Mycota V. Plant Relationships. Part B*. G.C.Carroll, and P.Tudzynski, eds. (Springer-Verlag: Berlin), pp. 61-83.
43. de Vries. Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. 1999.
Ref Type: Thesis/Dissertation
44. De Vries J.A, Rombouts, F.M., Voragen, A.G.J., and Pilnik, W. (1983) Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers* 245-258.
45. de Vries, R.P. (2003) Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide degrading enzymes; relevance for industrial production. *Appl.Microbiol.Biotechnol* 61, 10-20.
46. de Vries, R.P., Jansen, J., Aguilar, G., Parenicová, L., Joosten, V., Wulfert, F., Benen, J.A.E., and Visser, J. (2002) Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters* 530, 41-47.
47. de Vries, R.P., and Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 65, 497-522.

48. Denès, J.-M., Baron, A., Renard, C.M.G.C., Péan, C., and Drilleau, J.-F. (2000) Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research* 327, 385-393.
49. Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., and Tsernoglou, D. (2005) Structural Basis for the Interaction between Pectin Methylesterase and a Specific Inhibitor Protein. *The Plant Cell Online* 17, 849-858.
50. Ding, J.L.C., Hsu, J.S.F., Wang, M.M.C., and Tzen, J.T.C. (2002) Purification and Glycosylation Analysis of an Acidic Pectin Methylesterase in Jelly Fig (*Ficus awkeotsang*) Achenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2920-2925.
51. Doehlert, D.H. (1970) Uniform shell designs. *Applied Statistics* 231-239.
52. Doran, P. (1998). Mass Transfer. In: *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, ed. (: London).
53. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J., Krobers, P.A., and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
54. Duvetter, T., Fraeye, I., Sila, D.N., Verlent, I., Smout, C., Hendrickx, M., and Van Loey, A. (2006) Mode of De-esterification of Alkaline and Acidic Pectin Methyl Esterases at Different pH Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7825-7831.
55. Eklöf, J.M., Tan, T.C., Divne, C., and Brumer, H. (2009) The crystal structure of the outer membrane lipoprotein YbhC from *Escherichia coli* sheds new light on the phylogeny of carbohydrate esterase family 8. *Proteins* 76, 1029-1036.
56. Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinooor, A., and Prusky, D. (2002) pH regulated endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Mol Plant-Microbe Interact* 15, 774-779.
57. Fogarty, W., and Kelly, C.T. (1983). Pectic enzymes. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. W.Fogarty, ed. (: New York), pp. 131-182.
58. Fogarty, W.M., and Ward, O.P. (1972) Pectic substances and pectinolytic enzymes. *Process Biochem.* 7, 13-7.
59. Foster, H., and Rasched, I. (1985) Purification and characterization of extracellular pectinesterases from *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 77, 109-112.
60. Friedrich, J., Cimerman, A., and Steiner, W. (1992) Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger* on sucrose. *Food Biotechnology* 6, 207-216.
61. Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2007) Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *The EMBO J.* 26, 3879-3887.

62. Futagami, T., Mori, K., Yamashita, A., Wada, S., Kajiwara, Y., Takashita, H., Omori, T., Takegawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., and Goto, M. (2011) Genome Sequence of the White Koji Mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, Used for Brewing the Japanese Distilled Spirit Shochu. *Eukaryotic Cell* 10, 1586-1587.
 63. Gaffe, J., Tiznado, M.E., and Handa, A.K. (1997) Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiol.* 114, 1547-1556.
 64. Gainvors, A., Frezier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., and Belarbi, A. (1994) Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. (1994) *Yeast* 10, 1311-1319.
 65. García Maceira, F.I., Di Pietro, A., and Roncero, M.I. (1997) Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol.Lett.* 154, 37-43.
 66. Gaspar, Y., Johnson, K.L., McKenna, J.A., Bacic, A., and Schultz, C.J. (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol.Biol.* 47, 161-176.
 67. Giovane, A., Quagliuolo, L., Castaldo, D., Servillo, L., and Balestrieri, C. (1990) Pectin methyl esterase from *Actinidia chinensis* fruits. *Phytochemistry* 29, 2821-2823.
 68. Goldberg R., Pierron M., Bordenave M., Breton C., Morvan C., and Hervé du Penhout, C. (2001) Control of mung bean pectinmethylesterase isoform activities. Influence of pH and carboxyl group distribution along the pectic chains. *J.Biol.Chem.* 276, 8841-8847.
 69. Grasdalen, H., Andersen, A.K., and Larsen, B. (1996) NMR-spectroscopy studies of the action pattern of tomato pectin esterase – generation of block structure in pectin by a multiple attack mechanism. *Carbohydr.Res.* 289, 105-114.
 70. Greenwood, C.T., and Milne, E.A. (1968) Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 23, 281-366.
 71. Hayashi, T. (1958) The pectin enzyme produced by microorganisms. I. Pectin galacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Hakko Kôaku Zasshi* 36, 246-248.
 72. Herber, D., Phipps, P., and Strange, P. (1971). *Methods in Microbiology*, (Academic Press: London).
 73. Herbert, D., Phipps, P.J., and Strange, R.E. (1971). Determination of pentoses by the orcinol method. In: *Chemical analysis of microbial cells*. J.R.Norris, and D.W.Ribbons, eds. (Academic Press: London, United Kingdom).
 74. Hilz, H. Characterization of cell wall polysaccharides in bilberries and black currants. 2007. Wageningen University.
- Ref Type: Thesis/Dissertation

75. Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., and Beg, Q.K. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 409-418.
76. Hours, R.A., and Sakai, T. (1994) Protopectinase production in solid state culture of *Aspergillus awamori*. *Biotechnology Letters* 16, 721-726.
77. Huisman, M.M.H., Brull, L.P., Thomas-Oates, J.E., Haverkamp, J., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2001) The occurrence of internal (1-5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research* 330, 103-114.
78. Huisman, M.M.H., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2003). Pectin substances from soybean cell walls distinguish themselves from other planta cell wall pectins. In: *Advances in Pectin and Pectinase Research*. Voragen et al, ed. (Kluwer Academic : The Netherlands), pp. 159-168.
79. Ishii, S., Kiho, K., Sugiyama, S., and Sugimoto, H. (1979) Low methoxyl pectin prepared by pectinesterase form *Aspergillus japonicus*. *J.Food Sci.* 44, 611-614.
80. Ishii, T., and Matsunaga, T. (2001) Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry* 57, 969-974.
81. Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M.A., Darvill, A., and Albersheim, P. (1999) The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J.Biol.Chem.* 274, 13098-13104.
82. Ito, K., Iwashita, K., and Iwano, K. (1992a) Cloning and sequencing of xynC gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*. *Biosci.Biotech.Biochem.* 56, 1338-1340.
83. Ito, K., Ogasawa, H., Sugimoto, T., and Ishikawa, T. (1992b) Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci.Biotech.Biochem.* 56, 547-550.
84. Iwano, K., Mikami, S., Fukuda, K., Shiinoki, S., and Shimada, T. (1986) The properties of various enzymes of Shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *J.Brew.Soc.Japan* 81, 490-494.
85. Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimojo, H., and Ito, K. (1998) Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 62, 1938-1946.
86. Javeri, H., Toledo, R., and Wicker, L. (1991) Vacuum infusion of citrus pectinmethylesterase and calcium effects on firmness of peaches. *J.Food Sci.* 56, 739-742.
87. Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K., and Pickersgill, R.W. (2001) Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *Journal of Molecular Biology* 305, 951-960.

88. Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemanna, R., Jornvall, H., Markovic, O., and Eklund, H. (2002) Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Lett.* *514*, 243-249.
89. Jolie, R.P., Duvetter, T., Van Loey, A.M., and Hendrickx, M.E. (2010) Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* *345*, 2583-2595.
90. Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., and Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* *77*, 215-227.
91. Kawai, S., Takahashi, K., and Tamaki, Y. (1977) Production of citron-sake. III. *Nippon Jozo Kyokai Zasshi* *72*, 680-681.
92. Kennedy, M., and Krouse, D. (1999) Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* *23*, 456-475.
93. Kester, H.C.M., Kusters-van Someren, M.A., Muller, Y., and Visser, J. (1996). The exo-polygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*: characterization and cloning of the gene. In: *Progress in Biotechnology. Pectins and Pectinases Proceedings of an International Symposium.* J.Visser, and A.G.J.Voragen, eds. (Elsevier), pp. 817-823.
94. Kilara, A. (1982) Enzymes and their uses in the processed apple industry. A review. *Process Biochem.* *17*, 35-41.
95. Kim, Y., Teng, Q., and Wicker, L. (2005) Action pattern of Valencia orange PME de-esterification of high methoxyl pectin and characterization of modified pectins. *Carbohydrate Research* *340*, 2620-2629.
96. Kitamot, K. (2002) *Molecular Biology of Koji Molds.* *Adv.Appl.Microbiol* *51*, 129-146.
97. Kitamoto, N., Okada, H., Yoshino, S., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N. (1999) Pectin methylesterase gene (pmeA) from *Aspergillus oryzae* KBN616: Its sequence analysis and overexpression, and characterization of the gene product. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* *63*, 120-124.
98. Klavons, J., and Bennett, R. (1986) Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *Agriculture Food Chemistry* *34*, 597-599.
99. Kojima, Y., Sakamoto, T., Kishida, M., Sakai, T., and Kawasaki, H. (1999) Acid condition-inducible polygalacturonase of *Aspergillus kawachii*. *Journal of Molecular Catalysis B* *6*, 351-357.
100. Komalavilas, P., and Mort, A.J. (1989) The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydrate Research* *189*, 261-272.
101. Koseki, T., Mese, Y., Nishibori, N., Masaki, K., Fujii, T., Handa, T., Yamane, Y., Shiono, Y., Murayama, T., and Iefuji, H. (2008) Characterization of an α -l-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* *80*, 1007-1013.

102. Koseki, T., Okuda, M., Sudo, S., Kizaki, Y., Iwano, K., Aramaki, I., and Matsuzawa, H. (2003) Role of two α -L-arabinofuranosidases in arabinoxylan degradation and characteristics of the encoding genes from Shochu Koji Molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*. *J.Biosci.Bioeng.* 96, 232-241.
 103. Kravtchenko, T.P., Arnould, I., Voragen, A.G.J., and Pilnik, W. (1992) Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical β -elimination in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* 19, 237-242.
 104. Lario, Y., Sendra, E., García-Pérez, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., and Pérez-Alvarez, J.A. (2004) Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5, 113-117.
 105. Lau, J.M., McNeil, M., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1987) Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine. *Carbohydrate Research* 168, 245-274.
 106. Laurent, F., Kotoujansky, A., Labesse, G., and Bertheau, Y. (1993) Characterization and overexpression of the pem gene encoding pectin methylesterase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Gene* 131, 17-25.
 107. Le Goff, A., Renard, C.M.G.C., Bonnin, E., and Thibault, J.F. (2001) Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers* 45, 325-334.
 108. Lee, C.H. Cereal Fermentations in Countries of the Asia-Pacific Region. Food and agriculture organization of the united nations. *FAO agricultural services. Bulletin N° 138*. 1999. Rome. Fermented cereals. A global perspective.
- Ref Type: Report
109. Lee, T.S., Lee, T.S., and Oh, K.H. (1984) Effect of kojis on the composition of kochujang. *Journal of the Korean Society of Food and Nutrition* 13, 238-246.
 110. Leitig, V.A., and Wicker, L. (1997) Inorganic cations and polyamines moderate pectinesterase activity. *J.Food Sci.* 62, 253-255.
 111. Lerouge, P., O'Neil, M.A., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1993) The purification of commercially available endo- α -L-arabinanases and α -L-arabinosidase for use in the structural analysis of pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 243, 373-378.
 112. Lievens, S., Goormachtig, S., Herman, S., and Holsters, M. (2002) Patterns of Pectin Methylesterase Transcripts in Developing Stem Nodules of *Sesbania rostrata*. *MPMI* 15, 164-168.
 113. Lim, Y.M., and Chung, M.C.M. (1993) Isolation and characterization of pectin methylesterase from papaya. *Biophys.* 307, 15-20.
 114. Limberg, G., Korner, R., Buchholt, H.C., and etc (2000) Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin

- lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydrate Research* 327, 293-307.
115. Lourenco, E.J., and Cabutani, A.T. (1984) Purification and properties of pectinesterase from papaya. *J Sci Food Agric* 35, 1120-1127.
 116. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
 117. Ma, R., Reese, J.C., Black, W.C., and Bramelcox, P.J. (1990) Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *J.Insect Physiol.* 36, 507-512.
 118. Mach, R.L., and Zeilinger, S. (2003) Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60, 515-522.
 119. Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., and Kikuchi, H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 138, 1157-1161.
 120. Maldonado, M., Navarro, A., and Callieri, D. (1986) Production of pectinases by *Aspergillus* sp. using differently pretreated lemon peel as the carbon source. *Biotechnology Letters*.
 121. Maldonado, M.C., Strasser de Saad, A.M., and Callieri, D. (1989a) Catabolite repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. *Curt.Microbiol.* 18, 303-306.
 122. Maldonado, M.C., Strasser de Saad, A.M., and Callieri, D. (1989b) Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. *Sci.des Aliments* 9, 101-110.
 123. Maldonado, M.C., Strasser, A., and Callieri, D. (1994) Purification and characterization of pectinesterase produced by a strain of *Aspergillus niger*. *Current Microbiology* 28, 193-196.
 124. Marcus, L., and Schefter, A. (1983) Single step chromatographic purification and characterization of the endopolygalacturonase and pectinesterase of the fungus *Botrytis cinerea* Pers. *Physiological Plant Pathology* 122, 267-271.

125. Markovic, O., and Jornvall, H. (1992) Disulfide bridges in tomato pectinesterase: variations from pectinesterases of other species; conservation of possible active site segments. *Protein Sci.* *1*, 1288-1292.
126. Markovic, O. (1998) Soybean seed pectinesterase. *Seed Science Research* *8*, 455-461.
127. Markovic, O., Cederlund, E., Griffiths, W.J., Lipka, T., and Jörnvall, H. (2002) Characterization of carrot pectin methylesterase. *Cellular and Molecular Life Sci* *59*, 513-518.
128. Markovic, O., and Janecek, S. (2004) Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohydrate Research* *339*, 2281-2295.
129. Markovic, O., and Jornvall, H. (1986) Pectinesterase. The primary structure of the tomato enzyme. *Eur.J.Biochem.* *158*, 455-462.
130. Markovic, O., and Kohn, R. (1984) Mode of pectin deesterification by *Trichoderma reesei* pectinesterase. *Experientia* *40*, 842-843.
131. Markovic, O., Slezárik, A., and Labudová, I. (1985) Purification and characterization of pectinesterase and polygalacturonase from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters* *27*, 267-271.
132. Martinez Trujillo, M.A. Estudio cinético de la producción secuenciada de pectinasas en *Aspergillus flavipes* FP-500. 2009.
Ref Type: Thesis/Dissertation
133. Martinez-Trujillo, A., Aranda, J.S., Gómez-Sánchez, C., Trejo-Aguilar, B., and Aguilar-Osorio, G. (2009) Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology* *40*, 40-47.
134. Matssura, Y., Matsubara, K., and Fuchigami, M. (2000) Molecular composition of onion pectic acid. *Food Chemistry and Toxicology* *65*, 1160-1163.
135. McAunley, A. Basic soil properties. 2005. Montana State University.
Ref Type: Report
136. McCleart, B.V. (2001). *Advances Dietary Fiber Technology*, (Blackwell Science Ltd. Oxford).
137. McCleary, B.V. (1986) Enzymatic modification of plant polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules* *8*, 349-354.
138. McNeil, M., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1980) Structure of Plant Cell Walls: X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* *66*, 1128-1134.
139. Micheli, F. (2001) Pectin methylesterase: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* *6*, 414-419.

140. Mikami, S., Iwano, K., Shinoki, S., and Shimada, T. (1987) Purification and some properties of acid-stable α -amylases from shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *Agric.Biol.Chem.* *51*, 2495-2501.
141. Mikami, S., Karita, S., Iwano, K., Shinoki, S., and Shimada, T. (1988) Purification and some properties of hydrolases from shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *Nippon Nogeikgaku Kaishi* *62*, 867-874.
142. Miller, L., and Macmillan, J.D. (1970) Mode of action of pectic enzymes. II: Further purification of exopolygalacturonase lyase and pectinesterase from *Clostridium multifementans*. *J.Bacteriol.* *102*, 72-78.
143. Mohnen, D. (1999). *Comprehensive natural products chemistry*, (Elsevier: Dordrech.The Netherlands).
144. Morris, E.R., Powell, D.A., Gidley, M.J., and Rees, D.A. (1982) Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *Journal of Molecular Biology* *155*, 507-516.
145. Moustacas, A.-M., Nari, J., Borel, M., Noat, G., and Ricard, J. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension.The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochemical Journal* *279*, 351-354. 1991.
Ref Type: Journal (Full)
146. Mutter, M. New rhamnogalacturonan degrading enzymes from *Aspergillus aculeatus*. 1-141. 1997. Wageningen Agricultural University.The Netherlands.
Ref Type: Thesis/Dissertation
147. Nagamine, K., Murashima, K., Kato, T., Shimoi, H., and Ito, K. (2003) Mode of α -amylase production by the schochu koji mold *Aspergillus kawachii*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* *67*, 2194-2202 .
148. Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Tomizuka, N. (2000) Amethylotrophic pathway participates in pectin utilization of *Candida boidinii*. *Appliedand Environmental Microbiology* *66*, 4253-4257.
149. Nakamura, T., Hours, R.A., and Sakai, T. (1995) Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science* *60*, 468-472.
150. Nari, J., Noat, G., Diamantidis, G., Wouddstra, M., and Ricard, J. (1986) Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur.J.Biochem.* *155*, 199-202.
151. Nari, J., Noat, G., and Ricard, J. (1991) Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell-wall pectin methylesterase. *Biochem.J.* *279*, 343-350.
152. Navarro del Cañizo, A., Hours, R.A., Miranda, M.V., and Cascone, O. (1994) Fractionation of fungal pectic enzymes by immobilised metal ion affinity chromatography. *J.Sci.Food Agric.* *64*, 527-531.

153. Nomachi, W., Urago, K.I., Oka, T., Ekino, K., Matsuda, M., Goto, M., and Furukawa, K. (2002) Molecular breeding of *Aspergillus kawachii* overproducing cellulase and its application to brewing barley shochu. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93, 382-387.
 154. Nunokawa, Y., Shiinoki, S., and Hirotsune, M. (1982) Production of mirin with use of shochu-*koji*. II Quality improvement of mirin. *Nippon JozoKyokai Zassi* 77, 123-125.
 155. O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 294, 846-849.
 156. O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu.Rev.Plant Biol.* 55, 109-139.
 157. Obayashi, A., and Uchi, S. (1999). Manufacture of shochu from sweet potatoes, (: Tokyo. Japan).
 158. Omori, T., Takeshima, N., and Shimoda, M. (1994) Formation of acid-labile α -amylase during barley-*koji* production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78, 27-30.
 159. Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., and Rinzema, A. (2000) Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *TIBTECH* 18, 356-360.
 160. Oriol, E., Schettino, B., Viniestra-Gonzales, G., and Raimbault, M. (1988) Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *Journal of Fermentation Technology* 66, 57-62.
 161. Palmer, T. (1991). Extraction and Purification of Enzymes. In: *Understanding Enzymes*. Ellis Horwood.Ltd, ed. (: England), pp. 301-317.
 162. Parenicová, L., Benen, J.A.E., Kester, H.C.M., and Visser, J. (1988) *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry* 251, 72-80.
 163. Parenicová, L. *Pectinases of Aspergillus niger: A Molecular And Biochemical Characterisation*. 2000. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
164. Pelloux, J., Rusterucci, C., and Mellerowicz, E.J. (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* 12, 267-277.
 165. Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, I., and Arst, H.N.Jr. (2008) Review: Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology* 16, 291-300.
 166. Phan, T.D., Bo, W., West, G., and Lycett, G.W. (2007) Silencing of the major salt-dependent isoform of pectinesterase in tomato alters fruit softening. *Plant Physiol.* 144, 1960-1967.

167. Pilnik, W., and Rombouts, F.M. (1981). Pectic enzymes. In: Enzymes and Food Processing. G.G.Birch, and N.a.P.K.J.Blakebrough, eds. (Applied Science Publishers Ltd.: London:), pp. 105-28.
 168. Raab, B. (1992) Characterization of endopolygalacturonase (EC 3.2.1.15) from *Aspergillus niger* as glycoprotein by electrophoretic methods and lecitin affinity-blotting. *Electrophoresis* 13, 807-808.
 169. Raimbault, M. (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1.
 170. Ralet, M.C., Bonnin, E., and Thibault, J.-F. (2002) Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography B* 753, 157-166.
 171. Ralet, M.C., Dronnet, V., Buchholt, H.C., and Thibault, J.F. (2001) Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research* 336, 117-125.
 172. Rättö, M., and Viikari, L. (1996). Pectinases in wood debarking. In: Progress in Biotechnology.Pectins and Pectinases Proceedings of an International Symposium. J.V.and, ed. (Elsevier), pp. 979-982.
 173. Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G., and Boccara, M. (1994) Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*:physiological, biochemical and immunochemical studies. *Microbiology* 140, 3249-3255.
 174. Renard, C. Etude des polysaccharides parietaux de la pomme. Extraction at caracterization par des methodes chimiques et enzymatiques. 1989. Université de Nantes, France.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
175. Rexova-Benkova, L., and Markovic, O. (1976). Pectic enzymes. Academic Press, ed. (: New York), pp. 323-385.
 176. Rha, E., Park, H.J., Kim, M.O., Chung, Y.R., Lee, C.W., and Kim, J.W. (2001) Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 201, 105-109.
 177. Richard, L., Qin, L.X., Gadal, P., and Goldberg, R. (1994) Molecular characterization of a putative pectin methylesterase cDNA and its expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 355, 135-139.
 178. Ride, J.P., and Drysdale R.B. (1972) A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiological Plant Pathology* 2, 7-15.
 179. Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. (2001a) Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929-967.
 180. Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. (2001b) Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929-967.

181. Ried, J.L., and Collmer, A. (1985) Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 615-622.
 182. Rillo, L., Castaldo, D., Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., and Quagliuolo, L. (1992) Purification and properties of pectin methylesterase from mandarin orange fruit. *J.Agric.Food Chem.* 40, 591-593.
 183. Rojas, N., Ortiz, G., Baruque, D., Cavalitto, S., and Ghiringhelli, P. (2011a) Production of heterologous polygalacturonase I from *Aspergillus kawachii* in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38, 1437-1447.
 184. Rojas, N., Ortiz, G., Baruque, D., Cavalitto, S., and Ghiringhelli, P. (2011b) Production of heterologous polygalacturonase I from *Aspergillus kawachii* in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38, 1437-1447.
 185. Rombouts, F.M., and Pilnik, W. (1980). Pectic enzymes, (Academic Press: New York).
 186. Saha, B.C. (2000) α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 403-423.
 187. Sakamoto, T., Bonnin, E., Quemener, B., and Thibault, J.F. (2002) Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572, 10-18.
 188. Savary, B.J., Hotchkiss, A.T., and Cameron, R.G. (2002) Characterization of a salt-independent pectin methylesterase purified from Valencia orange peel . *J.Agric.Food Chem.* 50, 3553-3558.
 189. Savary, B.J., Hotchkiss, A.T., Fishman, M.L., Cameron, R.G., and Shatters, R.G. (2003). Development of a valencia orange pectin methylesterase for generating novel pectin products. In: *Advance in Pectin and Pectinase Research*. A.G.J.Voragen, H.A.Schols, and R.Visser, eds. (Kluwer Academic), pp. 345-361.
 190. Schols, H.A. Structural characterization of pectic hairy regions isolated from apple cell walls. 1-155. 1995. Wageningen Agricultural University.The Netherlands.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
191. Schols, H.A., Bakx, E.J., Schipper, D., and Voragen, A.G.J. (1995) A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research* 279, 265-279.
 192. Schols, H.A., Posthumus, M.A., and Voragen, A.G.J. (1990) Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydrate Research* 206, 117-129.

193. Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (1994) Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research* 256, 83-95.
194. Scott-Craig, J.S., Cheng, Y.-Q., Cervone, F., DeLorenzo, G., Pitkin, J.W., and Walton, J.D. (1998) Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Appl.Env.Microbiol.* 64, 1497-1503.
195. Semenova, M.V., Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Okunev, O.N., and Sinitsyn, A.P. (2003) Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry (Moscow)* 68, 559-569.
196. Setoguchi, S., Takamine, K., Kamesawa, H., and Hamasaki, Y. (1993) Study on sweet potato koji. *Kagoshima-ken Kogyo Gijutsu Senta Kenkyu Hokoku* 7, 13-19.
197. Shen, Z., Manning, G., Reese, J., and Reeck, G.R. (1999) Pectin methylesterase from rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.)(*Coleoptera:Curculionidae*): Purification and characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 209-214.
198. Shen, Z.C., Pappan, K., Mutti, N.S., Denton, M., Zhang, Y., Kanost, M.R., Reese, J.C., and Reeck, G.R.J. (2005) Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. *J.Insect Sci.* 5.
199. Shevchik, V., Condemine, G., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Robert-Baudouy, J. (1996) Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* 19, 455-466.
200. Shimamura, K., Sasaki, T., and Sato, T. (2001). Manufacture of alcoholic beverages using fruit juice and white koji, (Kokai Tokkyo Koho: Japan).
201. Shivakumar, P.D., and Nand, K. (1995) Anaerobic degradation of pectin by mixed consortia and optimization of fermentation parameters for higher pectinase activity. *Lett.Appl.Microbiol.* 20, 117-119.
202. Singthong, J., Cui, S.W., Ningsanond, S., and Goof, H.D. (2004) Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*.
203. Smith, B.J. (1984). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, (The Humana Press Inc.Clifton: New Jersey).
204. So, M.-H., Lee, Y.-S., Han, S.-H., and Noh, W.-S. (1999) Analysis of major flavor compounds in Takju mash brewed with a modified Nuruk. *Han'guk Sikk'um Yongyang Hakhoechi* 12, 421-426.
205. Stephen, A.M., and Cummings, J.H. (1979) Water-holding by dietary fibre in vitro and its relationship to faecal output in man. *Gut.* 20, 722-729.

206. Sudo, S., Ishikawa, T., Sato, K., and Oba, T. (1994) Comparison of acid-stable α -amylase production by *Aspergillus kawachii* in *solid-state* and submerged cultures. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77, 483-489.
207. Sun, D., and Wicker, L. (1999) Kinetic Compensation and the Role of Cations in Pectinesterase Catalysis. *J.Agric.Food Chem.* 47, 1471-1475.
208. Talmadge, K.W., Keegstra, K., Bauer, W.D., and Albersheim, P. (1973) The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol.* 51, 158-173.
209. Teramoto, Y., Saigusa, N., Yoshida, Y., and Ueda, S. (1994) Production and characteristics of red rice sake. *J.Inst.Brew.* 100, 3-6.
210. Thibault, J.F., Renard, C.M.G.C., Axelos, M.A.V., Roger, P., and Crepeau, M.J. (1993) Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid-hydrolysis. *Carbohydrate Research* 238, 271-286.
211. Thibault, J.-F., and Ralet, M.-C. (2003). Physico-chemical properties of pectins in the cell walls and after extraction. In: *Pectin and Pectinase Research*. A.G.J.Voragen, H.A.Schols, and J.Visser, eds. (Kluwer Academic), pp. 91-105.
212. Toyama, H., and Toyama, N. (1997) Isolation of acid hyper-producing strains from hyperpolyploids of *Aspergillus kawachii*. *Microbios* 90, 23-32.
213. Trevisan, G.L., Oliveira, E.H.D., Peres, N.T.A., Cruz, A.H.S., Martinez-Rossi, N.M., and Rossi, A. (2011) Transcription of *Aspergillus nidulans* *pacC* is modulated by alternative RNA splicing of *palB*. *FEBS Letters* 585, 3442-3445.
214. van Alebeek, G.-J., van Scherpenzeel, K., Beldman, G., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. (2003) Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. *Biochem.J.* 372, 211-218.
215. Van Buren, J. (1979) The chemistry of texture in fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies* 10, 1-23.
216. Van de Vis, J.W. Characterization and mode of action of enzymes degrading galactan structures of arabinogalactans. 1994. Wageningen University, Wageningen, Netherlands, 1994.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
217. Versteeg, C. Pectinesterases from the orangefruit - their purification, general characteristics and juice cloud destabilizing properties. 1979. Wageningen Agricultural University.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
218. Vidhyasekaran, P. (1997). Fungal pathogenesis in plants and crops. *Molecular biology and host defense mechanisms*, (INC : New York).

219. Vilariño, C., Hours, R.A., and Cascone, O. (1993) Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol* 26, 107-110.
220. Vita, C.E., Contreras Esquivel, J.C., and Voget, C.E. (2009) The pectolytic system of the industrial fungus *Aspergillus kawachii*. *Food Science and Biotechnology* 8, 1365-1370.
221. Vlugt-Bergmans, C.J.B., Meeuwssen, P.J.A., Voragen, A.G.J., and Ooyen, A.J.J.V. (2000) Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. *Applied Environmental Microbiology* 66, 36-41.
222. Voget, C.E., Vita, C.E., and Contreras Esquivel, J.C. (2006) One-step concentration and partial purification of non-acidic *Aspergillus kawachii* polygalacturonases by adsorption to glass fiber microfilters. *Biotechnol.Lett.* 28, 233-239.
223. Voragen, A.G., and Pilnik W. (1989) Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology* 93-115.
224. Voragen, A.G.J., Beldman, G., and Schols, H. (2001). Chemistry and enzymology of pectins. In: *Advanced Dietary Fiber Technology*. B.V.McCleary, and L.rosky, eds. (Blackwell Publishing.: Oxford), pp. 19-23.
225. Voragen, A.G.J., Coenen, G.-J., Verhoef, R.P., and Schols, H.A. (2009) Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct.Chem.* 20, 263-275.
226. Waldron, K.W., Parker, M.L., and Smith, A.C. (2003) Plant cell walls and food quality. *Compr.Rev.Food Sci.Food Saf.* 2, 101-109.
227. Warren, M.E., Kester, H., Benen, J., Colangelo, J., Visser, J., Bergmann, C., and Orlando, R. (2002) Studies on the glycosylation of wild-type and mutant forms of *Aspergillus niger* pectin methylesterase. *Carbohydrate Research* 337, 803-812.
228. Warrilow, A.G.S., Turner, R., and Jones, M.G. (1994) A novel form of pectinesterase in tomato. *Phytochemistry* 35, 863-868.
229. Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., and Knox, J.P. (2001a) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant.Mol.Biol.* 47, 9-27.
230. Willats, W.G.T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., and van Alebeek, G.J.W. (2001b) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J.Biol.Chem.* 276, 19404-19413.
231. Wong SS, Ho TY, Ngan AH, Woo PC, Que TL, and Yuen KY (2001) Biotyping of *Penicillium marneffeii* reveals concentration-dependent growth inhibition by galactose. *Journal Of Clinical Microbiology* 39, 1416-1421.
232. Wong, D.W.S. (1995). Pectic Enzymes. In: *Food Enzymes.Structure and Mechanism*. D.W.S.Wong, ed. (Capman & Hall: Mexico), pp. 212-236.

233. Wubben, J.P., Have, A.T., van Kan, J.A.L., and Visser, J. (2000) Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea*; by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Current Genetics* 37, 152-157.
234. Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., and Yadav, K.D.S. (2009) Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry* 44, 1-10.
235. Yagi, F., Fan, J., Tadera, K., and Kobayashi, A. (1986) Purification and characterization of carboxyl proteinase from *Aspergillus kawachii*. *Agric.Biol.Chem.* 50, 1029-1033.
236. Yamada, H. (1994) Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydrate Polymers* 25, 269-276.
237. Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M., and Mikami, S. (2011) Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112, 233-237.
238. Yu, L., and Mort, A.J. (1996). *Pectins and pectinases*, (Elsevier Science B.V.: Amsterdam).
239. Zandleven, J., Sorensen, S.O., Harholt, J., Beldman, G., Schols, H.A., Scheller, H.V., and Voragen, A.G.J. (2007) Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 68, 1219-1226.
240. Zhang, W., and Yang, R. (2001) Application of engineering-strain in preparation of acetic acid beverage with orange juice. *Zhongguo Niangzao* 3, 22-26.

Capítulo 5

Conclusiones generales

Aspergillus kawachii produce diferentes enzimas extracelulares involucradas en la degradación de la pared celular vegetal. Entre ellas, en la presente tesis doctoral se aislaron y caracterizaron parcialmente las siguientes actividades enzimáticas: poligalacturonasa, pectin liasa, pectinesterasa, arabinasa y arabinofuranosidasa, galactanasa, β -galactosidasa, α -L-ramnosidasa, β -D-fucosidasa y arabinogalactanasa. La mayoría de dichas actividades se detectaron a pH 2,0, por lo que se evidencia nuevamente la naturaleza acidofílica de *A. kawachii* y su capacidad de producir enzimas activas a pHs ácidos. La presencia de pectina en el medio de cultivo favoreció la producción de aquellas enzimas de carácter constitutivo (poligalacturonasa y arabinogalactanasa) e indujo la producción de las restantes enzimas de carácter inducible.

Entre todas las actividades encontradas se seleccionó a la pectinesterasa, sobre la cual se estudió particularmente su producción y caracterización. Así, se encontraron las siguientes peculiaridades de la pectinesterasa de *A. kawachii*:

- Es inducida por la presencia de ácido galacturónico en el medio de cultivo, por lo que se postula que el mecanismo regulatorio de su síntesis sería similar al descrito en otros *Aspergilli*.
- Los máximos niveles de actividad se encontraron en medios líquidos con una combinación de harina de soja y pectina, cuya optimización se llevó a cabo mediante un diseño experimental del tipo de superficie de respuesta (Doehlert).
- Los resultados de la optimización se validaron en un biorreactor tipo tanque agitado sin deflectores, en el cual se mantuvo el típico crecimiento fúngico en pellets, aunque de menor tamaño comparado con los observados en frascos agitados. Esto demuestra que este tipo de biorreactor puede ser apropiado para un cambio de escala.

- Los cultivos de *A. kawachii* en fermentador revelaron una producción enzimática mayor que la encontrada en frascos erlenmeyeres, utilizando la misma composición de medio, a todas las horas de cultivo analizadas.
- Se purificó y caracterizó, revelando un PM de 44,5 kDa y un PI de 3,8.
- La enzima no es capaz de actuar a temperaturas mayores a los 60°C. El pH óptimo resultó de 4,5. Posee una actividad residual del 25 % a pH 2, característica que permite considerar su potencial uso en la clarificación de jugo de limón.
- La enzima es más estable a pH ácido que la equivalente de *A. aculeatus*. La pérdida parcial de actividad revierte substancialmente luego de una incubación a pH 5,0.
- La enzima desesterifica a la pectina de modo aleatorio, mecanismo de acción similar al reportado para otras pectinesterasas de origen fúngico.
- Los ensayos de clarificación de jugo de limón demostraron esta enzima es adecuada para tal fin, siendo comparativamente más efectiva que la de *A. acuelatus*. Esta propiedad aventura la posibilidad de clonar y sobreexpresar esta enzima en levaduras para incrementar su producción y posterior utilización en la clarificación industrial de jugo de limón.

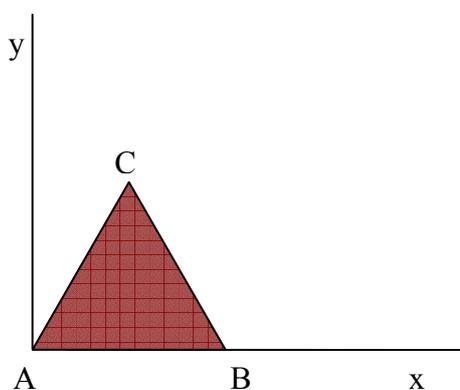
Anexo

Diseño experimental: Método de Doehlert

El método de Doehlert es un diseño de superficie de respuesta. La matriz de Doehlert es un diseño de segundo orden, que ha sido ampliamente utilizado en numerosas situaciones. Permite la identificación de los puntos críticos (máximo, mínimo y silla de montar) en cada paso de la optimización del proceso. Consiste en un diseño experimental en el que un conjunto de puntos del sistema se distribuye uniformemente en una trama romboidea (un hexágono en el caso de dos variables) alrededor de un valor central. El dominio experimental se prueba con un número mínimo de experimentos que siguen un acercamiento secuencial. Para k factores, se requieren (k^2+k+1) experimentos y se le asigna a cada factor un mínimo de tres niveles. Esta característica permite una elección libre de factores que se asignan a un número variable de niveles y, a diferencia de otros diseños de superficie de respuesta, tiene la ventaja que puede ser ampliado cambiando el centro del hexágono de un nuevo ensayo.

La geometría del universo muestral surge a partir de una figura generatriz que se mueve manteniendo un vértice fijo. En el caso de trabajar en dos dimensiones, la figura generatriz es un triángulo equilátero que se gira hasta formar un hexágono. La figura generatriz es un tetraedro en tres dimensiones. A fin de determinar el valor en todos los puntos de las variables x e y , y para asegurar que estén equidistantes se toma como imagen generatriz al triángulo equilátero ABC de lado unitario y se determina la posición de cada punto tomando arbitrariamente al punto A como $x = 0$, $y = 0$.

Teniendo en cuenta este valor, los extremos del triángulo quedan situados en:



Lado	x	y
A	0,000	0,000
B	1,000	0,000
C	0,500	0,866

A fin de calcular las coordenadas del resto de los vértices de la figura característica del modelo (en este caso el hexágono) se aprovecha la propiedad de que cada punto surge de la sustracción de dos puntos cualesquiera de la figura generatriz (en este caso el triángulo ABC, Fig. A.1). Por ejemplo, el punto D resulta de $C - B$, E resulta de $A - B$, etc.

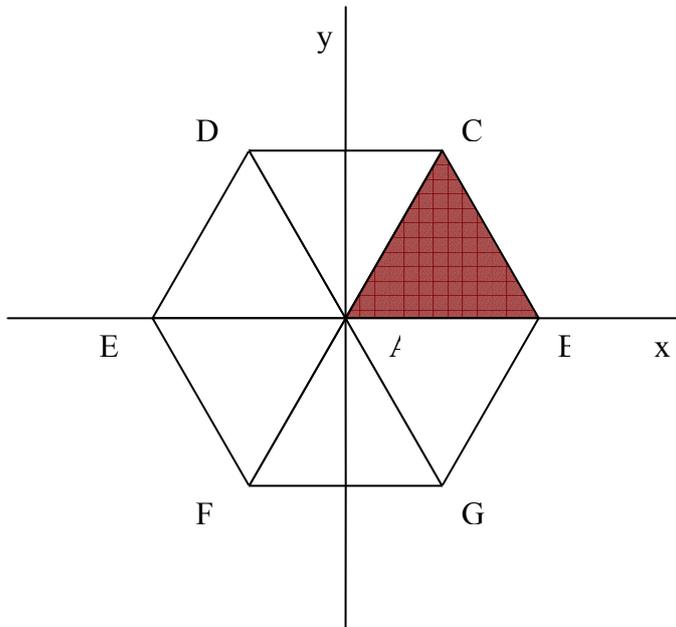


Figura A.1: Puntos del hexágono utilizados en el diseño de superficies de respuesta.

Así los extremos restantes del hexágono se ubican en los puntos indicados en la Tabla A.1.

Tabla A.1: Ubicación de los puntos que definen el hexágono en el diseño de Doehlert, incluyendo al punto central (A)

Punto	X	y
A	0,000	0,000
B	1,000	0,000
C	0,500	0,866
D	-0,500	0,866
E	-1,000	0,000
F	-0,500	-0,866
G	0,500	-0,866

Este cálculo no resulta muy útil en dos dimensiones pero es muy práctico cuando el modelo se complica y se usan tres variable o más. En el caso de trabajar con tres variables, la figura generatriz es un tetraedro de arista unitaria cuyos vértices se encuentran en (0,0,0), (1,0,0), (0,5, 0,866, 0), (0,5, 0,289, 0,816).

En general, para d factores, la figura generatriz se arma agregando a la Fig. A.1:

$$\left[\frac{1}{2}, \frac{1}{2\sqrt{3}}, \frac{1}{2\sqrt{6}}, \dots, \frac{1}{\sqrt{2(d-1)(d-2)}}, \frac{1}{\sqrt{2d(d-1)}}, \frac{\sqrt{(d+1)}}{\sqrt{2d}} \right]$$

y completando los puntos anteriores con ceros para la nueva coordenada. En la tabla A.2 se indica cuales son los valores codificados.

Tabla C: Generatriz del diseño estadístico de superficie de Doehlert

0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
1,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
0,50000	0,86602	0,00000	0,00000	0,00000
-0,50000	0,86602	0,00000	0,00000	0,00000
0,50000	0,28868	0,81650	0,00000	0,00000
-0,50000	0,28868	0,81650	0,00000	0,00000
0,00000	-0,57735	0,81650	0,00000	0,00000
0,50000	0,28868	0,20413	0,79067	0,00000
-0,50000	0,28868	0,20413	0,79067	0,00000
0,00000	-0,57735	0,20413	0,79067	0,00000
0,00000	0,00000	-0,61238	0,79067	0,00000
0,50000	0,28868	0,20413	0,15812	0,77460
-0,50000	0,28868	0,20413	0,15812	0,77460
0,00000	-0,57735	0,20413	0,15812	0,77460
0,00000	0,00000	-0,61238	0,15812	0,77460
0,00000	0,00000	0,00000	0,63460	0,77460

Obsérvese que los valores codificados para el modelo de dos dimensiones resultan de tomar los valores comprendidos a la izquierda y por encima de la primera línea divisoria y sus opuestos. Para el modelo de tres variables se utilizan los valores comprendidos por la segunda línea divisoria y sus opuestos. Por cada nueva variable

agregada se amplía el rango de datos hasta la siguiente línea divisoria. Estos valores corresponden a las variables codificadas y a partir de ellos se calculan los valores reales de las variables x e y .

Las coordenadas del hexágono se denominan variables codificadas y a partir de ellas se calculan los valores reales de las variables x e y . Para ello se deben definir los límites del universo muestral, es decir, los valores máximos y mínimos de las variables a ensayar. En base a ellos se calculan los rangos para cada variable (real) y se calcula el resto de los puntos basándose en una relación lineal entre el valor codificado y el valor real según la expresión:

$$X_{real} = X_{codificada} \times \frac{\Delta X_{real}}{\Delta X_{codificada}} + X_o$$

Donde X_o es el valor real de la variable X en el punto central. $X_{codificada}$ es el valor codificado que entrega el modelo y ΔX_{real} y $\Delta X_{codificada}$ son las diferencias entre el valor más alto y el valor más bajo de los números reales y codificados respectivamente. Para dos variables, se estudian tres valores de la primera y cinco de la segunda. El mismo tratamiento se sigue para las demás variables. Se realiza un triplicado del punto central para determinar la varianza propia del experimento. Junto con los valores centrales quedan en total 9 experimentos a realizar.

Una gran ventaja que posee este método es que si se desea aumentar el rango de estudio en alguna de las variables, simplemente se corre el punto central y se recalculan los nuevos valores de las variables x e y . En el caso de estudiar tres variables el número de experimentos a realizar es 15 (12 puntas y 3 centrales).

Para dos factores, se estudian 3 valores del primero y 5 del segundo, si el estudio es de 3 variables, se estudian 3 valores de la primera, 5 de la segunda y 7 de la tercera. Una vez realizada la experiencia y medida la variable dependiente (actividad PE) se determinan los coeficientes de un polinomio del tipo $z = b_0 + b_1x + b_2y + b_3x^2 + b_4y^2 + b_5xy$. Los coeficientes se determinan por el método de cuadrados mínimos. La forma más sencilla de manejar este número de datos es mediante el cálculo matricial.

Si se definen las siguientes matrices:

$$X = \begin{pmatrix} 1 & x_1 & y_1 & x_1^2 & y_1^2 & x_1 y_1 \\ 1 & x_2 & y_2 & x_2^2 & y_2^2 & x_2 y_2 \\ 1 & x_3 & y_3 & x_3^2 & y_3^2 & x_3 y_3 \\ 1 & x_4 & y_4 & x_4^2 & y_4^2 & x_4 y_4 \\ 1 & x_5 & y_5 & x_5^2 & y_5^2 & x_5 y_5 \\ 1 & x_6 & y_6 & x_6^2 & y_6^2 & x_6 y_6 \\ 1 & x_7 & y_7 & x_7^2 & y_7^2 & x_7 y_7 \\ 1 & x_8 & y_8 & x_8^2 & y_8^2 & x_8 y_8 \\ 1 & x_9 & y_9 & x_9^2 & y_9^2 & x_9 y_9 \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ b_5 \end{pmatrix} \quad Z = \begin{pmatrix} z_1 \\ z_2 \\ z_3 \\ z_4 \\ z_5 \\ z_6 \\ z_7 \\ z_8 \\ z_9 \end{pmatrix}$$

donde los x_i e y_i son los valores codificados de X e Y para cada experiencia, B es el vector de los coeficientes a determinar y Z es el vector de los resultados experimentales de cada ensayo, se observa que $X \times B = Z$. Este es un sistema de ecuaciones redundantes, con más ecuaciones que incógnitas, así que no puede despejarse directamente B del producto anterior. Para resolverse este sistema se debe obtener la matriz seudo inversa de X a partir de $(X^T X)^{-1} \cdot X^T$ donde X^T es la matriz transpuesta de X (los cálculos matriciales se realizaron por computadora utilizando el programa Mathcad). Como hay más ecuaciones que incógnitas los valores obtenidos para los parámetros son estimadores que minimizan la distancia entre las variables reales y las obtenidas. Realizando el análisis de varianza de los resultados obtenidos para cada parámetro del polinomio se decide cuales de ellos son significativos y cuales no. Con aquellos que son significativos se vuelven a calcular los parámetros del polinomio y con ellos puede realizarse el gráfico de la superficie de respuesta o bien calcular en forma analítica la existencia de máximos o mínimos en la zona del estudio.

Bibliografía

1. Doehlert, D.H. (1970). Uniform shell designs. *Applied Statistics* 19, 231-239.
2. Cavalitto, S.F. & Mignone, C.F. (2007). Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochem.* 42, 175-179.