



**Universidad de Oriente  
Facultad de Ciencias Naturales  
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial**

**Producción, Purificación y Caracterización de la  
Poligalacturonasa de una Cepa de Levadura Aislada  
de Residuales del Beneficio Húmedo del Café**

**TESIS PRESENTADA EN OPCION AL GRADO CIENTIFICO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

*Manuel de Jesús Serrat Díaz*

**Santiago de Cuba  
2003**



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Centro de Estudios de Biotecnología Industrial**

**Producción, Purificación y Caracterización de la  
Poligalacturonasa de una Cepa de Levadura Aislada de  
Residuales del Beneficio Húmedo del Café**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Autor: Prof. Asist., *MSc* . Manuel de Jesús Serrat Díaz**

**Tutores: Prof. Tit., Lic. Rosa C. Bermúdez Savón, Dr C  
Catedr., Lic. Tomás González Villa, *PhD***

**Consultante: Inv. Tit., Lic. Irma Valdés Santandreu, Dr C**

**Santiago de Cuba  
2003**

## AGRADECIMIENTOS

Antes de dar por concluida definitivamente la elaboración de esta memoria, me resulta inevitable y necesario expresar mi sincero agradecimiento a aquellas personas e instituciones que, con su apoyo material o espiritual, han contribuido a que esta obra de varios años de arduo trabajo llegue a feliz término. En primer lugar menciono a mis tutores, Dra. Rosa Catalina Bermúdez y Dr. Tomás G. Villa, por su confianza y apoyo, por su exigencia y enseñanzas; a la Dra. Irma Valdés, consultante de esta tesis, por su permanente disposición a colaborar y su sabia asesoría; al Dr. Francisco Simón, por sus oportunas y agudas observaciones; a los investigadores y miembros del Consejo Científico del ICIDCA, en especial a los Doctores Antonio Bell, Hilda Rodríguez, Miguel Otero y José Rodríguez, por sus atenciones y por el crítico y excelente debate que sobre este trabajo sostuvimos; a los Doctores Camelia Jústiz y René Viera, por dedicar parte de su valioso tiempo a leer y criticar mi trabajo; a Isabel y Miladis, por su valioso e indispensable apoyo en el laboratorio; a Arney y sus compañeros del equipo de producción del CIGB, por su efectiva y desinteresada ayuda; a Ulises y demás compañeros del Laboratorio de Investigaciones del Hospital Oncológico, que pusieron sus equipos y medios a mi disposición; a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, donde realicé una buena parte de esta investigación, por su acogida afectuosa, por lo allí aprendido y por los gratos momentos compartidos; a mis compañeros del CEBI, por su constante preocupación, por sus consejos, crítica y ayuda cuando fue necesario; a la Vicerrectoría de investigaciones y a la Comisión de Grado de la Universidad de Oriente, por su asesoría e inestimable apoyo; a los compañeros Eugenio y Zayas, de la imprenta universitaria, a quienes debo la encuadernación en tiempo de este trabajo y a las Doctoras América García y Alina Marañón, por su preocupación y sugerencias.

A Norita, Suyén, Arelis, Cárdenas, Maikel, Eric, amigos cercanos en quienes siempre encontré la necesaria frase de aliento y la sonrisa, que son sin duda la mejor medicina cuando flaquea el optimismo y la paciencia.

A mi familia, por soportar con insuperable paciencia mis kilométricas jornadas de trabajo y mi escaso tiempo para expresarles todo lo que los quiero y por ser mi estímulo mayor.

A nuestra Revolución, sin la que hubiese sido imposible llegar a este momento.

A todos, incluso los que pueda haber olvidado por la premura con que estoy obligado a redactar estas breves líneas, pero que de una forma u otra han brindado su desinteresado aporte y que por ello merecen mi permanente consideración,

¡MUCHAS GRACIAS!

*A mis maestros y profesores*

*No os dejéis dominar por un estéril escepticismo... Vivid en la serena paz de los laboratorios y las bibliotecas. Preguntad ante todo: ¿Qué he hecho por ilustrarme? Y cuando hayáis adelantado en vuestro camino, interrogaos nuevamente: ¿Qué he hecho por mi patria? Hasta el día en que podáis sentir la dicha infinita de pensar que habéis contribuido en algo al progreso y al bien de la humanidad.*

Louis Pasteur

1892

## SÍNTESIS

El conocimiento existente sobre la diversidad y potencial productivo de las levaduras pectinolíticas, así como sobre los factores que determinan la síntesis de estas enzimas es bastante limitado. En esta tesis se efectúa el aislamiento e identificación de seis cepas de levaduras pectinolíticas procedentes de frutos y residuales del beneficio húmedo del café, al tiempo que se presenta una caracterización de la diversidad de levaduras que habitan estos materiales. Se reporta por vez primera la existencia de este fenotipo en la especie *Hansenula jadinii* y se propone una novedosa metodología para el aislamiento selectivo de levaduras pectinolíticas, basada en la aptitud de estas estirpes para crecer en cultivo limitado de oxígeno.

Uno de los aislados, designado como *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, exhibe los mayores acumulados de poligalacturonasa (PG) extracelular reportados hasta el presente para una levadura salvaje. Se demuestra que la síntesis de PG en esta cepa es asociada al crecimiento y regulada negativamente por oxígeno, en tanto no se afecta por la presencia de sustancias pécticas en el medio y no sufre de represión catabólica, incluso a concentraciones del catabolito de 100 g·L<sup>-1</sup>. Se aportan nuevos conocimientos en lo concerniente a los factores que afectan la producción de PG en levaduras, tales como oxigenación del cultivo, condiciones de estrés y actividad de la ruta glucolítica. Se

demuestra la viabilidad técnica de la producción simultánea de alcohol y PG a escala piloto en esta cepa.

Se purifica el enzima hasta homogeneidad electroforética, con buenos niveles de recobrado y actividad específica, mediante un procedimiento a simple etapa en cromatografía de intercambio iónico. Se establece que a la PG de *K. marxianus* CCEBI 2011 corresponde una masa molecular de 41,7 kDa y que el enzima clasifica como una endopoligalacturonasa (endo-PG) típica, termoestable, activa a pHs ácidos y frente a pectinas de alto grado de esterificación.

La cepa seleccionada constituye una atractiva alternativa para la valorización de la industria alcoholera y el aprovechamiento de residuos agrícolas pectináceos, al tiempo que se vislumbra un promisorio campo de aplicaciones para la PG producida.

# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1.1 SUSTANCIAS PÉCTICAS. NATURALEZA QUÍMICA, DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA Y FUNCIÓN BIOLÓGICA	9
1.2 ENZIMAS PÉCTICOS	12
1.2.1 Clasificación	12
1.2.2 PGs: distribución y función biológica	13
1.3 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PÉCTICOS EN LEVADURA	15
1.3.1 Rol biológico	15
1.3.2 Factores que afectan la producción de PG en levaduras	17
1.4 APLICACIONES DE LOS ENZIMAS PÉCTICOS.	18
PERSPECTIVAS	



1.4.1	Potencialidades de los enzimas pécticos de levaduras	20
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1.	AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LEVADURAS PECTINOLÍTICAS	25
2.1.1.	Aislamiento e identificación de levaduras pectinolíticas de frutos y residuales del beneficio húmedo del café	25
2.1.1.1.	Medios de cultivo	25
2.1.1.2.	Toma de muestras	26
2.1.1.3.	Aislamiento de levaduras pectinolíticas	27
2.1.1.4.	Identificación de levaduras	31
2.1.1.5.	Observaciones microscópicas y microfotografías	31
2.1.2.	Selección del microorganismo. Comprobación de la clasificación taxonómica	32
2.1.2.1.	Medios de cultivo (composición, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	32
2.1.2.2.	Criterios de selección	32
2.1.2.3.	Ensayo para determinar la utilización de pectina como fuente de carbono	32
2.1.2.4.	Ensayo de tolerancia a etanol	33
2.1.2.5.	Criterios usados para confirmar la clasificación taxonómica	33
2.1.2.6.	Electroforesis en campo pulsado del ADN cromosómico	33

2.1.2.7. Determinación del comportamiento sexual del microorganismo	34
2.1.3. Ensayo de actividad pectinolítica en placa	35
2.1.3.1. Medio de cultivo	35
2.1.3.2. Procedimiento	35
2.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PG EN <i>K. marxianus</i> CCEBI 2011	36
2.2.1. Ensayos preliminares de la actividad pectinolítica en placa: efectos de la naturaleza y concentración de la fuente de carbono	36
2.2.2. Ensayos en medio líquido	36
2.2.2.1. Diseño experimental	36
2.2.2.2. Condiciones experimentales	36
2.2.3. Co-producción de PG y etanol en cultivo discontinuo a escala piloto	38
2.2.3.1. Melazas y medios de cultivo	38
2.2.3.2. Preparación del inóculo	38
2.2.3.3. Fermentación	39
2.2.3.4. Recobrado y caracterización del crudo enzimático	39
2.2.4. Determinación de actividades enzimáticas pectinolíticas	40
2.2.4.1. Tratamiento de las muestras	40

2.2.4.2. Determinación de la actividad pectina metilesterasa	40
2.2.4.3. Determinación de la actividad pectato liasa	40
2.2.4.4. Determinación de la actividad PG	41
2.2.5. Fórmulas y procedimientos de cálculo empleados	41
2.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PG DE <i>K. marxianus</i> CCEBI 2011	43
2.3.1. Obtención y purificación del enzima	43
2.3.2. Sustratos	44
2.3.3. Influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática	44
2.3.3.1. Influencia del pH sobre la actividad y estabilidad del enzima	44
2.3.3.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad del enzima	45
2.3.4. Hidrólisis enzimática de los sustratos. Determinación de los parámetros cinéticos del enzima	45
2.3.5. Ensayos viscosimétricos	46
2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS	47
2.4.1. Electroforesis desnaturizante de proteína en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	47
2.4.2. Determinaciones analíticas	47

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	49
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LEVADURAS PECTINOLÍTICAS	53
3.1.1. Aislamiento e identificación de levaduras pectinolíticas de frutos y residuales del beneficio húmedo del café	53
3.1.1.1. Algunas consideraciones sobre las levaduras del café	60
3.1.2. Selección del microorganismo. Comprobación de la clasificación taxonómica	62
3.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PG EN <i>K. marxianus</i> CCEBI 2011	67
3.2.1. Ensayos preliminares de la actividad pectinolítica en placa: efectos de la naturaleza y concentración de la fuente de carbono	67
3.2.2. Ensayos en medio líquido	69
3.2.2.1. Influencia de la concentración de oxígeno disuelto	69
3.2.2.2. Cinética de la producción de PG. Efecto de la temperatura de fermentación y de la concentración del sustrato	72
3.2.2.3. Influencia de la naturaleza de la fuente de carbono	76
3.2.2.4. Efecto de la adición de sustancias pécticas	79

3.2.3. Co-producción de PG y etanol en cultivo discontinuo a escala piloto	81
3.2.3.1. Producción de etanol	81
3.2.3.2. Producción de PG	84
3.2.3.3. Recobrado y caracterización del crudo enzimático	87
3.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PG DE <i>K. marxianus</i> CCEBI 2011	89
3.3.1. Purificación y determinación de la masa molecular del enzima	89
3.3.2. Influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática	91
3.3.3. Hidrólisis enzimática del PGA	94
3.3.4. Influencia del DE del sustrato sobre la actividad enzimática	96
CONCLUSIONES	105
RECOMENDACIONES	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS	131

A-I. Catálogo descriptivo de las características morfológicas y fisiológicas de las levaduras pectinolíticas aisladas de residuales del beneficio húmedo del café	133
A-II. Ensayos de aplicación de la PG de <i>K. marxianus</i> CCEBI 2011 al procesamiento de vegetales y zumos de fruta	143

## INTRODUCCIÓN

Las sustancias pécticas constituyen un componente principal de las paredes celulares vegetales y desempeñan, junto a la lignina, la función de garantizar la coherencia e integridad de los tejidos, embebiendo en su estructura las microfibrillas de celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993). Están conformadas básicamente por cadenas lineales de residuos de ácido D-galacturónico, unidos por enlaces  $\alpha$ -(1,4)-glucosídicos y parcialmente esterificados con metanol (Pérez *et al.*, 2000).

La degradación natural de las sustancias pécticas tiene lugar por la acción de los enzimas pécticos o pectinasas. Estos enzimas se clasifican en esterases, que son las encargadas de desesterificar la molécula de pectina y depolimerasas, las cuales atacan la cadena principal. Estas últimas se clasifican, según su mecanismo de acción, en hidrolasas (PGs y pectina hidrolasas) y liasas (pectina y pectato liasas) (De Vries y Visser, 2001). A su vez, las depolimerasas se clasifican en *exo* o *endo* enzimas, según sea el ataque a la cadena por el extremo no reductor o al azar, respectivamente, siendo estas últimas las más importantes, ya que promueven una rápida disminución del peso molecular de la molécula de pectina con una mínima liberación de extremos reductores (Fogarty y Kelly, 1983).

Las pectinasas tienen un amplio campo de aplicaciones en la extracción y clarificación de zumos de frutas y mostos de uvas, incrementando los rendimientos, facilitando las

operaciones de prensado, filtración y concentración y contribuyendo a alargar la vida útil de los filtros. Otros usos de estas enzimas incluyen la producción de azúcares fermentables de la biomasa vegetal (Beldman *et al.*, 1984), extracción de aceites y pigmentos, tratamiento de fibras textiles (Cavaco-Paulo, 1998) y formulación de piensos (Blanco *et al.*, 1999), contribuyendo en estos últimos a una mejor asimilación de nutrientes por el animal. Su mercado actual se estima en unos 42 millones de dólares (Jonas, 2000).

La elaboración de alimentos infantiles (purés y compotas vegetales) también ha devenido un importante área de aplicación de las pectinasas. Actualmente se prefiere el macerado enzimático al mecánico, ya que permite la separación de células enteras intactas, con lo cual se preservan de la acción del oxígeno las vitaminas y los compuestos responsables del aroma y el color (Lang y Dörnenburg, 2000).

Recientemente se ha demostrado que los oligómeros de pectina con grado de polimerización entre 9 y 16 presentan actividad biológica (reguladora) en plantas y prometen ser de gran utilidad en la agricultura (Cabrera, 1999). También se les atribuye actividad benéfica sobre las bifidobacterias (valor prebiótico) y constituyen una importante fuente de fibra dietética (Lang y Dörnenburg, 2000). Otros fragmentos de la molécula de pectina han mostrado una actividad farmacológica potente (Kiyohara *et al.*, 1996). De modo que un novedoso y atractivo campo de aplicación para los enzimas pécticos estará dado por la elaboración de estos preparados bioactivos de la pectina.

Hasta el presente, el mercado de pectinasas está dominado por enzimas de origen fúngico, principalmente de *Aspergillus niger*. Estos preparados enzimáticos consisten en mezclas complejas de enzimas pécticos y no pécticos, presentando algunas actividades enzimáticas



indeseables como la pectina esterasa, que libera metanol; la arabinofuranosidasa, que provoca la formación de sedimentos y la exo-PG, que libera azúcares reductores al medio, potenciando con ello el desarrollo de reacciones de pardeado no enzimático. Por estas razones, la búsqueda de fuentes alternativas de pectinasas constituye una problemática de actualidad. Las levaduras, algunas de cuyas especies sólo producen PG, proveen una de estas alternativas (Biely y Slavikova, 1994) aunque su productividad ha sido considerada baja (Blanco *et al.*, 1999). Sin embargo, la mayor velocidad de crecimiento y estructura unicelular de las levaduras, les confieren importantes ventajas respecto a los mohos para el cultivo sumergido a gran escala.

La actividad pectinolítica es una cualidad relativamente rara en levaduras y la consideración de su baja productividad se ha sustentado en el examen de unas pocas cepas. Una alternativa propuesta para el mejoramiento de los niveles de producción es el clonaje y sobreexpresión de los genes de PG bajo diferentes fondos genéticos (Blanco *et al.*, 1999). Sin embargo, una variante no explotada ha sido la búsqueda de nuevas estirpes salvajes de levaduras a partir de determinados microambientes naturales, desconociéndose con certeza la diversidad y el potencial genético de éstas en la producción de pectinasas. En este sentido, para este grupo microbiano tampoco existe un criterio de selección establecido que posibilite el desarrollo de estrategias de aislamiento o enriquecimiento en cultivo, requiriéndose de un examen minucioso y al azar de miles de aislados (Gainvors y Belarbi, 1995). La búsqueda de nuevas y potentes estirpes de levaduras pectinolíticas salvajes y el establecimiento de un método selectivo de aislamiento, que simplifique y alivie el trabajo de búsqueda, constituyen imperativos que reclaman su investigación.

Las PGs de levaduras se secretan eficientemente y a su síntesis se le atribuye generalmente un carácter constitutivo. Algunos estudios han demostrado que la síntesis de PG está asociada a cambios morfológicos, como la diferenciación filamentosa en *Saccharomyces cerevisiae* durante la colonización de tejidos vegetales (Madhani *et al.*, 1999). De esta forma, al interés ya existente de desarrollar un sistema de expresión de proteínas heterólogas basado en las secuencias reguladoras de los genes de PG (Šiekštelė *et al.*, 1999) podría sumarse el de construir cepas recombinantes de levaduras capaces de expresar ligninasas de hongos de podredumbre blanca (Larsson *et al.*, 2001). Tales cepas podrían desempeñar la doble función de invadir los materiales lignocelulósicos, enriqueciéndolos proteicamente, al tiempo que degradan la lignina. Si se aspira a sentar las bases hacia tal propósito futuro, la estirpe pectinolítica a seleccionar debe reunir, además, la cualidad de ser resistente o estar naturalmente adaptada a compuestos polifenólicos solubles, debido a que éstos se forman como resultado de la degradación de la lignina. En este sentido los frutos y residuales del beneficio del café, ricos en compuestos fenólicos y pectina, parecen ser los materiales de partida más indicados para la búsqueda de tales cepas de levadura.

Por otro lado, con respecto a la producción de enzimas pécticos en levaduras existen resultados muy diversos, incluso contradictorios, en cuanto a la influencia de factores tales como la oxigenación del cultivo, la concentración y naturaleza de la fuente de carbono y la presencia o no de sustancias pécticas en el medio (Blanco *et al.*, 1999). Por estas razones, el estudio de estos factores para una nueva cepa constituye una necesidad con vistas a establecer las mejores condiciones de producción, al tiempo que se contribuya al esclarecimiento de las regularidades que rigen la síntesis de PG en levaduras. La caracterización bioquímica del preparado enzimático es también un paso previo necesario

para la definición de su potencial de aplicaciones, el cual a su vez, debe ser evaluado sobre situaciones reales de la práctica productiva.

La existencia en el país de una sólida infraestructura y amplia experiencia en la producción de alcohol y levadura forrajera brinda la posibilidad de combinar la producción de PG con alguno de estos procesos, lo que conduciría a su diversificación y valorización. Es por ello que, según las condiciones que resulten más favorables para la síntesis del enzima, se impone también el estudio de la coproducción de PG-etanol o PG-biomasa con el fin de conocer los parámetros cinéticos y de rendimiento del proceso que permitan definir su viabilidad técnica.

Teniendo en cuenta las promisorias aplicaciones de las PGs y las ventajas que traería consigo la producción de estos enzimas en levaduras, así como las condiciones favorables existentes en el país para su producción, dadas por el auge cobrado por la industria fermentativa y biotecnológica, nos planteamos la siguiente **hipótesis**:

Es posible desarrollar un proceso eficiente de producción de PG a partir de una cepa de levadura pectinolítica silvestre, mediante un adecuado manejo del proceso de aislamiento y selección de la cepa y de las variables de cultivo.

Para el desarrollo de esta hipótesis nos trazamos los siguientes **objetivos** de trabajo:

1. Aislar e identificar levaduras pectinolíticas presentes en frutos y residuales del beneficio húmedo del café y seleccionar una cepa que sirva de punto de partida para el desarrollo de un proceso de producción de PG.

2. Estudiar la influencia de las variables de cultivo sobre la producción del enzima y determinar el potencial productivo de la cepa a escala piloto.
3. Purificar y caracterizar bioquímicamente el enzima.

I.  
REVISIÓN  
BIBLIOGRÁFICA

# I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

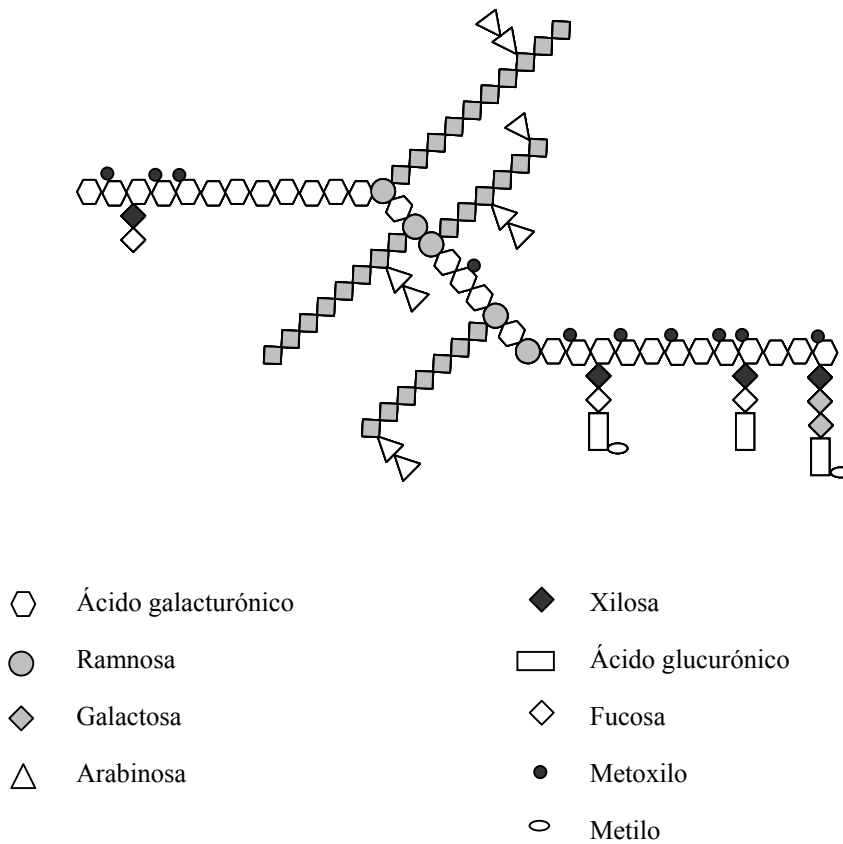
## 1.1. SUSTANCIAS PÉCTICAS. NATURALEZA QUÍMICA, DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA Y FUNCIÓN BIOLÓGICA

Las sustancias pécticas son heteropolisacáridos complejos, de naturaleza ácida, universalmente distribuidos en el reino vegetal. Ocupan la llamada lámina media de los tejidos vegetales, embebiendo en su estructura las microfibrillas de celulosa y son las encargadas de garantizar la integridad y coherencia de tales tejidos (Carpita y Gibeaut, 1993). Son el componente principal (25-30 %) de la pared celular primaria de las dicotiledóneas, gimnospermas y monocotiledóneas no gramíneas, apareciendo en menor proporción (aproximadamente un 10 %) en las gramíneas (Ramírez y Reinaldo, 2002).

Químicamente, las sustancias pécticas están conformadas por dos regiones diferentes bien definidas (Pérez *et al.*, 2000). Las llamadas regiones “lisas” u homogalacturonano, constituidas por una cadena lineal de residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -(1,4)-glucosídicos. Las moléculas de ácido galacturónico pueden estar parcialmente esterificadas con metanol y ocasionalmente acetiladas por las posiciones C-2 ó C-3. Las regiones “lisas” son interrumpidas a intervalos por las llamadas regiones “peludas”, donde se distinguen dos estructuras distintas. El xilogalacturonano, constituido por un esqueleto de galacturonano sustituido por D-xilosa y el ramnogalacturonano I. En el

ramnogalacturonano I alternan residuos de ácido D-galacturónico con residuos de L-ramnosa, unidos por enlaces  $\alpha$ -(1,2)-glucosídicos. A su vez, las moléculas de L-ramnosa pueden estar sustituidas en la posición C-5 por cadenas laterales, altamente ramificadas, ricas en L-arabinosa (poliarabinano) o cadenas lineales ricas en D-galactosa (poligalactano) (Rombouts y Pilnik, 1989). Las cadenas de arabinano están conformadas por una cadena principal de residuos de L-arabinosa unidos por enlaces  $\alpha$ -(1,5)-glucosídicos, los que pueden estar sustituidos en C-3 por cadenas de L-arabinosa. A su vez, estas últimas pueden portar moléculas de ácido ferúlico. Las cadenas de poligalactano son esencialmente lineales y están constituidas por residuos de D-galactosa  $\beta$ -(1,4)-enlazados y sustituidos en C-6 por residuos de feruloilo (Colquhoun *et al.*, 1994). Las regiones lisas constituyen la fracción principal de la molécula de pectina. Una representación esquemática simplificada de la misma se presenta en la Figura 1.

Las sustancias pécticas han sido clasificadas por la American Chemical Society (USA) en protopectinas, ácidos pectínicos (pectinas) y ácidos pécticos (pectatos). Las primeras son insolubles en agua y probablemente se trate de moléculas de pectina altamente entrecruzadas con la matriz de celulosa y hemicelulosa mediante enlaces covalentes, mientras que las dos últimas son completa o parcialmente solubles en agua. El ácido péctico o pectato se refiere a la molécula no esterificada o con un grado de esterificación (DE) inferior al 10 %. Durante la maduración y ablandamiento de los frutos tiene lugar la formación de pectinas solubles a partir de la protopectina. Atendiendo al grado de esterificación las pectinas se clasifican como de bajo metoxilo (LM), si DE es inferior o igual al 50 % y de alto metoxilo (HM) si DE es superior al 50 % (Serra *et al.*, 1992).



Adaptado de la original de Adlercreutz *et al.*, 1994

**Figura 1** Representación esquemática de la estructura primaria de la molécula de pectina.

Las sustancias pécticas varían considerablemente en cuanto a su masa molecular, DE y contenido de azúcares neutros dependiendo de la fuente de origen y del estado de maduración del fruto. Sus pesos moleculares se encuentran entre los 25 y 360 kDa, en tanto el DE puede variar entre el 30 y 95 % (Serra *et al.*, 1992).



## 1.2 ENZIMAS PÉCTICOS

### 1.2.1 Clasificación

Los enzimas que participan en la degradación natural de la pectina se agrupan bajo el nombre genérico de enzimas pécticos o pectinasas. Los más conocidos y estudiados de estos enzimas son aquellos que actúan sobre las regiones lisas, los cuales han sido clasificados por la *Enzyme Commission* de la IUPAC-IUB según se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1** Clasificación de los enzimas pécticos.

Nombre recomendado por la EC	Nombre habitual	No. EC	Sustrato	Enlace afectado
<i>Enzimas desesterificantes: hidrolizan el éster metílico liberando metanol</i>				
Polimetilgalacturonato esterasa	Pectina esterasa	3.1.1.11	Pectina	al azar
<i>Enzimas depolimerizantes: promueven la ruptura de la cadena principal</i>				
Hidrolasas: hidrolizan los enlaces $\alpha$ -(1,4)-glucosídicos de la cadena principal				
Endopoligalacturonasa	Poligalacturonasa	3.2.1.15	Pectato	al azar
Exopoligalacturonasa 1	Poligalacturonasa	3.2.1.67	Pectato	último de la cadena
Exopoligalacturonasa 2	Poligalacturonasa	3.2.1.82	Pectato	penúltimo de la cadena
Endopolimetilgalacturonasa	Pectina hidrolasa		Pectina	al azar
Exopolimetilgalacturonasa	Pectina hidrolasa		Pectina	último de la cadena
Liasas: catalizan la formación de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 de los residuos de ácido galacturónico mediante un mecanismo de $\beta$ -eliminación				
Endopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.2	Pectato	al azar
Exopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.9	Pectato	penúltimo de la cadena
Endopolimetilgalacturonato liasa	Pectina liasa	4.2.2.10	Pectina	al azar
Exopolimetilgalacturonato liasa	Pectina liasa		Pectina	último de la cadena

EC, *Enzyme Comisión* (IUPAC-IUB)

Fuente: Serra *et al.*, 1992

Recientemente se han caracterizado nuevos enzimas pertenecientes a la familia de las pectinasas, los cuales promueven la degradación de las regiones “peludas” de las sustancias

pécticas. Entre ellos se encuentran la ramnopoligalacturonasa (de *Aspergillus aculeatus*), la cual actúa específicamente sobre las cadenas laterales de la ramnosa (Suykerbuyk *et al.*, 1995) y la endoxilagalacturonano hidrolasa (de *Aspergillus tubingensis*), que ejerce su acción sobre los segmentos de la cadena de xilagalacturonano (Van der Vlugt Bergmans *et al.*, 2000).

### **1.2.2 PGs: distribución y función biológica**

Las PGs son la clase más abundante y estudiada de enzimas pécticos, encontrándose ampliamente distribuidos en plantas y microorganismos. A estos enzimas se les atribuye numerosas funciones en plantas. Se considera que están asociados a los procesos de abscisión de órganos (Bonghi *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1993), apertura de vainas y anteras (Meakin y Roberts, 1991), maduración de los granos de polen y crecimiento del tubo polínico (Pressey, 1991) y a la maduración y deterioro de frutos (Rose *et al.*, 1998). Al parecer, las PGs también están involucradas en los procesos de crecimiento (Sitrit *et al.*, 1996) y en los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos (Bergey *et al.*, 1999). Otra función recientemente atribuida es su participación en los procesos de simbiosis planta-microorganismo, como se ha reportado para el par *Rhizobium*-legumbre (Muñoz *et al.*, 1998). Los genes que codifican PG en plantas han sido muy estudiados, así como las secuencias aminoacídicas de los enzimas, clasificándose sobre esta base en tres grandes familias, asociadas cada una a determinadas funciones en la planta (Hadfield *et al.*, 1998).

Por otro lado, las PGs también se relacionan con la patogénesis de hongos en plantas. Hasta la fecha se han descrito genes de PG para un gran número de hongos fitopatógenos,

observándose la existencia de verdaderas familias de genes asociadas a los procesos de patogénesis (Wubben *et al.*, 1999). Los estudios realizados demuestran el papel de la PG en la penetración del huésped por el microorganismo (Reymond-Cotton *et al.*, 1996; Patino *et al.*, 1997). En el caso de bacterias fitopatógenas, como *Erwinia carotovora*, también se ha estudiado intensamente el papel de los genes de PG en la patogénesis (Chatterjee *et al.*, 1995; Shevchik *et al.*, 1996).

**Tabla 2** PGs en hongos saprofitos.

Organismo	PG	Características
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Endo	PG I (61 kDa), PG II (42 kDa), PG III (47 kDa)
<i>Aspergillus niger</i>	Exo/ Endo	pgaI (35 kDa), pga II (38 kDa), pgaA (370 aa), pgaB (362 aa), pgaC (383 aa), pgaD (495 aa), pgaE (378 aa)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Endo	PG (37,5 kDa)
<i>Aspergillus tubigenis</i>	Exo/ Endo	PgaX (78 kDa), pga II (362 aa)
<i>Aspergillus ustus</i>	Endo	36 kDa
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Endo	EPG1 (34 kDa)
<i>Neurospora crassa</i>	Endo	37 kDa
<i>Penicillium frequentans</i>	Exo (I, II, III)/ Endo (I, II, III)	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo	PGL1 (361 aa, 37 kDa)

aa, aminoácidos; –, dato no asequible

Fuente: Lang y Dörnenburg, 2000

Las PGs son también abundantes entre microorganismos saprofitos, fundamentalmente hongos (Tabla 2). Generalmente se encuentran presentes en consorcio con otras pectinasas y proveen la maquinaria enzimática necesaria para degradar la compleja estructura de la pectina a carbohidratos fácilmente asimilables. Los tejidos de plantas muertas son el sustrato de un gran número de microorganismos pectinolíticos a los cuales no se atribuye fitopatogenicidad (Lang y Dörnenburg, 2000). La mayoría de los microorganismos porta más de un gen de PG. *A. niger*, uno de los más estudiados con respecto a la síntesis de PG, posee una familia completa de genes que codifican endo-PG y producen múltiples

isoenzimas, los cuales muestran considerables diferencias en cuanto a especificidad de sustrato, constante catalítica y pH óptimo para su actividad (Bussink *et al.*, 1991; Parenicova *et al.*, 1998). Aún no ha sido elucidado completamente el rol biológico de estas familias de genes de PG y sus enzimas.

### 1.3 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PÉCTICOS EN LEVADURA

#### 1.3.1 Rol biológico

A diferencia de lo observado en plantas, mohos y bacterias, la actividad pectinolítica se considera una cualidad relativamente rara entre levaduras y está restringida a unas pocas especies de los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporum* y *Zygopichia* (Luh y Phaff, 1951; Bell y Etchells, 1956; Sánchez *et al.*, 1984; Ravelomanana *et al.*, 1986; Strauss *et al.*, 2001). La mayoría de estas levaduras se han aislado de las fermentaciones del cacao y del café, de uvas, higos y asociadas al deterioro de algunos alimentos y frutas en conserva (Blanco *et al.*, 1999). También se han aislado de alimentos fermentados tradicionales como el ‘fufu’ africano de la yuca (Oyewole, 2001).

Por otro lado, el rol biológico de los enzimas pécticos en levadura, en lo fundamental, se desconoce. En principio, las levaduras pectinolíticas pueden dividirse en dos grupos diferentes. Un grupo incluye aquellas que son incapaces de utilizar pectina, pectato o sus productos de hidrólisis (ácido galacturónico) para propósitos de crecimiento. Estas levaduras producen esencialmente endo-PG y lo hacen mayoritariamente de forma

constitutiva (Blanco *et al.*, 1999). La mayoría de los autores coincide en atribuir un papel ecológico más que trófico a las PGs sintetizadas por este grupo de levaduras. Estas enzimas podrían estar implicados en la colonización del sustrato en la naturaleza (frutos), al causar la ruptura de la capa de pectina que conforma la lámina media de los tejidos vegetales y facilitar el acceso a azúcares simples. En este sentido, estudios recientes han mostrado que el gen *PGUI* de *Saccharomyces cerevisiae* está implicado en la invasión de tejidos de plantas y en la diferenciación filamentosa de la forma haploide de este microorganismo (Madhani *et al.*, 1999; Gognies *et al.*, 2001).

El otro grupo comprende aquellas levaduras que, como los hongos filamentosos, tienen la capacidad de utilizar sustancias pécticas o sus productos de hidrólisis como fuente de carbono y energía, sugiriendo la existencia de un sistema enzimático más complejo. Dentro de este grupo se han reportado cepas de *Cryptococcus albidus* (Federici, 1985), *Pichia pinus* (Moharib *et al.*, 2000) y la levadura metilotrófica *Candida boidini* (Nakagawa *et al.*, 2000).

De estas apreciaciones sobre la producción de enzimas pécticos en levadura, podría suponerse la existencia de un origen diferente para los enzimas pécticos presentes en ambos grupos. Sin embargo, el análisis de las secuencias reportadas para genes de PGs de hongos filamentosos y de levaduras pertenecientes al grupo de las incapaces de utilizar sustancias pécticas, ha mostrado la existencia de una alta homología, independientemente del grupo microbiano a que pertenezcan (Gognies *et al.*, 1999).

### 1.3.2 Factores que afectan la producción de PG en levaduras

La producción de PG se considera una capacidad mayormente ‘constitutiva’ en levaduras ya que éstas no requieren de la presencia de sustancias pécticas o ácido galacturónico para su síntesis (Gainvors y Belarbi, 1996; DeRisi *et al.*, 1997; Schwan *et al.*, 1997). Sin embargo, para algunas levaduras, como *C. albidus* (Federici, 1985), *G. lactis* (Pardo *et al.*, 1991), *K. fragilis* (García-Garibay, 1987) y *S. cerevisiae* (Gognies *et al.*, 2001; Takayanagi *et al.*, 2001) ha sido reportada la síntesis inducible de PG. Con relación a *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces spp.* también se ha sustentado por otros autores que la producción de PG no se afecta por la presencia de pectina en el medio (Blanco *et al.*, 1994; Schwan y Rose, 1994; Blanco *et al.*, 1997a). Por otro lado, el ácido galacturónico, que no es el producto final de la reacción enzimática de la PG, ha sido descrito como un inductor de la actividad pectinolítica en varias cepas de levadura (Federici, 1985; Blanco *et al.*, 1994) y también como represor (Gognies *et al.*, 2001)

La represión por glucosa de la síntesis de PG ha sido otro fenómeno comúnmente encontrado en levaduras, aunque la respuesta tiene lugar para un rango de concentraciones de glucosa bastante amplio (Blanco *et al.*, 1997a; Schwan y Rose, 1994). En cuanto a la influencia de la naturaleza de la fuente de carbono los resultados son variados (Blanco *et al.*, 1999).

Otro elemento que parece resultar crucial en la producción de PG por levaduras es la oxigenación del cultivo. Cepas de *K. marxianus* (Barnby *et al.*, 1990), *K. fragilis* (García-Garibay *et al.*, 1987) y *K. lactis* (Pardo *et al.*, 1991), secretan PG preferentemente en condiciones de anaerobiosis, no mostrando actividad cuando el grado de aireación es alto.

En *S. cerevisiae* los resultados son algo divergentes, dependiendo de la cepa, aunque la tendencia más acusada es a que la síntesis de PG se reprima a altas concentraciones de oxígeno disuelto. Sin embargo, en la cepa NCY 373 este fenómeno no tiene lugar (Mckay, 1990). Para cepas como *G. lactis* (Pardo *et al.*, 1991) y *C. albidus* (Federici, 1985) la presencia de oxígeno no parece afectar la síntesis de PG. De estos resultados queda claro que aún se requiere de investigaciones dirigidas a elucidar los mecanismos que median la regulación de estos genes en presencia o ausencia de oxígeno.

#### **1.4 APLICACIONES DE LOS ENZIMAS PÉCTICOS. PERSPECTIVAS**

Los enzimas microbianos que catalizan la degradación de las sustancias pécticas son de gran importancia para las industrias fermentativas (incluida la de fabricación de vinos) y procesadoras de zumos de frutas y vegetales, entre otras industrias. Las pectinasas son usadas para la producción de azúcares fermentables a partir de la biomasa de plantas (Beldman *et al.*, 1984), para la extracción, clarificación y depectinización de zumos de frutas (incluido el mosto de uvas), maceración de frutas y vegetales y extracción de aceites vegetales (Pilnik y Rombouts, 1979; Brown y Ough, 1981; Saulnier y Brillouet, 1988; Rankine, 1991; Alkorta *et al.*, 1998).

También son empleadas en la elaboración de fibras textiles, p.e. en el desfibrado del lino (*Linum usitassimum*), cáñamo (*Cannabis sativa*) y yute (*Carchues sp.*). De igual modo han sido utilizadas en la preservación de maderas, aumentando la permeabilidad de éstas a los preservantes tradicionales (Fogarty y Kelly, 1983; Cavaco-Paulo, 1998).

Reviste también importancia, aunque aún no se aplica a gran escala, la aplicación de los enzimas pécticos con la finalidad de mejorar la productividad y eficiencia en las fermentaciones naturales, tales como las que tienen lugar durante el beneficiado del café y el cacao. De esta manera se podría ejercer un control más riguroso del proceso mejorando la calidad del producto final (Schwan y Mororo, 1989; Boccas *et al.*, 1994).

Nuevas y prometedoras aplicaciones de los enzimas pécticos están relacionadas con la obtención de hidrolizados y fragmentos de pectina con actividad biológica. Los oligogalacturónidos con grado de polimerización entre 7-16 inducen la respuesta defensiva en plantas frente a patógenos, estimulan el crecimiento celular y la maduración de frutos, entre otras aplicaciones (Droillard *et al.*, 1997; Cabrera, 1999). También se les atribuye a los oligómeros de pectina actividad benéfica sobre las bífidobacterias (valor prebiótico) (Lang y Dörnenburg, 2000), en tanto se ha reportado potente y diversa actividad farmacológica para fragmentos de pectina (Kiyohara *et al.*, 1996). La optimización de la biodegradación de la pectina puede contribuir en gran medida a la formulación de alimentos y bebidas de alta calidad ya sea por la vía del procesamiento *in situ* o por la adición de derivados pécticos (Dinnella *et al.*, 1996).

Otras aplicaciones implican el uso de pectinasas combinadas con otras hidrolasas en el aprovechamiento de desechos agroindustriales ricos en pectina, como la pulpa de remolacha (Spagnuolo *et al.*, 1997) y en la formulación de piensos (Blanco *et al.*, 1999), contribuyendo en estos últimos a mejorar la utilización de nutrientes por el animal.



### 1.4.1 Potencialidades de los enzimas pécticos de levaduras

Hasta el momento no existen aplicaciones prácticas para los enzimas pécticos de levaduras, por una parte, debido que sus costos de producción son superiores y por otro, a la ausencia de actividad múltiple, característico de los preparados comerciales de origen fúngico. Recientemente se ha sugerido que el empleo de cepas de levaduras vinícolas pectinolíticas (*S. cerevisiae*) podría mejorar la liquefacción, clarificación y filtración del mosto de uvas, así como propiciar la liberación de mayor cantidad de compuestos aromáticos y coloreados atrapados en la piel de la uva, con lo cual se contribuiría positivamente al bouquet del vino (Pretorius y Van der Westhuizen, 1991; Vilanova *et al.*, 2000).

Por otro lado, el hecho de que algunas levaduras sean capaces de sintetizar constitutivamente enzimas pécticos, constituye una ventaja desde el punto de vista productivo, ya que puede obtenerse el enzima como un producto colateral de otra fermentación (p.e. biomasa, vino, cerveza, etc.), contribuyendo a aminorar los costes. Las levaduras, además, presentan indiscutibles ventajas en cultivo sumergido con relación a los mohos, debido a su naturaleza unicelular y a sus mayores velocidades de crecimiento.

Los preparados pectinolíticos comerciales que existen en la actualidad son de origen fúngico y están constituidos por mezclas complejas de varios enzimas pécticos y no pécticos. La presencia en ellos de actividades indeseables como la pectina esterasa (libera metanol), la arabinofuranosidasa (promueve la formación de sedimentos y opalescencia) y la exo-PG (libera azúcares reductores, conduciendo al pardeado no enzimático) se ha convertido en una limitante para muchas de sus aplicaciones. Muchas levaduras, que sólo producen PG como único enzima péctico, podrían erigirse en una interesante alternativa a

las pectinasas de mohos (Biely y Slavikova, 1994). En la elaboración de preparados bioactivos de pectina, que sólo se requieren del concurso de actividad endo-PG y donde la presencia de otras actividades repercute negativamente sobre el rendimiento y la pureza, es indiscutible la superioridad de preparados puros como los sintetizados por levaduras.

Tomando en consideración todo lo anterior puede afirmarse que a las tradicionales y recientes aplicaciones de las levaduras a escala industrial, habrá que incorporar en un futuro no lejano la producción de PG.

II.  
MATERIALES  
Y MÉTODOS

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LEVADURAS PECTINOLÍTICAS

#### 2.1.1. Aislamiento e identificación de levaduras pectinolíticas de frutos y residuales del beneficio húmedo del café

##### 2.1.1.1. Medios de cultivo

a) *Medios generales* (composición, g·L<sup>-1</sup>):

- Extracto de levadura-peptona-glucosa (YPD): extracto de levadura (Oxoid; Oxoid Ltd, Basingstoke, Inglaterra), 10; peptona (Oxoid), 20; glucosa, 20. La variante sólida del medio (YPDA) se obtiene por adición de agar bacteriológico (Difco; Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan) a 20 g·L<sup>-1</sup>.
- PCA (Silva *et al.*, 2000): triptona (Oxoid), 5; extracto de levadura, 2,5; glucosa, 1; agar, 15.

b) *Medios selectivos* (composición, g·L<sup>-1</sup>):

- Agar extracto de malta (YMA) (Oxoid) acidificado: extracto de malta, 30; peptona, 5; agar (No. 1), 15. El pH del medio se ajustó a 3,5 por adición de HCl 1 N al medio fundido, previo a la preparación de las placas.

- Extracto de levadura–pectina (YPec): extracto de levadura, 10; pectina (de manzana, DE 29 %; Ensufarma, La Habana, Cuba), 10; pH 4,5.
- Extracto de malta y pulpa de café (EMPC): 65 g de pulpa de café fresca y deshidratada al sol se añadieron a 1 L de agua hasta su completa rehidratación. Entonces, se calentó a 80 °C durante 2 horas, separándose luego el material sólido en suspensión por filtración a través de un paño de algodón de trama fina, exprimiendo bien éste para garantizar la máxima extracción de líquido. Se adicionaron 20 g de extracto de malta (Oxoid), 2 g de peptona bacteriológica y se ajustó el pH 3,5 con HCl. Se completa a 1 L con agua destilada.

c) *Medio de esporulación (agar V-8 mod.)*

Se utilizó como medio de esporulación una modificación del medio agar V-8 (Wickerham y Burton, 1946), desarrollada en este trabajo y preparada como sigue: en un frasco Erlenmeyer de 250 mL se mezclaron bien 50 mL de zumo de tomate VitaFit (Lidl & Cía., UE), 50 mL de zumo multivitaminas de 12 frutas (VitaFit) y 40 g de levadura panadera. Se calentó en baño de María durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente, centrifugándose luego a 8000 min<sup>-1</sup> durante 10 minutos para separar la biomasa de levadura. Se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore, Bedford, Mass.), se ajustó el pH a 6,8 y se completó el volumen a 100 mL. En otro recipiente se fundieron 4 g de agar en 100 mL de agua destilada, se adicionaron a este jugo y se homogenizó por agitación.

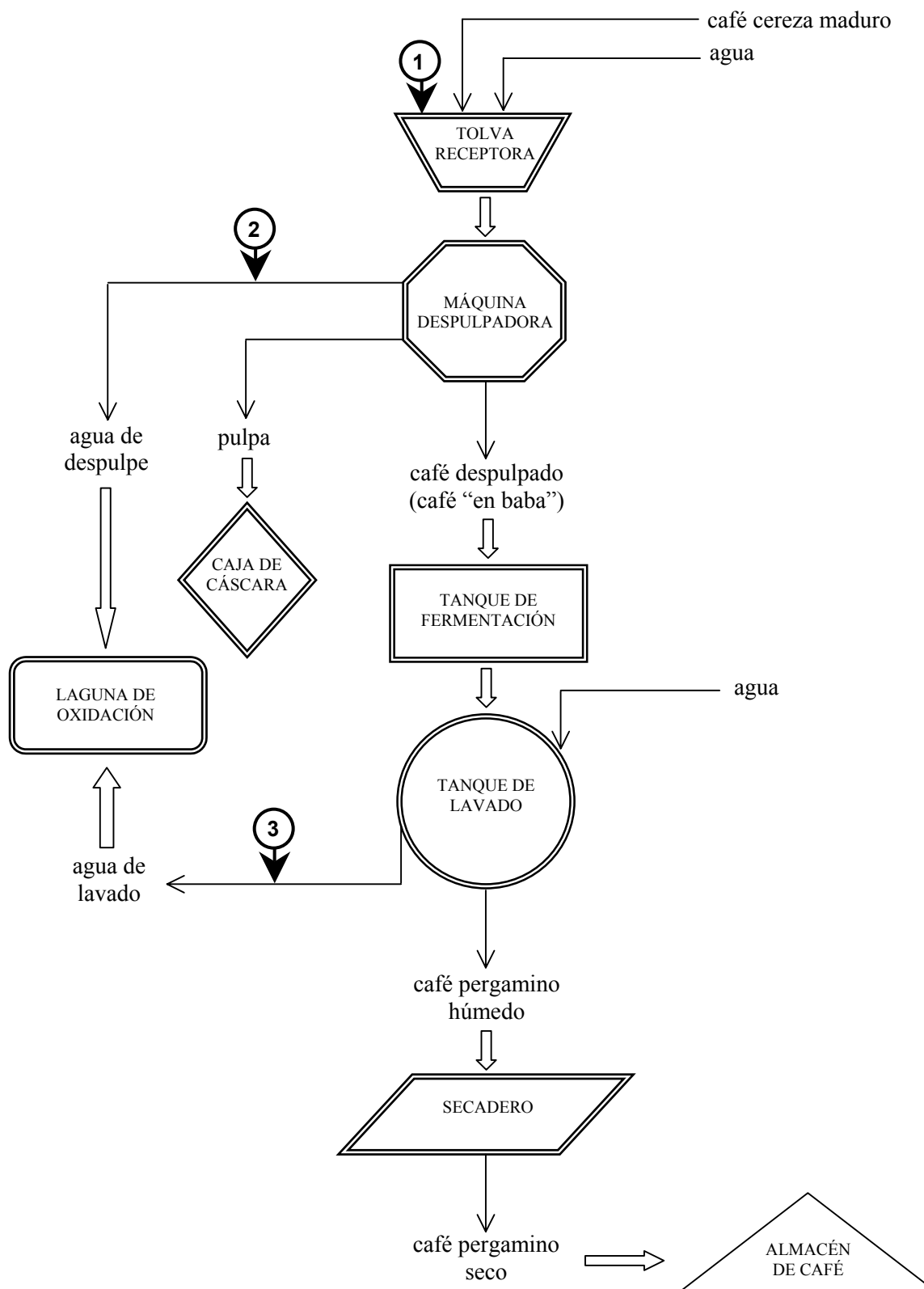
2.1.1.2. Toma de muestras

Se colectaron al azar y de diferentes puntos de la tolva de recepción (punto 1 de toma de

muestra) de la despulpadora Filé (Santiago de Cuba, Cuba), 3 kg de frutos de café (*Coffea arabica* L. var. Típica) aptos para el proceso de beneficio húmedo (denominados en el trabajo como “café cereza”). También se tomaron 3 L de los residuales líquidos procedentes de los procesos de despulpe (“agua de despulpe”) y lavado (“agua de lavado”) del café. El agua de despulpe se colectó (punto 2) después de haber transcurrido una hora de iniciado el proceso, tomándose volúmenes de aproximadamente 500 mL a intervalos de 15 – 20 minutos. La muestra de agua de lavado correspondió al primero de los lavados, y se tomó a la salida del tanque donde tiene lugar dicha operación (punto 3). En todos los casos las muestras se colectaron asépticamente en frascos estériles y se trasladaron inmediatamente al laboratorio. La colecta tuvo lugar durante la segunda quincena del mes de Septiembre, período de máxima intensidad en la producción cafetalera. Un esquema del proceso de beneficio húmedo del café y la ubicación de los puntos de toma de muestra se presenta en la Figura 2.

#### 2.1.1.3. Aislamiento de levaduras pectinolíticas

25 frutos de café cereza, seleccionados al azar del lote de 3 kg y 100 mL de las muestras líquidas, adecuadamente homogenizadas, se trasladaron asépticamente a frascos Erlenmeyer estériles de 250 mL de capacidad y se dejaron fermentar espontáneamente a 30 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, al frasco que contenía el café cereza fermentado se le adicionaron 50 mL de agua destilada estéril y se agitó en zaranda orbital a  $150 \text{ min}^{-1}$  durante 20 minutos, con el fin de obtener una suspensión homogénea de microorganismos. Entonces, cuatro estrategias de aislamiento fueron utilizadas:



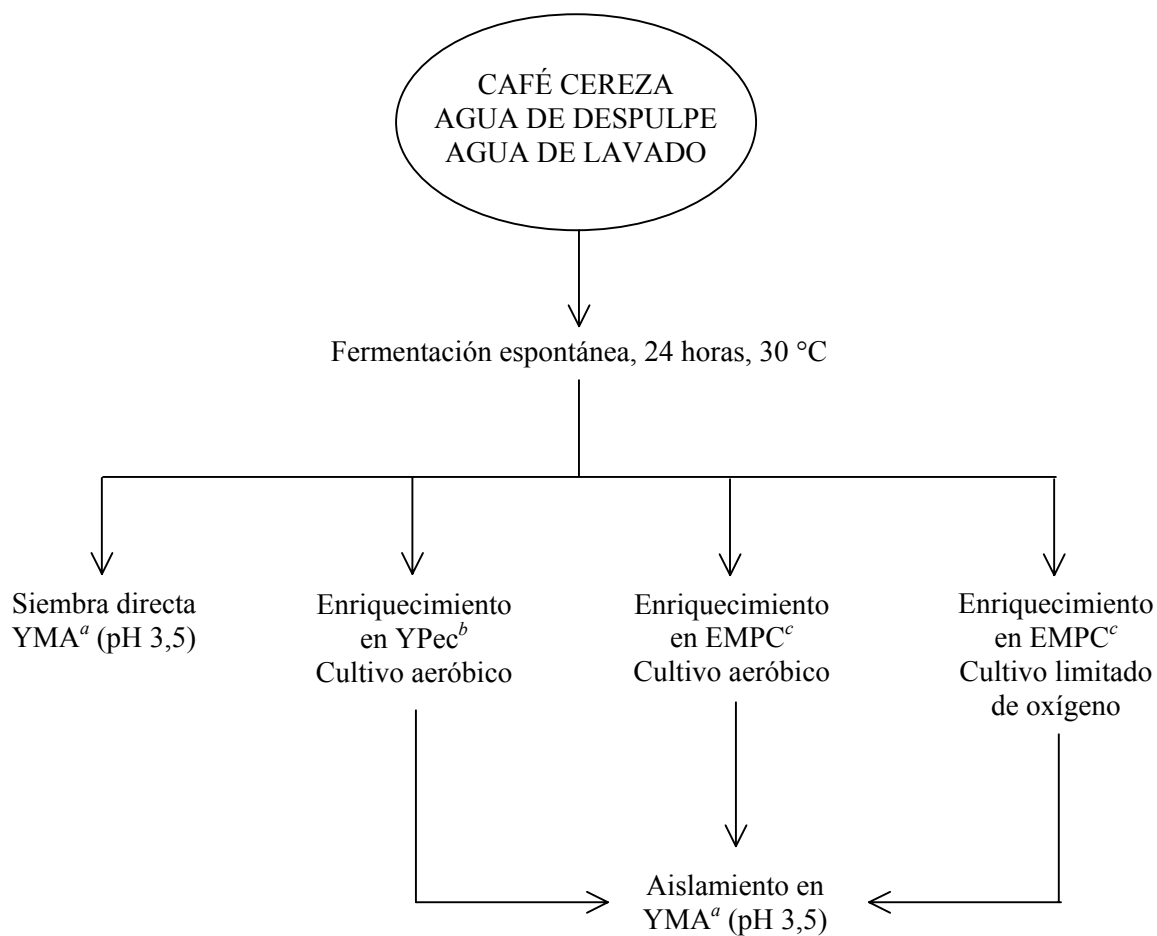
**Figura 2** Diagrama de flujo del proceso de beneficio húmedo del café en una despulpadora tradicional (despulpadora de cilindro). 1, 2 y 3, puntos de toma de muestra.

- a) Siembra directa en placas de YMA acidificado.
- b) Enriquecimiento en medio YPec, bajo condiciones de aerobiosis.
- c) Enriquecimiento en medio EMPC, bajo condiciones de aerobiosis.
- d) Enriquecimiento en EMPC bajo condiciones de limitación de oxígeno (ELO).

Para el enriquecimiento de los cultivos en aerobiosis se utilizaron frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL del medio selectivo, los cuales se inocularon (1 % [v/v]) con las muestras fermentadas de café cereza, agua de despulpe y agua de lavado y se incubaron en agitación ( $200 \text{ min}^{-1}$ ) a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Con estos cultivos se inocularon (1 % [v/v]) frascos conteniendo el mismo medio selectivo y se incubaron durante otras 48 horas bajo iguales condiciones. Los cultivos ELO se efectuaron en tubos de cultivo conteniendo 10 mL de EMPC, inoculados (1 % [v/v]) con las mismas muestras que sus contraparte en aerobiosis, los cuales se cubrieron con una fina capa de parafina líquida estéril y se incubaron en reposo durante 72 horas a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Finalmente, diluciones apropiadas de los cultivos enriquecidos se sembraron por diseminación en placas de YMA (pH 3,5), con el fin de obtener colonias aisladas. Al cabo de 48 horas de incubación a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  las colonias de mohos fueron descartadas y las restantes colonias se replicaron ordenadamente a placas de medio completo (YPDA) y se incubaron durante 48 horas a la misma temperatura. Aquellas colonias que bajo observación microscópica mostraron morfología bacteriana típica se desecharon y los restantes se ensayaron para actividad pectinolítica en placa. Un resumen de la metodología de aislamiento antes descrita puede observarse en la Figura 3.





<sup>a</sup> YMA acidificado: extracto de malta, 30 g·L<sup>-1</sup>; peptona, 5 g·L<sup>-1</sup>; agar (No. 1), 15 g·L<sup>-1</sup>; pH 3,5.

<sup>b</sup> YPec: extracto de levadura (Oxoid), 10 g·L<sup>-1</sup>; pectina (de manzana, DE 29 %; Ensufarma, La Habana, Cuba), 10 g·L<sup>-1</sup>; pH 4,5.

<sup>c</sup> EMPC: extracto de malta (Oxoid), 20 g·L<sup>-1</sup>; peptona bacteriológica (Oxoid), 2 g·L<sup>-1</sup>; extracto acuoso de pulpa de café (65 g de pulpa fresca y deshidratada al sol se extraen con 1 L de agua a 80°C durante 2 horas), c.s.p. 1 litro; pH 3,5.

**Figura 3** Esquema de la estrategia general utilizada para el aislamiento de levaduras pectinolíticas de frutos y residuales del beneficio húmedo del café.

#### 2.1.1.4. Identificación de levaduras

Un número de colonias igual a la raíz cuadrada del número de aislados levaduriformes obtenido de cada estrategia de aislamiento, se seleccionó al azar (tabla de números aleatorios) para su identificación (Holt *et al.*, 1994). Las colonias seleccionadas de este modo y todos los aislados que resultaron positivos al ensayo de actividad pectinolítica en placa, se purificaron por dilución y se conservaron en cuñas de PCA a 4 °C bajo aceite mineral hasta su identificación. Copias de estos aislados en cuñas de YPDA se conservaron también a 4 °C, resemebrándose cada 45 días. Las levaduras se identificaron sobre la base de 64 caracteres (pruebas bioquímicas y observaciones morfológicas) de acuerdo con las claves dicotómicas y procedimientos experimentales descritos por Barnett *et al.* (1983). Solamente se asignó una identificación cuando la correspondencia con las claves fue del 100 % o, en caso de una correspondencia inferior, si ésta superó en al menos un 9 % a la próxima mejor identificación (Silva *et al.*, 2000).

#### 2.1.1.5. Observaciones microscópicas y microfotografías

Las observaciones microscópicas se realizaron de preparaciones en ‘fresco’ mediante la técnica de contraste de fases, en un microscopio Nikon Optihot a un aumento de 400 ×. Las microfotografías se tomaron con una cámara fotográfica de 35 mm (Nikon) acoplada al microscopio.

Para obtener las fotografías de las colonias, las levaduras se sembraron por diseminación en placas de YPDA y se dejaron crecer a 30°C durante 48 h. Las placas se llevaron entonces al

microscopio estereoscópico (Tecnival; Carl Zeiss, Alemania) y se fotografiaron (cámara digital de 35 mm; Epson) bajo un aumento de 10 ×.

## **2.1.2. Selección del microorganismo. Comprobación de la clasificación taxonómica**

### 2.1.2.1. Medios de cultivo (composición, g·L<sup>-1</sup>)

- Medio mineral–pectina (MPec): base mineral nitrogenada para levaduras, sin aminoácidos (YNB) (*Yeast Nitrogen Base*; Difco), 6,7; pectina (de manzana, DE 28,9 %; Ensufarma), 10; pH 4,5. Se preparó también un medio control sin pectina (control negativo).
- Extracto de levadura–etanol (para la determinación de la tolerancia a etanol): extracto de levadura, 5; glucosa, 10; etanol 0-11 % (v/v). El etanol se adicionó momentos antes de la inoculación a partir de una solución stock estéril al 50 % (v/v).

### 2.1.2.2. Criterios de selección

La selección se basó en los criterios siguientes (en orden de prioridad): actividad pectinolítica en placa, velocidad de crecimiento específico en EMPC (30 °C, agitación a 200 min<sup>-1</sup>), utilización de pectina como fuente de carbono, tolerancia a etanol y termotolerancia (entendida como crecimiento en cuñas de YPDA a 42 °C en 24 h).

### 2.1.2.3. Ensayo para determinar la utilización de pectina como fuente de carbono

Se realizó siguiendo la metodología sugerida por Barnett *et al.* (1983) para la prueba de

utilización de compuestos orgánicos como fuente de carbono para el crecimiento aerobio. Como medio de cultivo se utilizó el medio MPec. El crecimiento microbiano se siguió visualmente cada 24 h durante 7 días.

#### 2.1.2.4. Ensayo de tolerancia a etanol

La experiencia se efectuó en tubos Durham inoculados (1 % [v/v]) con un cultivo del microorganismo de 12 horas en YPD. Los tubos se incubaron a 30 °C y la formación de burbujas de gas se examinó diariamente durante siete días. La tolerancia a etanol se definió como la máxima concentración de etanol a la cual es observada actividad fermentativa (producción de gas).

#### 2.1.2.5. Criterios usados para confirmar la clasificación taxonómica

Se realizó una comparación de la cepa seleccionada con la cepa *K. marxianus* CBS 712 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Holanda), cepa tipo de la especie, en lo referente a caracteres morfofisiológicos, cariotipo electroforético y comportamiento sexual.

#### 2.1.2.6. Electroforesis en campo pulsado del ADN cromosómico

El ADN cromosómico de las levaduras se preparó en geles de agarosa (agarosa de bajo punto de fusión, tipo VII, Sigma) según describe Louis (1998). Los perfiles cromosómicos (cariotipos) se determinaron mediante el sistema CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis*) de electroforesis en campo pulsado, utilizando un equipo CHEF-DRII (Bio-Rad, Hercules, Calif.). La corrida electroforética se efectuó a 14 °C y un voltaje de 100 V, con dos intervalos de pulso variable (rampa de incremento lineal): el

primero con pulsos de 120-400 s durante 48 h y el segundo con pulsos de 60-90 s durante 24 h (Belloch *et al.*, 1998), en gel de agarosa al 0,8 % (m/v) y buffer TBE pH 8,0 (Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM). La tinción del gel tuvo lugar en presencia de bromuro de etidio  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 120 min, aclarándose posteriormente el gel en agua destilada para la visualización de las bandas de ADN con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta.

#### 2.1.2.7. Determinación del comportamiento sexual del microorganismo

El microorganismo se sembró en estrías en una placa de agar V-8 mod. y se incubó a 24 °C, chequeándose al microscopio para esporulación cada 24 horas. Una vez esporulado el cultivo, una asada del microorganismo se resuspendió en 1 mL de una solución estéril de *Zymolyase* (ICN Biochemichals, Aurora, Ohio)  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) y se incubó a 37 °C durante 2 min para la debilitación de las paredes de las ascas. Entonces, una alícuota (5  $\mu\text{L}$ ) de esta suspensión se diseminó asépticamente en un sector de una placa de YPDA y se llevó al micromanipulador (Micromanipulador II, Allen Benjamín Inc., USA) para la disección de tres ascas. La placa conteniendo las ascas disecadas se incubó a 30 °C durante 48 h y las colonias obtenidas, correspondientes a cada una de las ascosporas fértiles se llevaron a placas del medio de esporulación y fueron examinadas para la formación de ascosporas nuevamente. La esporulación a partir de los cultivos monospóricos se consideró prueba inequívoca de homotalismo.

### **2.1.3. Ensayo de actividad pectinolítica en placa**

#### 2.1.3.1. Medio de cultivo

Agar-pectato: YNB, 6,7; glucosa, 5; ácido poligalacturónico (PGA) (sal sódica; Sigma, St. Louis, MO), 5; agar bacteriológico, 20; pH 5,4.

#### 2.1.3.2. Procedimiento

Las levaduras se sembraron por punción en placas de agar-pectato (unas 25-30 levaduras por placa), incubándose éstas a 30 °C durante 72 horas. Entonces, las placas se cubrieron con una fina capa de HCl 3 M visualizándose, transcurridos unos 15-20 minutos, la formación de un halo claro (translúcido) alrededor de aquellas colonias que exhiben actividad pectinolítica (modificación de método de Zink y Chatterjee [1985]).

Para propósitos comparativos (semicuantitativos), las levaduras se sembraron individualmente en el centro de las placas. Se estandarizó el inóculo a  $10^5$  células (conteo en cámara de Neubauer [Fein-Optic Jena, Alemania]) procedentes de un cultivo en fase exponencial (12 horas a 30 °C y  $200 \text{ min}^{-1}$  en YPD), las cuales fueron previamente lavadas dos veces con agua destilada y suspendidas en 1  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Se dejó secar la suspensión celular sobre la superficie de la placa en la campana de flujo laminar durante unos minutos y se continuó de igual manera que en el ensayo cualitativo. Se realizaron cinco repeticiones de la determinación.

## **2.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PG EN *K. marxianus* CCEBI 2011**

### **2.2.1. Ensayos preliminares de la actividad pectinolítica en placa: efectos de la naturaleza y concentración de la fuente de carbono**

Se realizó la determinación semicuantitativa de la actividad pectinolítica en placa según se describe en el apartado 2.1.3, usando en calidad de fuente de carbono, además de glucosa, galactosa, sacarosa y lactosa a  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cuando se evaluó el efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la expresión de PG, ésta se utilizó a una concentración de  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La medición de los halos se realizó a las 24 h.

### **2.2.2. Ensayos en medio líquido**

#### **2.2.2.1. Diseño experimental**

Se usó un diseño experimental de evaluación de una variable cada vez, según se describe en la Tabla 3.

#### **2.2.2.2. Condiciones experimentales**

En todos los experimentos se empleó el medio mínimo para levaduras, constituido por (composición, en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): YNB, 6,7; glucosa, 10; pH 5,0. Cuando fue necesario se varió la fuente carbono o su concentración, o se adicionaron sustancias pécticas. Se inoculó siempre a razón del 1 % (v/v) con un cultivo del microorganismo de 12 horas de edad en YPD, equivalente a  $5\times 10^6$  células $\cdot\text{mL}^{-1}$  en fase exponencial. A menos que se establezca otra cosa, los experimentos se efectuaron siempre en tubos de cultivo ( $100 \times 14$  mm) conteniendo 4

mL de medio líquido, a 30 °C, en condiciones estáticas. Al inicio de la fermentación y a intervalos de 2-4 h durante tres días, se extrajeron tubos (cuatro repeticiones) de cada una de las variantes para la determinación de biomasa, glucosa (o fuente de carbono) residual y actividades enzimáticas pectina metil esterasa, pectato liasa y PG. La fermentación se dio por terminada cuando la concentración de la fuente de carbono resultó inferior a 1 g·L<sup>-1</sup>.

**Tabla 3** Diseño experimental utilizado para la evaluación de la influencia de las condiciones de cultivo y la composición del medio sobre la producción de PG.

Experimento (No. de orden)	Variable (unidad de medida)	Niveles						
		200	100	50	0	0 <sup>+</sup> <sup>a</sup>		
1	Oxigenación del cultivo (como agitación, min <sup>-1</sup> )							
2	Temperatura (°C)		30				40	
3	Concentración del sustrato (g·L <sup>-1</sup> )		10				100	
4	Naturaleza de la fuente de carbono <sup>b</sup>	glu gal sac lac xil cel inu etn etn cit AGU PGA					+	
							PGA	
5	Adición de sustancias pécticas <sup>c</sup>	AGU (5)	PGA (0,1)	PGA (1)	PGA (5)	PGA (10)	RLC <sup>d</sup> (10 %)	

<sup>a</sup> Relación volumen de medio/ volumen de frasco de cultivo igual a 0,8; en las demás variantes esta relación es de 0,2

<sup>b</sup> glu, glucosa; gal, galactosa; sac, sacarosa; lac, lactosa; xil, xilosa; cel, celobiosa; inu, inulina; etn, etanol; PGA, ácido poligalacturónico; cit, citrato; AGU, ácido galacturónico

<sup>c</sup> Entre paréntesis, concentración del aditivo en g·L<sup>-1</sup>

<sup>d</sup> RLC, residual líquido de café 10 % (v/v) de la despulpadora Limoncito (Guantánamo, Cuba), la cual aplica la tecnología BECOLSUB (Colombia; Roa-Mejía *et al.*, 1997) de bajo consumo de agua

En los experimentos donde se evaluaron los efectos de la oxigenación y de la naturaleza de la fuente de carbono, para el caso de aquellas no fermentables (xilosa, celobiosa, inulina, etanol, glicerol, ácido galacturónico y PGA), los cultivos se llevaron a cabo en frascos Erlenmeyer de 100 mL de capacidad conteniendo 20 mL de medio, agitados en zaranda orbital termostataada (New Brunswick, USA) a 200 min<sup>-1</sup> o a la velocidad especificada para cada variante en el caso del experimento donde se estudió el efecto de la oxigenación. En la



variante 0+ de este último experimento el volumen de medio en el frasco de cultivo fue de 80 mL.

### **2.2.3. Co-producción de PG y etanol en cultivo discontinuo a escala piloto**

#### 2.2.3.1. Melazas y medios de cultivo

Se emplearon melazas de remolacha azucarera suministradas por Piensos Compuestos Día (León, España) las cuales presentaron un contenido de azúcares reductores totales del 49,5 % (m/m) y una densidad de 1,396 kg·L<sup>-1</sup>.

Para la preparación del inóculo y las experiencias de fermentación a escala piloto se utilizaron los siguientes medios (composición, g·L<sup>-1</sup>):

- Medio de mantenimiento de levaduras (YMM) (Gough *et al.*, 1996): extracto de levadura, 3; peptona, 5; extracto de malta, 10; glucosa, 10; pH 5,0.
- Extrato de levadura – glucosa (YD): extracto de levadura, 10; glucosa, 100; pH 5,0.
- Melazas de remolacha (SBM): melazas de remolacha para una concentración de azúcares reductores totales de 100 g·L<sup>-1</sup>, sulfato de amonio 1,3 g·L<sup>-1</sup>, pH 5,0.

#### 2.2.3.2. Preparación del inóculo

Un frasco Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, conteniendo 50 mL de YMM, se inoculó con una colonia del microorganismo crecido en YMA. El frasco se incubó en agitación a 30 °C y 200 min<sup>-1</sup> durante 12 h. Este cultivo se utilizó para inocular (2 % v/v) dos frascos Erlenmeyers de 5 L de capacidad conteniendo 1 L de YMM cada uno, los cuales se

incubaron bajo iguales condiciones. Estos cultivos se usaron finalmente para inocular el fermentador de 100 L.

#### 2.2.3.3. Fermentación

Para la co-producción a escala piloto de PG y etanol se utilizaron los medios YD y SBM. Los cultivos se efectuaron en un fermentador Biostad D (B. Braun Biotech Int., Alemania) de 100 L de capacidad efectiva, a 30 °C y pH 5,0. Antes de ajustar el pH, los medios (YD ó SBM) se esterilizaron *in situ* a 110 °C durante 20 min y se dejaron enfriar a 30 °C. El pH se controló a un valor de 5,0 mediante adición automática de hidróxido de potasio 2 N o ácido sulfúrico 10 % (m/v) y la agitación se mantuvo a 100 min<sup>-1</sup>. Durante las primeras cuatro horas de fermentación se suministró un flujo de aire de 15 L·min<sup>-1</sup> (0,15 vvm). La presión en el fermentador se ajustó manualmente a 0,5 atm. La concentración de oxígeno disuelto se controló por intermedio de un electrodo autoclavable de oxígeno (Ingold, UK), manteniéndose a niveles no detectables por este electrodo (< 0,05 % de saturación). A intervalos de 1 h se colectaron muestras del cultivo para los análisis de biomasa, azúcares reductores totales, etanol y PG.

#### 2.2.3.4. Recobrado y caracterización del crudo enzimático

La fermentación se detuvo cuando la concentración de azúcares reductores totales en el medio resultó inferior a 5 g·L<sup>-1</sup>. Entonces, el cultivo se centrifugó (centrífuga Beckman J2 – MC, USA) en operación continua (rotor JCF–Z) a 10 000 min<sup>-1</sup> y 10 °C, utilizando un flujo de alimentación de 250 mL·min<sup>-1</sup>. El enzima presente en el sobrenadante libre de células se concentró cinco veces mediante un concentrador industrial de membrana (límite de corte 30

kDA; Seta, España), se envasó en frascos plásticos y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El crudo enzimático concentrado procedente de la fermentación en medio YD se caracterizó en cuanto a su actividad enzimática volumétrica y específica, contenido de etanol, ácidos grasos volátiles y totales, tonalidad e intensidad del color y pH. También se empleó en estudios de aplicación relacionados con el procesamiento de frutas y vegetales (ver Anexos, apartado A-II).

#### **2.2.4. Determinación de actividades enzimáticas pectinolíticas**

##### 2.2.4.1. Tratamiento de las muestras

En todos los casos las muestras se centrifugaron a  $6\ 000\ \text{min}^{-1}$  durante 10 min para separar la biomasa. La proteína presente en el sobrenadante libre de células se precipitó con acetona helada (75 % [v/v]) y entonces se centrifugó a  $10\ 000\ \text{min}^{-1}$  durante 5 min. El sedimento se lavó dos veces con etanol absoluto helado y finalmente se disolvió en buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5,0).

##### 2.2.4.2. Determinación de la actividad pectina metilesterasa

Se utilizó como sustrato pectina de manzana (DE 75 %, Fluka; Fluka Chemie AG, Suiza) 0,5 % en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0. La reacción se desarrolló a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h. La actividad se cuantificó determinando el metanol liberado mediante el método colorimétrico de la acetilacetona (Wood y Saddiqui, 1971).

##### 2.2.4.3. Determinación de la actividad pectato liasa

La actividad pectato liasa se estimó del incremento en la absorbancia a 235 nm de acuerdo

con el método desarrollado por Albersheim (1968). El sustrato consistió en PGA 0,5 % en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 y la temperatura de reacción fue de 37 °C.

#### 2.2.4.4. Determinación de la actividad PG

Se empleó como sustrato PGA 0,5 % (m/v) en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0. La mezcla de reacción consistió de 400 µL de sustrato y 100 µL de una dilución adecuada del enzima en el mismo buffer del sustrato. La reacción enzimática se desarrolló a 37 °C durante 10 min. La actividad PG se estimó del incremento en el poder reductor del sustrato, determinado según el método de Somogyi (1952) modificado por Nelson (1957). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol·min<sup>-1</sup> de extremos reductores (como ácido galacturónico) bajo las condiciones de ensayo.

#### 2.2.5. Fórmulas y procedimientos de cálculo empleados

- *Rendimiento biomasa/sustrato* ( $Y_{X/S}$ ):

$$Y_{X/S} = [\text{biomasa formada (g}\cdot\text{L}^{-1})]/[\text{sustrato consumido (g}\cdot\text{L}^{-1})]$$

- *Rendimiento enzima/biomasa* ( $Y_{enz/X}$ ):

$$Y_{enz/X} (\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}) = [\text{actividad PG (U}\cdot\text{mL}^{-1})]/[\text{biomasa formada (mg}\cdot\text{mL}^{-1})]$$

- *Rendimiento enzima/sustrato* ( $Y_{enz/S}$ ):

$$Y_{enz/S} (\text{U}\cdot\text{g}^{-1}) = [\text{actividad PG (U}\cdot\text{mL}^{-1})]/[\text{concentración inicial de sustrato (g}\cdot\text{L}^{-1})]$$

- *Velocidad específica de crecimiento* ( $\mu_m$ )

$$\mu_m = d(\ln X)/dt$$

Donde **X** es la concentración de biomasa y **t** el tiempo de fermentación (h). La derivada se estimó de la pendiente de la recta de regresión del  $\ln X$  vs.  $t$ , obtenida para los puntos de la curva de crecimiento correspondientes a la fase exponencial.

- *Productividad volumétrica de PG* ( $Q_{vol}$ ):

$$Q_{vol} (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = [\text{actividad PG} (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})] / [\text{tiempo de fermentación (h)}]$$

- *Eficiencia de la fermentación alcohólica:*

Se calculó de la relación:

$$\text{Eficiencia} = [\text{etanol formado (g} \cdot \text{L}^{-1})] / [0,51 \times \text{sustrato consumido (g} \cdot \text{L}^{-1})]$$

Donde 0,51 es el rendimiento teórico máximo correspondiente a la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono.

- *Tasas específicas* ( $q_{esp}$ ) *de producción de PG y etanol:*

Se calcularon según la siguiente expresión:

$$q_{esp} (\text{producto}) = [\Delta(\text{producto})] / [X \Delta t]$$

donde  $\Delta(\text{producto})$  es la variación en la concentración del producto para un intervalo de tiempo ( $\Delta t$ ) dado;  $X$  es la concentración promedio de biomasa correspondiente a

dicho intervalo de tiempo.

### **2.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PG DE *K. marxianus* CCEBI 2011**

#### **2.3.1. Obtención y purificación del enzima**

Un frasco Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 400 mL de medio mínimo, se inoculó (1 % [v/v]) con un cultivo de 12 horas de edad en YPD de la cepa *K. marxianus* CCEBI 2011 y se incubó en reposo a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a  $10\ 000 \times g$  durante 20 minutos para separar la biomasa y 250 mL del sobrenadante se filtraron a través de un filtro bacteriológico de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). El filtrado se concentró por ultrafiltración (membranas Omega; límite de exclusión 10 kDa) hasta 25 mL. El concentrado se dializó dos veces contra 50 volúmenes de buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,5 por espacio de 12 horas y se aplicó luego a una columna cromatográfica (16  $\times$  1 cm) de intercambio catiónico (SP-Sepharose Fast Flow; Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia) previamente equilibrada con el mismo buffer. La proteína retenida en la matriz se eluyó con buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,5, empleando un gradiente lineal de fuerza iónica (NaCl 0-150 mM) y un flujo de 0,4 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. El eluato se colectó automáticamente (colector Pharmacia Biotech) en fracciones de 1 mL, las cuales se examinaron para concentración de proteínas (absorbancia a 280 nm) y actividad PG. Finalmente se agruparon las fracciones que presentaron actividad PG y se dializó durante 12 h contra 100 volúmenes de buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0. Todas las operaciones efectuaron a 4 °C. El dializado se conservó a esta misma temperatura en viales de polipropileno

(Eppendorf, Alemania). Un esquema que resume el proceso de purificación del enzima puede verse en la Figura 4 (pág. 50).

### **2.3.2. Sustratos**

Se utilizaron como sustratos PGA (sal sódica; Sigma), pectina de manzana HM (Mr 30 000 – 100 000, DE 70–75 %; Fluka), pectina cítrica (DE 60-65 %; Sigma) y pectina de manzana LM (DE 28,9 %; Ensufarma), todos al 0,5 % (m/v) en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 a menos que se indique otra cosa. Los sustratos se filtraron a través de filtros bacteriológicos (0,22  $\mu$ m) (Millipore) antes de su uso. Se conservaron a 4 °C por períodos no mayores de un mes.

### **2.3.3. Influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática**

Para el estudio de la influencia de estos factores se utilizó el enzima purificado. Todas las determinaciones se realizaron con cinco repeticiones.

#### **2.3.3.1. Influencia del pH sobre la actividad y estabilidad del enzima**

Para obtener los pH deseados en la preparación del sustrato o del enzima, según el caso, se utilizó buffer citrato de sodio 10 mM para el rango de pH de 3,0 a 6,0 y buffer fosfato de sodio 10 mM, para los pH 6,5 y 7.

La determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática se realizó midiendo la actividad del enzima sobre el sustrato (PGA 0,5 % [m/v]) preparado a diferentes pH. Para ello se efectuaron diluciones apropiadas del enzima en el mismo buffer en que se disolvió el sustrato y se determinó la actividad enzimática, manteniendo las demás condiciones

iguales que en el ensayo estándar para la determinación de actividad PG, descrito en el apartado 2.2.4.4.

Para evaluar la estabilidad del enzima a diferentes pH, se tomaron alícuotas de éste de 1 mL y se precipitaron con acetona tal como se indica en el apartado 2.2.4.1, pero resuspendiendo el sedimento proteico en 1 mL de buffer al pH objeto de estudio. Las soluciones enzimáticas a diferentes pH se incubaron durante 24 horas a 4 °C. La actividad enzimática inicial y la actividad residual, una vez transcurrido este tiempo de incubación, se determinaron según el ensayo estándar. La estabilidad se expresó como el porcentaje de la actividad inicial conservada.

#### 2.3.3.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad del enzima

La actividad enzimática se determinó según se indica en el ensayo estándar, pero utilizando diferentes temperaturas de reacción entre los 20 y 70 °C. Para determinar la estabilidad térmica del enzima, éste se incubó a las temperaturas de 40, 50, 55 y 60 °C y se tomaron muestras a diferentes instantes de tiempo para la determinación de la actividad enzimática residual de acuerdo con las condiciones estándar.

#### **2.3.4. Hidrólisis enzimática de los sustratos. Determinación de los parámetros cinéticos del enzima**

Se estudió el curso de la hidrólisis enzimática del PGA y la pectina de manzana HM. Para ello, 50 mL de cada uno de los sustratos al 2 % (m/v) en buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5,0) se situaron en frascos Erlenmeyer estériles de 250 mL y se incubaron en un baño



termostatado a 37 °C durante 20 min. El enzima purificado se añadió a razón de 0,5 U·mL<sup>-1</sup> y se continuó incubando a la misma temperatura, sin agitación. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron asépticamente alícuotas de 2 mL, las cuales se llevaron de inmediato a un baño de agua hirviendo por espacio de 10 min para inactivar el enzima. Entonces, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se guardaron en congelación (-20 °C) hasta la determinación de su poder reductor (como ácido galacturónico) y viscosidad. El porcentaje de hidrólisis se calculó según Serrat (1998).

Los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $k_{cat}$  para estos sustratos se determinaron por el método de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk a la temperatura de 37 °C y pH 5,0.

### **2.3.5. Ensayos viscosimétricos**

Las mediciones viscosimétricas se efectuaron en un viscosímetro capilar Canon – Fenske (modelo 5354/2) a 37 °C. Para la determinación de la actividad PG viscosimétrica (endo-PG) la mezcla de reacción consistió de 4,9 mL del sustrato y 0,1 mL de una dilución apropiada del enzima, ambos incubados previamente a 37 °C durante 10 min. El enzima se adicionó al sustrato y se mezcló rápidamente; entonces, el tiempo de flujo de la mezcla se midió a intervalos regulares de tiempo. El tiempo de flujo a tiempo cero se midió en una mezcla de reacción que contenía buffer acetato en lugar del enzima.

La viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ) se calculó como sigue:

$$\eta_{sp} = (\text{tiempo de flujo de la mezcla} / \text{tiempo de flujo del buffer}) - 1$$

La fluidez específica se definió como el inverso de la viscosidad específica.

La actividad endo-PG se determinó de la pendiente de la recta que se obtiene al graficar fluidez específica vs. tiempo de reacción para los instantes iniciales de la reacción. Una unidad de actividad endo-PG se definió como la cantidad de enzima que provoca un cambio en la fluidez específica de una unidad en un minuto (Pharr y Dickinson, 1973). En el cálculo de la actividad se tuvo en cuenta el factor de dilución del enzima, el cual incluye tanto la dilución que tiene lugar durante el ensayo viscosimétrico (volumen de mezcla de reacción/volumen de enzima diluido) como la dilución del enzima previa al ensayo.

## **2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **2.4.1. Electroforesis desnaturalizante de proteína en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)**

Las estimaciones de la pureza y masa molecular de la PG se realizaron por electroforesis SDS-PAGE usando concentraciones de poliacrilamida del 12 % en el gel separador y del 5 % en el gel concentrador, siguiendo las recomendaciones de Ausubel *et al.* (1992). Los geles se sometieron a tinción con azul de Coomassie G-250 (Sigma). La masa molecular se estimó de una curva patrón del logaritmo de  $M_r$  versus distancia recorrida, usando una mezcla de patrones de proteína de bajo peso molecular (Bio-Rad).

### **2.4.2. Determinaciones analíticas**

La concentración de biomasa se estimó (a) directamente (en la fermentación a escala piloto), como masa celular seca, luego de colectarse la biomasa por centrifugación ( $6\ 000\ \text{min}^{-1}$ , 5 min), lavarse tres veces con agua destilada y secarse en horno a vacío durante 24 h

a 80 °C; (b) indirectamente (en el resto de los experimentos), a través de mediciones espectrofotométricas a 620 nm usando una curva patrón donde la concentración de biomasa se ha estandarizado gravimétricamente, realizando las diluciones pertinentes cuando la lectura fue mayor que 0,6.

Para el seguimiento del consumo de la fuente de carbono y la formación de etanol (cuando fue necesario) en el curso de las fermentaciones se procedió como sigue: las concentraciones de glucosa, galactosa y ácido galacturónico se determinaron como azúcares reductores mediante el método de Somogyi – Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1957), en tanto las de sacarosa, lactosa, xilosa, celobiosa e inulina se estimaron como carbohidratos totales solubles por el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). En todos estos casos se utilizó siempre como estándar el azúcar específico a determinar. El contenido de etanol se determinó mediante el kit enzimático de Böehringer (Mannheim, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante, mientras que la concentración de citrato se cuantificó por el método del anhídrido acético-piridina (Spencer y Lemenstein, 1967). El PGA se determinó colorimétricamente por el método del carbazol (Dekker y Richards, 1972) empleando ácido galacturónico como estándar. En la fermentación a escala piloto donde se utilizó el medio SBM, se siguió el consumo de azúcares reductores totales por el método ya referido de Somogyi – Nelson, previa hidrólisis ácida según el método de Walker (Bureau of Sugar Experiment Stations, 1961), utilizando glucosa como patrón.

El contenido de proteína se estimó mediante el reactivo de Folin (Lowry *et al.*, 1951) usando albúmina de suero bovino (BDH Chemicals, Reino Unido) como estándar. En la caracterización de las sustancias pécticas utilizadas como sustrato de los ensayos

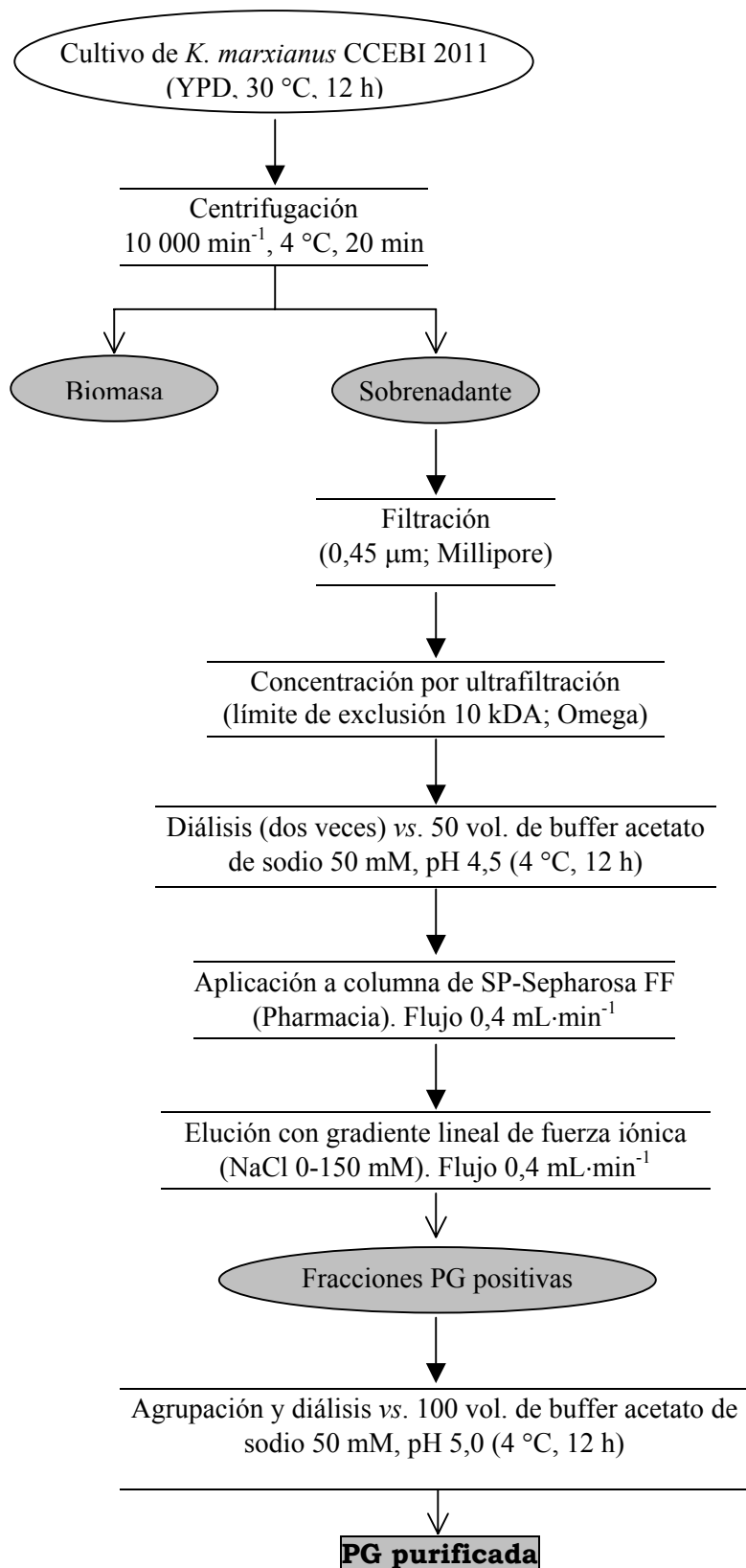
enzimáticos, el contenido de ácido galacturónico se cuantificó por el método del carbazol (Dekker y Richards, 1972), el grado de esterificación se estimó de la determinación colorimétrica del metanol según Wood y Saddiqui (1971) y la masa molecular promedio de estos polímeros se determinó por viscosimetría (Owens *et al.*, 1944).

La composición de ácidos grasos volátiles y totales, así como la tonalidad e intensidad del color (esta última expresada como porcentaje de luminancia) en el crudo enzimático concentrado se determinaron según los métodos estándar (APHA, 1998).

Las mediciones espectrofotométricas se efectuaron en un espectrofotómetro modelo U-2000 (Hitachi, Tokio, Japón)

## **2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Para la interpretación de los parámetros muestrales se utilizaron los estadígrafos media aritmética y desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de t-Student (para dos medias) y el análisis de varianza (ANOVA de clasificación simple) acoplado a la prueba de rangos múltiples de Duncan, cuando se trató de varias medias (Sigarroa, 1985). Se utilizó siempre un nivel de significación del 5 %, salvo que otra cosa sea establecida. Cuando la interpretación de datos pareados lo requirió, se obtuvieron las ecuaciones de regresión (lineal y exponencial) por el método de los mínimos cuadrados y en el caso de las rectas de regresión, se efectuaron comparaciones entre ellas cuando fue necesario. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el Statgraphics Plus 3.1 (Statistical Graphics, Rockville, Md., USA).



**Figura 4** Diagrama de flujo del proceso de purificación de la PG de *K. marxianus* CCEBI 2011.

# III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

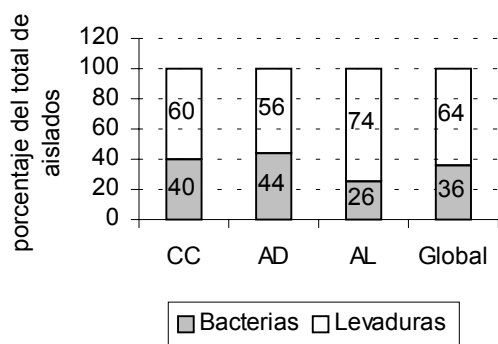
## **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LEVADURAS PECTINOLÍTICAS**

#### **3.1.1. Aislamiento e identificación de levaduras pectinolíticas de frutos y residuales del beneficio húmedo del café**

En todas las estrategias de aislamiento se tuvo en consideración el empleo de pHs bajos (3,5-4,5) con el objetivo de inhibir el crecimiento bacteriano. Aunque esta condición restringe también el crecimiento de ciertas levaduras, no es de esperar por esta causa un distanciamiento marcado entre la microbiota aislada y aquella existente en los hábitats explorados, ya que éstos se caracterizan precisamente por presentar también pHs del orden de 4,0 (Serrat, 1998), a excepción de la cereza del café (Jones y Jones, 1984). El empleo de un extracto de pulpa de café en uno de los medios selectivos (EMPC) tuvo como finalidad obtener aislados tolerantes a elevadas concentraciones de compuestos fenólicos, condición ésta imperante en los residuales del café.

En la Figura 5 se muestra cómo se comportó la distribución de levaduras y bacterias en las colonias obtenidas por siembra directa sobre YMA para las muestras objeto de estudio. Como puede observarse, la población bacteriana representó un 25-45 % del total de los



**Figura 5** Distribución de bacterias y levaduras en café cereza (CC), agua de despulpe (AD), agua de lavado (AL) y a nivel de la población global.

aislados, siendo su proporción mayor en el agua de despulpe y menor en el agua de lavado. Estos resultados se corresponden bien con lo reportado por Silva *et al.* (2000) en sus estudios sobre la composición microbiana de la cereza del café en sus diferentes estadios de maduración. Según este estudio, las bacterias representan el grupo más abundante, con

alrededor del 80 % de la población microbiana total presente en la superficie del fruto. Además, se considera que el aporte fundamental a la microflora de las aguas residuales del café procede del propio fruto del café (Agate y Bhat, 1966) y no del aire o del agua utilizada en el proceso. Por tanto, no es sorprendente que, a pesar de las condiciones restrictivas impuestas por el pH, en estos aislados la población bacteriana represente aún una fracción importante. En las colonias aisladas de cultivos enriquecidos en EMPC el predominio de las levaduras sobre los demás grupos microbianos fue prácticamente absoluto (solamente se encontró un aislado con morfología bacteriana).

En los cultivos enriquecidos en aerobiosis se utilizaron dos pases sucesivos bajo estas condiciones con el fin de limitar la aparición de colonias de mohos, los que, debido a su crecimiento más lento y morfología filamentosa, quedan rezagados numéricamente respecto a las levaduras bajo estas condiciones. Sin embargo, resalta el hecho de que en las colonias aisladas directamente del café cereza fermentado, la frecuencia de aparición de hongos filamentosos resultó sumamente baja (< 10 %), ya que ha sido reportado que la presencia



de estos microorganismos en el fruto del café supera en casi tres veces a la de levaduras (Silva *et al.*, 2000).

La estrategia de aislamiento en que se utilizó el medio YPec tuvo por objetivo favorecer el crecimiento de microorganismos que fuesen capaces de utilizar la pectina como única fuente de carbono, de modo que se obtuviese una alta frecuencia de aparición del fenotipo pectinolítico en los aislados. Sin embargo, como resultado de la aplicación de esta estrategia sólo se obtuvieron colonias de hongos filamentosos. Es un hecho ampliamente conocido que éstos son portadores por excelencia de una poderosa maquinaria enzimática extracelular (De Vries y Visser, 2001), especializada de modo particular en la degradación de carbohidratos estructurales como la celulosa, pectina, xilanos, etc., los cuales utilizan como fuente de carbono para su crecimiento. De modo que el medio YPec favoreció especialmente a este grupo microbiano, resultando inapropiado para la selección de levaduras pectinolíticas. Por otro lado, los reportes de levaduras que utilicen la pectina son muy limitados (Lee y Komagata, 1980; Gainvors y Belarbi, 1995; Nakagawa *et al.*, 2000) y generalmente están referidos a levaduras metilotróficas.

Como resultado de las diferentes estrategias de aislamiento utilizadas se obtuvieron 983 aislados levaduriformes, de los cuales sólo seis mostraron actividad pectinolítica, para un 0,6 %, lo que confirma que esta es una cualidad sumamente rara en levaduras, en concordancia con lo reportado por otros autores (Laing y Pretorius, 1993; Blanco *et al.*, 1994). Con una sola excepción, todas las estirpes pectinolíticas procedieron del agua de despulpe (Tabla 4).

**Tabla 4** Distribución del fenotipo pectinolítico en levaduras del café, según los diferentes materiales de partida y estrategias de aislamiento utilizadas<sup>a</sup>.

<b>Material de partida</b>	<b>SD<sup>b</sup></b>	<b>EA<sup>b</sup></b>	<b>ELO<sup>b</sup></b>	<b>Total</b>
Café cereza	0/137 (0)	0/ 60 (0)	0/108 (0)	0/305 (0)
Agua de despulpe	0/118 (0)	0/ 72 (0)	5/ 83 (6,0)	5/273 (1,8)
Agua de lavado	0/218 (0)	0/ 78 (0)	1/109 (0,9)	1/405 (0,2)
<b>Total</b>	<b>0/473 (0)</b>	<b>0/210 (0)</b>	<b>6/300 (2,0)</b>	<b>6/983 (0,6)</b>

<sup>a</sup> Cepas pectinolíticas/cepas examinadas; entre paréntesis, porcentaje de cepas pectinolíticas

<sup>b</sup> SD, siembra directa en YMA acidificado; EA, enriquecimiento del cultivo en aerobiosis; ELO, enriquecimiento bajo condiciones de limitación de oxígeno

La identificación taxonómica de los aislados pectinolíticos (Tabla 5) mostró la presencia de tres especies: *Hansenula jadinii* (tres aislados), *Kluyveromyces marxianus* (2) y *Debaryomyces vanriijiae* (1). *K. marxianus* ha sido descrita como la levadura pectinolítica dominante en fermentaciones de cacao (Barnby *et al.*, 1990; Schwan *et al.*, 1997) y café (Jones y Jones, 1984). Esta actividad también ha sido descrita en levaduras del género *Debaryomyces* (Laing y Pretorius, 1993). Sin embargo, este es el primer reporte, del que se tenga conocimiento, sobre levaduras pectinolíticas pertenecientes a la especie *H. jadinii*. En el apartado A-I de la sección de Anexos, puede encontrarse una descripción de las características morfológicas y fisiológicas de cada uno de los aislados pectinolíticos.

**Tabla 5** Identificación de los aislados con actividad pectinolítica.

<b>Denominación</b>	<b>Identificación<sup>a</sup></b>
ADA39	<i>Hansenula jadinii</i> Lodder
ADA40b	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> Lodder and Kreger-van Rij
ADA44	<i>Hansenula jadinii</i> Lodder
ADA49b	<i>Hansenula jadinii</i> Lodder
ADA15F	<i>Kluyveromyces marxianus</i> van der Walt emend. van der Walt
CBA90	<i>Kluyveromyces marxianus</i> van der Walt emend. van der Walt

<sup>a</sup> Según Barnett *et al.*, 1983

**Tabla 6** Géneros de levadura encontrados en frutos y residuales del beneficio húmedo del café y en los cultivos enriquecidos bajo limitación de oxígeno<sup>a</sup>.

Género	Café cereza	Agua de despulpe		Agua de lavado		Total
		SD <sup>b</sup>	ELO <sup>c</sup>	SD <sup>b</sup>	ELO <sup>c</sup>	
<i>Candida</i>	8	5	-	4	2	19
<i>Hansenula</i>	2	1	2	3	1	9
<i>Pichia</i>	-	2	2	1	3	8
<i>Dekkera</i>	-	1	1	3	3	8
<i>Debaryomyces</i>	-	1	1	1	-	3
<i>Kluyveromyces</i>	-	1	2	-	-	3
<i>Saccharomyces</i>	-	-	-	2	1	3
<i>Hanseniaspora</i>	2	-	-	-	-	2
<i>Brettanomyces</i>	-	-	1	-	-	1
<i>Debaryozyma</i>	-	-	-	-	1	1
<i>Saccharomycodes</i>	-	-	1	-	-	1
<i>Williopsis</i>	-	-	-	1	-	1
Total	12	11	10	15	11	59

<sup>a</sup> Los valores corresponden al número de aislados identificados

<sup>b</sup> SD, aislamiento por siembra directa en YMA acidificado

<sup>c</sup> ELO, aislamiento de cultivos enriquecidos bajo condiciones de limitación de oxígeno

Un análisis de la composición genérica (Tabla 6) y específica (Tabla 7) de las poblaciones de levadura objeto de estudio puede ayudar a comprender la causa del incremento en la frecuencia de aparición del fenotipo pectinolítico en el agua de despulpe y, en particular, en el agua de despulpe sometida a ELO. Al seguir la secuencia café cereza (inóculo primario) – agua de despulpe – agua de despulpe ELO, se puede apreciar que tiene lugar un marcado incremento en la aparición de levaduras de los géneros *Hansenula*, *Kluyveromyces* y *Pichia*, al tiempo que disminuye considerablemente la presencia de levaduras del género *Candida*, mayoritarias en café cereza. Similar comportamiento tiene lugar en el agua de lavado, aunque en este caso la presencia principal corresponde a *Pichia* y *Dekkera* y la disminución de *Candida* no es tan acentuada. De la clasificación taxonómica de los aislados pectinolíticos, puede comprobarse que su frecuencia de aparición está asociada con un

incremento en el número de colonias pertenecientes a sus correspondientes clasificaciones. Obsérvese en la Tabla 7 que todos los aislados identificados en los géneros que dominan en agua de despulpe, *Kluyveromyces* y *Hansenula*, pertenecen a las especies *K. marxianus* y *H. jadinii*, respectivamente.

Estos cambios en las poblaciones dominantes de levadura son un reflejo de las transformaciones que tienen lugar en las condiciones ambientales, las cuales transitan de un ambiente dominado por la aerobiosis y la baja actividad de agua en la cereza del café, a cultivos sumergidos bajo condiciones crecientes de limitación de oxígeno en los residuales líquidos y los cultivos de ELO. Por tanto, es de esperar que se produzca un enriquecimiento en aquellas estirpes de levadura mejor adaptadas para crecer con mayor rapidez en condiciones de anaerobiosis o limitación de oxígeno.

**Tabla 7** Principales especies de levadura identificadas en frutos y residuales del beneficio húmedo del café y en los cultivos enriquecidos bajo limitación de oxígeno<sup>a</sup>.

Especie	Café cereza	Agua de despulpe		Agua de lavado		Total
		SD <sup>b</sup>	ELO <sup>c</sup>	SD <sup>b</sup>	ELO <sup>c</sup>	
<i>Hansenula jadinii</i>	-	2	2	1	3	8
<i>Dekkera intermedia</i>	-	1	1	2	2	6
<i>Candida valdiviana</i>	3	2	-	-	-	5
<i>Candida versatilis</i>	1	-	-	1	1	3
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	1	2	-	-	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	1	1	2
<i>Hanseniaspora vineae</i>	2	-	-	-	-	2

<sup>a</sup> Los valores corresponden al número de aislados identificados

<sup>b</sup> SD, aislamiento por siembra directa en YMA acidificado

<sup>c</sup> ELO, aislamiento de cultivos enriquecidos bajo condiciones de limitación de oxígeno

Como puede observarse todos los aislados con fenotipo pectinolítico proceden de los cultivos de ELO, lo que sugiere que ésta es una cualidad inherente o asociada a levaduras

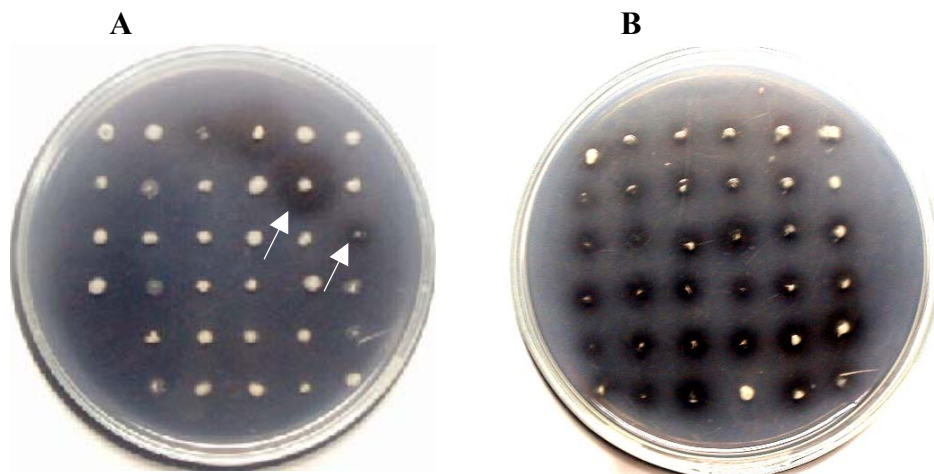
con elevada capacidad fermentativa o mejor adaptadas a la vida en anaerobiosis o limitación de oxígeno. Para comprobar dicha suposición se realizó una experiencia en la cual se llevaron a cabo tres pases sucesivos de ELO, evaluando para cada uno de ellos la frecuencia de aparición del carácter pectinolítico en los aislados. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y pueden visualizarse en la Figura 6. Al realizar pases sucesivos de enriquecimiento bajo estas condiciones, se alcanza un incremento considerable (unas 15 veces) en la aparición del fenotipo pectinolítico que, en el caso del agua de despulpe, va de un 6 % a un 93 % y en el agua de lavado, de un 0,9 % a un 15,8 % (Tabla 8). Lo anterior confirma la hipótesis de la existencia de un vínculo entre el carácter pectinolítico en levaduras y su capacidad de crecer en condiciones de limitación de oxígeno.

**Tabla 8** Distribución del fenotipo pectinolítico durante el enriquecimiento sucesivo en cultivos limitados de oxígeno<sup>a</sup>.

Material de partida	Etapas de enriquecimiento		
	I	II	III
Café cereza	0/108 (0)	0/72 (0)	0/108 (0)
Agua de despulpe	5/83 (6,0)	52/72 (72,2)	67/72 (93,1)
Agua de lavado	1/109 (0,9)	3/74 (4,1)	9/57 (15,8)

<sup>a</sup> Cepas pectinolíticas/cepas examinadas; entre paréntesis, porcentaje de cepas pectinolíticas

Este hallazgo resulta interesante y novedoso pues, hasta el presente, la búsqueda de levaduras pectinolíticas se ha realizado a ciegas, no existiendo un criterio definido sobre la estrategia a seguir, ya que, como se refirió anteriormente, las levaduras son, como regla, incapaces de utilizar pectina o sus productos de hidrólisis como fuente de carbono y energía. Gainvors y Belarbi (1995), a partir de sus observaciones con *Saccharomyces cerevisiae* SCPP demostraron que, en presencia de glicerol o etanol, las cepas pectinolíticas de esta especie eran capaces de utilizar pectina, por lo que dicha cualidad podía ser



**Figura 6** Visualización del incremento en la frecuencia de aparición del fenotipo pectinolítico con el número de etapas de enriquecimiento bajo condiciones de limitación de oxígeno, en levaduras procedentes de agua de despulpe. (A) Una etapa de enriquecimiento; (B) Tres etapas de enriquecimiento. Colonias positivas (señalizadas con flechas en A) muestran halos de hidrólisis a su alrededor.

utilizada para la búsqueda de estirpes pectinolíticas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, esta observación no ha podido ser generalizada a otras levaduras, lo que realza el significado y utilidad práctica del resultado aquí presentado.

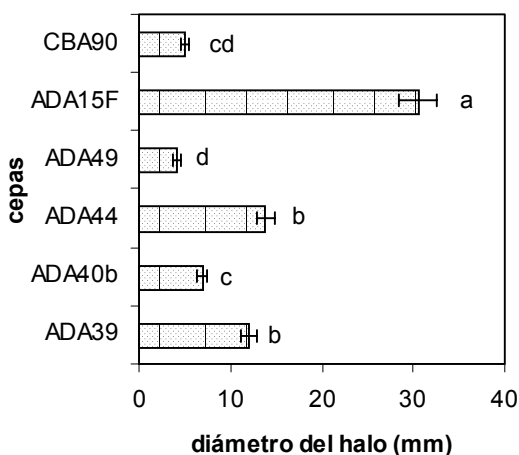
#### 3.1.1.1. Algunas consideraciones sobre las levaduras del café

La presencia mayoritaria de los géneros *Dekkera* y *Hansenula*, representados por las especies *D. intermedia* y *H. jadinii*, respectivamente, constituye un aspecto novedoso en lo referente a la caracterización de las poblaciones de levaduras que habitan frutos y residuales del beneficio húmedo del café. No ocurre así con la presencia de *Candida* y *Pichia*, que sí han sido reportadas como levaduras asociadas a frutos de café (Silva *et al.*, 2000) y a la fermentación que tiene lugar durante el desmucilaginado (Agate y Bhat, 1966).

Otro hecho significativo es que, contrario a lo esperado, la mayoría de los aislados pectinolíticos proceden del agua de despulpe y no del agua de lavado. El agua de lavado (ver Figura 2) arrastra aquellos microorganismos que participan en la fermentación natural que conduce al desmucilaginado del café. Este mucílago está constituido, esencialmente, de un hidrogel de pectina sin estructura celular (Carbonell y Vilanova, 1952) que, por hidrólisis enzimática, se solubiliza parcialmente liberándose de la semilla a la cual se encuentra adherido (Adams y Dougan, 1987). Por tal motivo, debía esperarse que las mayores posibilidades de encontrar levaduras pectinolíticas fuese en el agua de lavado.

Al parecer, la de hidrólisis del mucílago es conducida básicamente por otros grupos microbianos, probablemente bacterias, lo que estaría en correspondencia con lo observado por otros autores (Frank *et al.*, 1965; Roussos *et al.*, 1995). Por otro lado, el contenido de pectina en la pulpa de café es casi dos veces mayor que en el mucílago (García *et al.*, 1991) y, debido a su solubilidad en agua, es también un componente principal del agua de despulpe, contribuyendo en buena medida a su acidez característica. De modo que, la pectinólisis puede erigirse en una ventaja ecológica para aquellos microorganismos que habitan en este residual, al posibilitarles cambiar las propiedades físico químicas del sistema mediante la hidrólisis del polisacárido. Estos hechos podrían explicar por qué el agua de despulpe constituye la principal fuente de levaduras con este fenotipo.

Otros rasgos característicos de las levaduras del café, presentes en alrededor del 58 % de los casos examinados, fueron la termotolerancia (entendida como crecimiento a 42 °C) y el crecimiento en condiciones de baja actividad de agua (crecimiento en glucosa 50 % [m/v]), lo que sugiere también una adaptación de la microflora del café a las temperaturas



**Figura 7** Cuantificación de la actividad pectinolítica en los aislados. La actividad enzimática se expresa como el diámetro del halo de hidrólisis en placas de agar pectato (pH 5,4) a las 72 horas (30 °C). Letras diferentes señalan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan)

habitualmente altas que dominan la fermentación natural del fruto y la pulpa de café, así como a las condiciones de baja actividad de agua impuestas por la matriz polimérica de la pectina que conforma el mesocarpio del fruto de café. Estas cualidades resultan también de interés práctico si se tiene en cuenta la posible explotación industrial de alguno de estos aislados.

### 3.1.2. Selección del microorganismo. Comprobación de la clasificación taxonómica

La selección se basó, en primer término, en la comparación de la actividad pectinolítica en placa, dada por el diámetro del halo de hidrólisis observado bajo las condiciones de ensayo utilizadas. Como se ilustra en la Figura 7, el halo de hidrólisis producido por la cepa ADA15F supera en más de dos veces las dimensiones de los halos producidos por las cepas ADA44 y ADA39 y éstas, a su vez, superan significativamente ( $p < 0,05$ , prueba de Duncan) a las restantes. Estas tres cepas se seleccionaron para el examen de los restantes criterios de selección, cuyos resultados se muestran en la Tabla 9.

La cepa *K. marxianus* ADA15F, al igual que las otras dos, es capaz de crecer a 42 °C e incapaz de utilizar pectina como única fuente de carbono, pero presenta una mayor tolerancia a etanol y una velocidad específica de crecimiento en EMPC significativamente



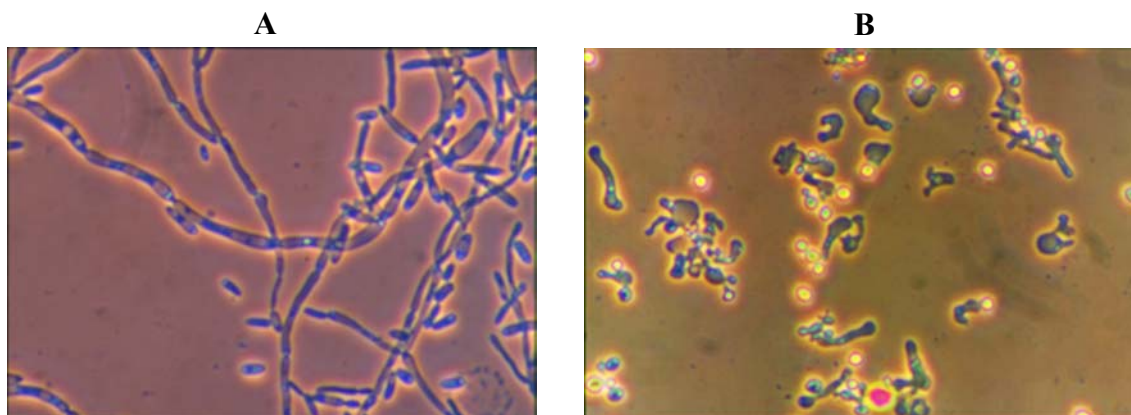
superior ( $p < 0,05$ , prueba de Duncan) e igual a  $0,75 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de doblaje 55 min). Este valor de velocidad específica de crecimiento es similar al reportado para otras estirpes de *K. marxianus* (Hensing *et al.*, 1994). Sobre la base de estos resultados, la cepa ADA15F se seleccionó para los estudios que continúan en el presente trabajo y se depositó en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente bajo la designación *K. marxianus* CCEBI 2011, con la cual será nombrada en lo adelante. Además, la especie a la cual pertenece esta cepa posee el estatus GRAS (*generally regarded as safe*), cualidad ésta de suma importancia si el uso de la cepa está dirigido hacia la obtención de productos ‘grado alimentario’.

**Tabla 9** Comparación de algunos parámetros fisiológicos de las cepas pectinolíticas preseleccionadas.

Cepa	$\mu_m$ ( $\text{h}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Tolerancia a etanol (% [v/v])	Utilización de pectina	Crecimiento a 42 °C
<i>K. marxianus</i> ADA15F	$0,75 \pm 0,05 \text{ a}$	8	–	+
<i>H. jadinii</i> ADA39	$0,61 \pm 0,04 \text{ b}$	6	–	+
<i>H. jadinii</i> ADA44	$0,59 \pm 0,05 \text{ b}$	6	–	+

<sup>a</sup> Estimada a 30 °C, en cultivo agitado en medio EMPC; los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de cuatro determinaciones independientes; letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan)

Con el fin de comprobar la clasificación taxonómica de la cepa seleccionada, se realizó una comparación con la cepa *K. marxianus* CBS 712, la cual ha sido utilizada por otros autores como cepa de referencia en estudios taxonómicos y genómicos (Belloch *et al.*, 2000; Llorente *et al.*, 2000; Belloch *et al.*, 2002). De este estudio se obtuvo que ambas cepas son sexualmente homotáticas y coinciden en el 96 % de las pruebas bioquímicas (Tabla 10). En lo referente a las características morfológicas, la cepa de referencia presenta comportamiento dimórfico, es decir, cambia su morfología de unicelular a filamentosa (Fig.



**Figura 8** Morfología filamentosa (pseudohifas) en (A) *K. marxianus* CBS 712 (YPD, 72 h, 30 °C) y (B) *K. marxianus* CCEBI 2011 (agar acetato, 72 h, 30 °C). Contraste de fases; aumento 400 ×.

8-A) cuando el cultivo envejece. Hasta el momento este comportamiento no ha sido observado en la CCEBI 2011, la cual sólo forma filamentos rudimentarios en agar acetato (Fig. 8-B).

Como el crecimiento filamentoso se considera un rasgo característico de la especie (Barnett *et al.*, 1983; O’Shea y Walsh, 2000), se decidió utilizar una técnica molecular de verificación para confirmar su identidad: el cariotipado mediante electroforesis en campo

pulsado. Los perfiles cromosómicos de ambas cepas muestran una correspondencia total en cuanto a la talla de cinco de sus cromosomas (Fig. 9); un sexto cromosoma, el de mayor talla de la CCEBI 2011, no presenta equivalente en la CBS 712.

**Figura 9** Cariotipos electroforéticos de las cepas CCEBI 2011 (1) y CBS 712 (2) de *K. marxianus*. Condiciones experimentales: agarosa 0,8 %, 14 °C, 100 V; sistema CHEF, dos intervalos de pulso variable: 120-400 s, 48 h y 60-90 s, 24 h.



El género *Kluyveromyces* y, en particular, la especie *K. marxianus* se caracterizan por presentar un rico polimorfismo cromosómico (Belloch *et al.*, 1998; Llorente *et al.*, 2000), lo cual está en concordancia con la gran variabilidad fenotípica inter- e intraespecífica observada dentro de este género. Sin embargo, el patrón común de cinco cromosomas presentado por las cepas en estudio se corresponde con el patrón típico de la especie (Belloch *et al.*, 1998), lo que permite ratificar la identificación de la cepa, a la luz de la información y criterios disponibles, como *K. marxianus*.

**Tabla 10** Comportamiento de las cepas CBS 712 (referencia) y CCEBI 2011 (este trabajo) de *K. marxianus* frente a las pruebas bioquímicas de identificación.

Cepas	Fermentación de azúcares							Pruebas de asimilación y crecimiento											
	D-glucosa	D-galactosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Celobiosa	Inulina	D-galactosa	L-sorbosa	D-glucosamina	D-xilosa	L-arabinosa	D-arabinosa	L-ramnosa	Sacarosa	Maltosa	$\alpha, \alpha$ -trealosa	Celobiosa	Melibiosa
CBS 712 <sup>a</sup>	+	+	-	+	+	N	N	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
CCEBI 2011	+	+	-	+	+	-	w	+	D	-	+	+	-	-	+	-	N	+	-

Cepas	Pruebas de asimilación y crecimiento																		
	Lactosa	Rafinosa	Melecitosa	Inulina	Almidón	Glicerol	Eritritol	Xilitol	L-arabinitol	D-glucitol	D-manitol	Galactitol	myo-inositol	D-gluconato	D-glucononato	DL-lactato	Succinato	Citrato	Metanol
CBS 712 <sup>a</sup>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	D	D	-	-	-	-	+	+	+	-
CCEBI 2011	+	+	-	+	-	+	-	+	N	N	+	-	-	-	-	+	+	+	-

Cepas	Pruebas de asimilación y crecimiento												
	Etanol	Me- $\alpha$ -D-glucopiranosido	D-glucono-1,5-lactona	2-ceto-D-gluconato	Nitrato	Etilamina	L-lisina	Cadaverina	Sin vitaminas	25 °C	35 °C	37 °C	42 °C
CBS 712 <sup>a</sup>	+	-	D	-	-	+	+	+	-	N	+	+	+
CCEBI 2011	+	-	+	-	-	+	+	N	-	-	+	+	+

Cepas	Pruebas de asimilación y crecimiento					Otras pruebas		
	Cicloheximida 0,01 %	Cicloheximida 0,1 %	D-glucosa 50 %	D-glucosa 60 %	D-glucosa 5 % / NaCl 10 %	Formación de almidón	Hidrólisis de la urea	Reacción del DBB
CBS 712 <sup>a</sup>	+	+	N	N	+	-	N	-
CCEBI 2011	+	+	+	-	+	-	-	-

<sup>a</sup> Fuente: CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Yeast database, Delft, Holanda

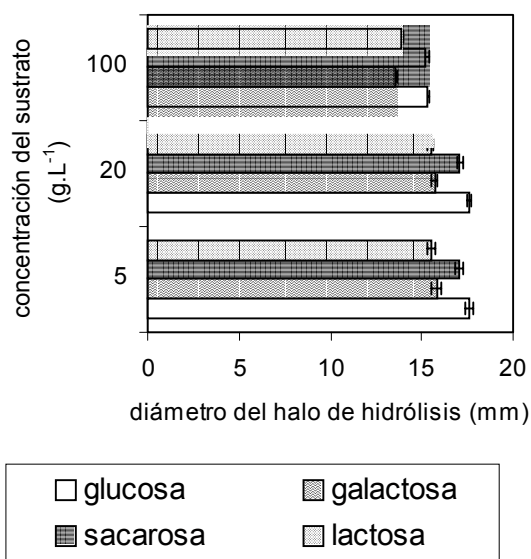
<sup>b</sup> Leyenda: +, respuesta positiva; -, negativa; w, débil; D, demorada (> 7 días); N, prueba no realizada o resultado no reportado

### **3.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PG EN *K. marxianus* CCEBI 2011**

#### **3.2.1. Ensayos preliminares de la actividad pectinolítica en placa: efectos de la naturaleza y concentración de la fuente de carbono**

Estudios previos han postulado que la síntesis de PG en levaduras es constitutiva (Luh y Phaff, 1951; Luh y Phaff, 1954; Blanco *et al.*, 1994; Schwan y Rose, 1994) y que se reprime al incrementarse la concentración de glucosa (Federici, 1985; Blanco *et al.*, 1994; Schwan y Rose, 1994; Gainvors y Belarbi, 1996; Blanco *et al.*, 1997b; Gognies *et al.*, 2001). Estos reportes se han basado, principalmente, en la observación de halos de hidrólisis alrededor de colonias de levadura crecidas en placas conteniendo PGA y glucosa. Sin embargo, no es posible descartar en estos experimentos la existencia de actividad pectinolítica residual interferente contenida en el inóculo. Por otro lado, la baja concentración de glucosa en el medio y el prolongado tiempo del ensayo (habitualmente 72 h) pueden causar una disminución considerable de la concentración de glucosa en las proximidades de la colonia, de modo tal que no se puede descartar tampoco un efecto inductor del PGA presente, o de sus productos de hidrólisis. Además, la variabilidad en el tamaño del inóculo (cargado con aguja de platino) dificulta la posibilidad de establecer comparaciones semicuantitativas para diferentes condiciones de cultivo o cepas.

En este estudio se usó un inóculo estándar y el tiempo de incubación a 30 °C se redujo a 24 h, lo cual garantizó una excelente reproducibilidad en los resultados. *K. marxianus* CCEBI 2011 presentó halos de hidrólisis en presencia de glucosa, sacarosa, lactosa y galactosa,

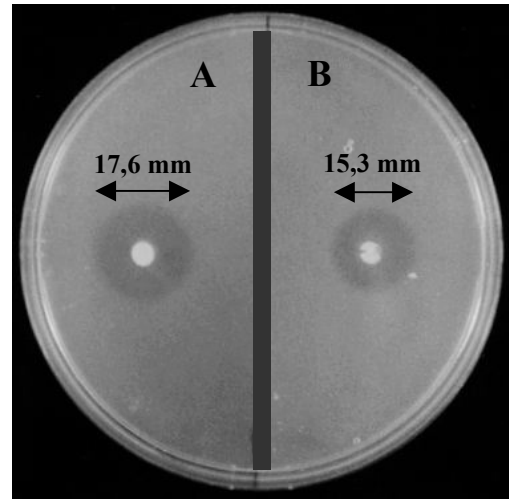


**Figura 10** Efectos de la naturaleza y concentración de la fuente de carbono sobre la actividad pectinolítica en placa en *K. marxianus* CCEBI 2011 (medio mínimo, pH 5,4; 24 h a 30 °C). Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de cinco mediciones independientes.

para un rango de concentraciones entre 5 y 100 g·L<sup>-1</sup>, disminuyendo el tamaño del halo en el orden glucosa  $\approx$  sacarosa > lactosa  $\approx$  galactosa y en la medida en que se incrementó la concentración de la fuente de carbono (Fig. 10). Cuando la concentración del sustrato fue de 100 g·L<sup>-1</sup> se observó una pequeña pero significativa ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan) disminución en el diámetro del halo con respecto a las concentraciones de 20 y 5 g·L<sup>-1</sup>, la cual puede ser visualizada para

el caso de la glucosa en la Figura 11. Considerando que la actividad pectinolítica es proporcional al área de los halos, entonces para glucosa 100 g·L<sup>-1</sup> la actividad pectinolítica será un 75,6 % de aquella observada en glucosa 5 g·L<sup>-1</sup>. Esta disminución en la secreción de PG se corresponde con un menor crecimiento (menor tamaño de colonia) (Fig. 11), lo que sugiere que las tasas de síntesis de enzima y, por ende, los niveles transcripcionales no son afectados por la concentración de glucosa en el medio pero sí por la velocidad de crecimiento del microorganismo. Se ha reportado por otros autores la existencia de una correlación entre el incremento en la presión osmótica, debido al aumento de la concentración del sustrato, y la disminución del crecimiento y la capacidad fermentativa en levaduras (Jones *et al.*, 1981; Hahn-Hägerdal *et al.*, 1982; Beuchat, 1983; Gough *et al.*, 1996).

Estos resultados constituyen el primer reporte que demuestra la síntesis de PG en presencia de concentraciones de la fuente de carbono tan altas como  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La producción de PG en esta cepa constituye un singular ejemplo de un sistema de expresión no reprimido por catabolito. Este hallazgo resulta de gran importancia práctica si se valora el posible uso de la cepa para la producción simultánea de PG y etanol, considerando las altas concentraciones de azúcar que se emplean habitualmente en este proceso. Un sistema de expresión con estas características podría resultar atractivo también para la producción de proteínas heterólogas de alto valor agregado.



**Figura 11** Visualización del efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad PG en placa. Medio mínimo (pH 5,4),  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 horas. A) Glucosa  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; B) Glucosa  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los diámetros de los halos corresponden al promedio de cinco mediciones y la diferencia entre ellos es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ; prueba de t-Student)

### 3.2.2. Ensayos en medio líquido

#### 3.2.2.1. Influencia de la concentración de oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo ha sido descrito como un parámetro crucial para la producción de PG en levaduras, siendo frecuente el fenómeno de represión en presencia de oxígeno (García-Garibay *et al.*, 1987; Barnby *et al.*, 1990; Murad y Foda, 1992; Schwan y Rose, 1994). En la Tabla 11 se muestra el efecto de la oxigenación del cultivo sobre la producción de biomasa y PG en *K. marxianus* CCEBI 2011. Las actividades pectato liasa y pectina metilesterasa no se detectaron en ninguna de las

variantes estudiadas, de modo que la cepa produce exclusivamente PG como único enzima péptico. Una disminución en la concentración y el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato consumido tiene lugar conforme disminuye la oxigenación de los cultivos, lo que se corresponde con la menor eficiencia energética del metabolismo fermentativo (óxido-reductor) sobre el respiratorio. A diferencia de esto, la producción de PG crece de modo notable, llegando a ser cuatro veces mayor en el cultivo estático y diez veces mayor en el cultivo estático con mayor volumen de medio (variante 0+). Mucho más notable resulta el incremento en el rendimiento de enzima por unidad de biomasa, el cual llega a ser casi dos órdenes superior en la variante de menor oxigenación respecto al cultivo a 200 min<sup>-1</sup>. Estos resultados apuntan hacia la existencia de una estrecha relación entre la síntesis de PG y el número de células en crecimiento activo dependiente de la ruta catabólica anaeróbica. Otras glucosidrolasas de levadura, como la invertasa, también son reguladas negativamente por la presencia de oxígeno en el medio, lo cual ocurre tanto para cepas salvajes como recombinantes de *S. cerevisiae* (Vitolo *et al.*, 1987; Pvnun *et al.*, 1999).

**Tabla 11** Efecto de la oxigenación del cultivo sobre la formación de biomasa y la secreción de PG<sup>a</sup>.

Oxigenación (como agitación, en min <sup>-1</sup> )	Biomasa (mg·mL <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub>	PG (U·mL <sup>-1</sup> )	Y <sub>enz/X</sub> (U·mg <sup>-1</sup> )	Q <sub>vol</sub> PG × 10 <sup>3</sup> (U·mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
200	4,07 ± 0,11	0,407 ± 0,014	0,65 ± 0,03	0,16 ± 0,007	54 ± 2
100	2,68 ± 0,08	0,268 ± 0,024	1,6 ± 0,05	0,59 ± 0,018	132 ± 4
50	1,70 ± 0,06	0,174 ± 0,005	2,0 ± 0,09	1,20 ± 0,054	170 ± 8
0	1,31 ± 0,03	0,160 ± 0,005	2,4 ± 0,11	1,85 ± 0,085	202 ± 9
0+ <sup>b</sup>	0,52 ± 0,02	0,052 ± 0,002	6,9 ± 0,44	13,27 ± 0,85	287 ± 18

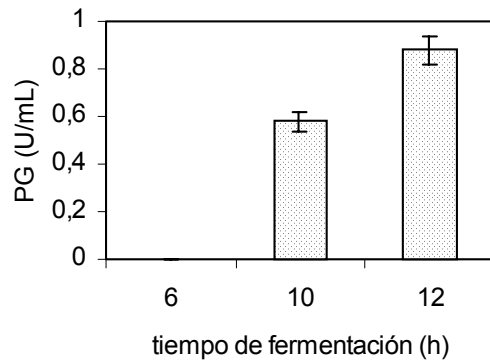
<sup>a</sup> Para cultivos de 12 horas en medio mínimo conteniendo glucosa 10 g·L<sup>-1</sup> como fuente carbono (pH 5,0, temperatura 30 °C) en frascos de 100 mL conteniendo 20 mL de medio; los valores se presentan como la media ± desviación estándar de cuatro cultivos independientes

<sup>b</sup> Las mediciones corresponden a las 24 horas de cultivo; el volumen de medio fue en este caso de 80 mL

<sup>c</sup> Leyenda: Y<sub>X/S</sub>, rendimiento biomasa/sustrato; PG, actividad poligalacturonasa; Y<sub>enz/X</sub>, rendimiento enzima/biomasa; Q<sub>vol</sub> PG, productividad volumétrica del enzima



Sin embargo, aún en la variante de oxigenación máxima ( $200 \text{ min}^{-1}$ ), no se observa una inhibición completa de la producción de PG (Tabla 11), a diferencia de lo reportado por Wimborne y Rickard (1978) en *S. fragilis* (syn. *K. marxianus*) y por Blanco *et al.* (1994) en *S. cerevisiae*, quienes sí encontraron represión completa a



**Figura 12** Dinámica de la secreción de PG en condiciones de aerobiosis. Medio mínimo (glucosa  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5,4),  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , agitación del cultivo  $200 \text{ min}^{-1}$ .

altas concentraciones de oxígeno disuelto. Estos resultados aparentemente contradictorios indican que los factores que controlan la producción de PG en levaduras son complejos y varían de una especie a otra e incluso entre cepas de la misma especie.

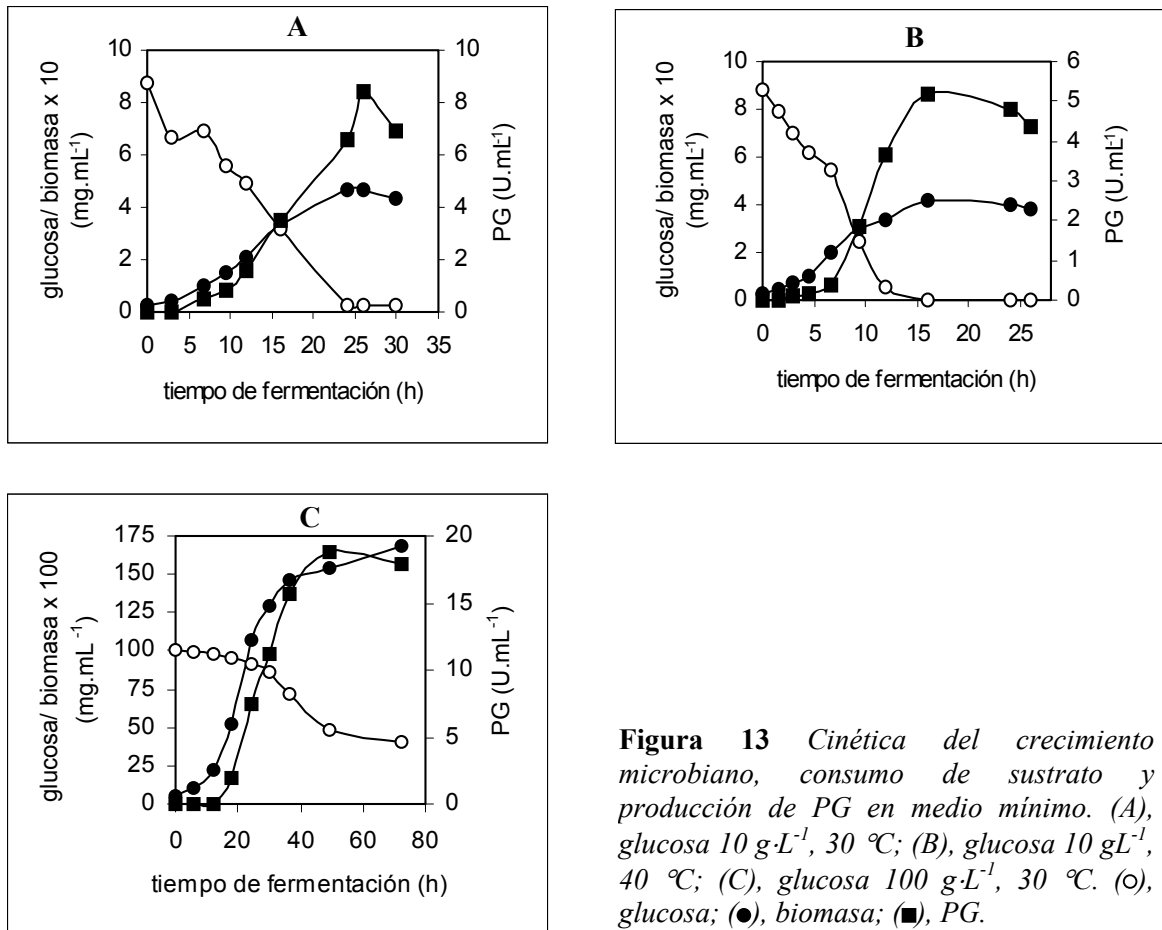
Cuando se siguió la dinámica de la producción de PG a  $200 \text{ min}^{-1}$  se obtuvo que la máxima producción de PG tiene lugar entre las 10 y 12 horas (Fig. 12), justo cuando el cultivo se aproxima a la fase estacionaria de crecimiento y la densidad celular es elevada, lo cual puede limitar la disponibilidad de oxígeno para las células en crecimiento. Esto concuerda con la hipótesis de que la síntesis de PG está asociada al crecimiento en cultivo limitado de oxígeno. Aún para confirmar tal hipótesis se hacen necesarios experimentos donde, bajo condiciones de cultivo continuo y aerobiosis total, se midan los niveles de ARNm correspondientes a la síntesis de PG. Por otro lado, se conoce que algunos genes de levadura son regulados por factores de estrés distintos de anaerobiosis, tales como la limitación de algún nutriente específico, como ocurre con las proteínas Hsp 150 (Russo *et al.*, 1992) y Ygp1p (Destruelle *et al.*, 1994; Emslie *et al.*, 1999).

### 3.2.2.2. Cinética de la producción de PG. Efecto de la temperatura de fermentación y de la concentración del sustrato

Conocido que el cultivo estático (limitado de oxígeno) ofrece las mejores condiciones para la producción de PG, se procedió a estudiar la cinética de crecimiento microbiano, consumo de sustrato y actividad PG acumulada bajo estas condiciones, utilizando dos variantes de temperatura, 30 °C y 40 °C, y dos de concentración de glucosa 10 g·L<sup>-1</sup> y 100 g·L<sup>-1</sup>. De igual modo que en el experimento precedente, en los filtrados de cultivo correspondientes a diferentes tiempos de fermentación para las variantes ensayadas solamente se detectó actividad PG. Como puede apreciarse en la Figura 13, la producción de PG en *K. marxianus* está asociada al crecimiento, con independencia de la temperatura de fermentación y de la concentración del sustrato, incrementándose la concentración de enzima de modo continuo hasta alcanzar su máximo valor hacia el inicio de la fase estacionaria, disminuyendo luego con el envejecimiento del cultivo. De acuerdo con este resultado, el tiempo óptimo de fermentación puede definirse como aquel para el cual el cultivo ha arribado a la fase estacionaria de crecimiento.

La síntesis continua de PG en presencia de glucosa, incluso a elevadas concentraciones, y en ausencia del sustrato del enzima o de sus productos de hidrólisis apunta hacia el carácter no inducible de este sistema enzimático. Estos resultados se corresponden con lo reportado por Schwan y Rose (1994) para una cepa de *K. marxianus* aislada del proceso de fermentación del cacao.

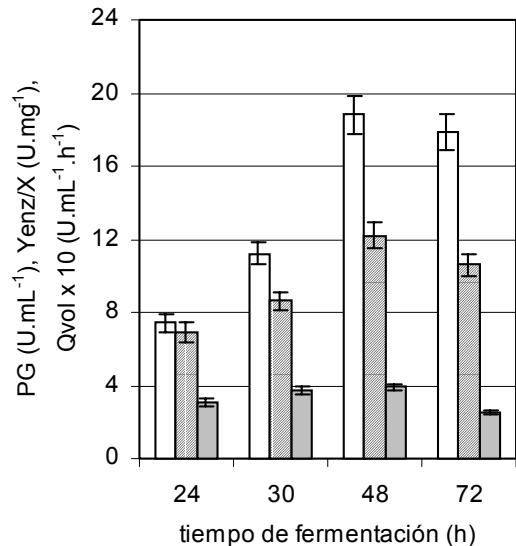
En la variante donde la concentración de glucosa es 100 g·L<sup>-1</sup>, después de 48 horas de fermentación, cuando la concentración de glucosa ha caído a menos de la mitad de su valor



**Figura 13** Cinética del crecimiento microbiano, consumo de sustrato y producción de PG en medio mínimo. (A), glucosa 10 g·L<sup>-1</sup>, 30 °C; (B), glucosa 10 g·L<sup>-1</sup>, 40 °C; (C), glucosa 100 g·L<sup>-1</sup>, 30 °C. (○), glucosa; (●), biomasa; (■), PG.

inicial, una considerable disminución en la velocidad de crecimiento tiene lugar (Fig. 13-C), probablemente debido a la acumulación de etanol y dióxido de carbono en el medio. Entre las 48 y 72 h de fermentación prácticamente no se produce variación en los niveles de PG acumulada en el medio de cultivo y, si atendemos a la dinámica de los diferentes parámetros utilizados para caracterizar el proceso (Fig. 14), se tiene que a las 48 h corresponde el tiempo óptimo de fermentación para estas condiciones.

Con respecto al efecto de la temperatura de fermentación, como era de esperar, la velocidad de crecimiento específico es considerablemente superior a 40 °C, con la consiguiente



**Figura 14** Dinámica del comportamiento de los parámetros productivos de PG en medio mínimo, concentración de glucosa  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 5,4;  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ). □, acumulado de actividad enzimática; ▨, rendimiento enzima/biomasa ( $Y_{enz/X}$ ); ■, productividad volumétrica ( $Q_{vol}$ ).

$^\circ\text{C}$ , en tanto las productividades volumétricas tienen prácticamente el mismo valor. Aunque el experimento no permite definir una tendencia, parece ser que un incremento de la temperatura no favorece la síntesis de PG bajo las condiciones de ensayo utilizadas. En parte, esta disminución en la producción de PG puede atribuirse a la pérdida de enzima por desnaturalización térmica (ver más adelante en el epígrafe 3.3). González-Blanco *et al.* (1990) también observaron una disminución en el rendimiento de proteína total con la temperatura durante el cultivo de *Aspergillus terreus* sobre paja de caña.

Con relación al efecto que la concentración del sustrato ejerce sobre la producción de PG en *K. marxianus* se puede apreciar, en primer lugar, una disminución significativa ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan) en la velocidad máxima de crecimiento específico de alrededor de un

disminución del tiempo de fermentación de 26 a 16 horas, respecto al cultivo a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tabla 12). Las concentraciones de biomasa final son similares en ambos cultivos, presentando un valor ligeramente menor en el cultivo a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , lo que se puede explicar en virtud de la existencia de mayores gastos en energía de mantenimiento a esa temperatura (Cooney y Makiguchi, 1977).

Tanto el acumulado de PG como el rendimiento enzima/ biomasa son alrededor de 1,6 veces superiores para el cultivo a  $30$

27 % cuando la concentración se incrementa de 10 a 100 g·L<sup>-1</sup> (Tabla 12). Este resultado concuerda muy bien con lo observado en el ensayo en placa (Fig. 11). No obstante, para las 24 h se tiene que tanto el acumulado, como la productividad volumétrica del enzima son similares a los obtenidos para glucosa 10 g·L<sup>-1</sup> (Fig. 14 y Tabla 12), aunque con un rendimiento específico de enzima inferior. A las 48 h el acumulado total de enzima para el medio con glucosa a 100 g·L<sup>-1</sup> duplica lo obtenido en glucosa 10 g·L<sup>-1</sup> y la productividad volumétrica es un 20 % superior, no ocurriendo así para el rendimiento de enzima por unidad de biomasa formada, el cual disminuye a casi dos tercios.

**Tabla 12** Comparación de parámetros fisiológicos y productivos de la producción de PG en medio mínimo a diferentes temperaturas y concentraciones de la fuente de carbono<sup>a</sup>.

Parámetros	Glucosa 10 g·L <sup>-1</sup>		Glucosa 100 g·L <sup>-1</sup>
	30 °C	40 °C	30 °C
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	0,170 ± 0,013 b	0,283 ± 0,024 a	0,124 ± 0,010 c
Tiempo óptimo (h) <sup>b</sup>	26	16	48
Biomasa (mg·mL <sup>-1</sup> )	0,46 ± 0,013 b	0,42 ± 0,015 b	1,54 ± 0,07 a
PG (U·mL <sup>-1</sup> )	8,40 ± 0,54 b	5,18 ± 0,30 c	18,8 ± 1,0 a
$Y_{enz/X}$ (U·mg <sup>-1</sup> )	18,3 ± 1,69 a	12,33 ± 1,04 b	12,21 ± 0,71 b
$Y_{enz/S}$ (U·g <sup>-1</sup> )	0,84 ± 0,05 a	0,52 ± 0,06 b	0,36 ± 0,02 c
$Q_{vol} PG \times 10^3$ (U·mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	323 ± 21 b	324 ± 19 b	392 ± 21 a

<sup>a</sup> Los valores se presentan como la media ± desviación estándar de cuatro repeticiones; letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05; prueba de Duncan)

<sup>b</sup> Tomado como aquel para el cual el acumulado de PG alcanza su máximo valor

<sup>c</sup> Leyenda:  $Y_{enz/X}$ , rendimiento enzima/biomasa, como unidades de enzima por miligramo de biomasa formado;  $Y_{enz/S}$ , rendimiento enzima/sustrato, como unidades de enzima por gramo de sustrato inicial;  $Q_{vol}$ , productividad volumétrica

Como se evidencia de estos resultados, el incremento en el acumulado total de enzima para la variante con glucosa a 100 g·L<sup>-1</sup> no guarda un comportamiento lineal con la cantidad de sustrato consumida (que en este caso es de unos 52 g·L<sup>-1</sup> a las 48 h), lo que tampoco ocurre

para la biomasa. La concentración extracelular de PG obtenida en esta variante (18,8 U·mL<sup>-1</sup>) constituye el valor más alto reportado hasta el momento para una levadura salvaje.

### 3.2.2.3. Influencia de la naturaleza de la fuente de carbono

Para el estudio de la influencia de la naturaleza de la fuente de carbono sobre la producción de PG se tuvo en cuenta, en primer término, aquellos azúcares que el microorganismo es capaz de utilizar bajo condiciones anaerobiosis, que son las que favorecen la producción del enzima. En correspondencia con lo observado en el ensayo en placa, cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono se obtienen los mejores índices en cuanto a producción de biomasa, acumulado de PG, rendimiento enzima/biomasa y productividad volumétrica del enzima (Tabla 13.a) y el tiempo de fermentación es la mitad de aquel obtenido para los demás sustratos.

En orden de eficiencia, siguen a la glucosa la sacarosa, la lactosa y finalmente la galactosa. Aunque para los monosacáridos se observa un mayor crecimiento microbiano (Tabla 13.a), a la galactosa corresponden los índices inferiores en cuanto a la producción de PG. Parece ser que no es la hidrólisis del disacárido (lactosa) la etapa limitante del proceso de utilización del azúcar por el microorganismo, sino el transporte de la galactosa al interior de la célula o su posterior incorporación a la ruta glucolítica. En este sentido Carvalho-Silva y Spencer-Martins (1990) han señalado la existencia de varios modos de transporte de glucosa y galactosa en cepas de *K. marxianus* que fermentan lactosa y galactosa, lo cual influye sobre la capacidad fermentativa de estas cepas.

Bajo condiciones de máxima oxigenación y empleando glucosa como fuente de carbono, se observaron siempre niveles de PG detectables, aunque bajos, en el medio extracelular (Tabla 11). Por esta razón se decidió ampliar el estudio de la influencia de la fuente de carbono a aquellas que la cepa sólo puede utilizar en condiciones de aerobiosis. Los resultados se presentan en la Tabla 13.b.

**Tabla 13** Influencia de la naturaleza de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la producción de PG.

a) Fuentes de carbono fermentables<sup>a</sup>

Fuente de carbono	Tiempo de fermentación (h)	Biomasa <sup>b</sup> (mg·mL <sup>-1</sup> )	PG <sup>b</sup> (U·mL <sup>-1</sup> )	Y <sub>enz/X</sub> <sup>b</sup> (U·mg <sup>-1</sup> )	Q <sub>vol</sub> PG × 10 <sup>3</sup> (U·mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Glucosa	24	0,55 ± 0,04 a	8,50 ± 0,49 a	15,45 ± 0,89 a	354 ± 20 a
Galactosa	48	0,52 ± 0,03 a	1,34 ± 0,05 d	2,58 ± 0,12 b	28 ± 1 d
Sacarosa	48	0,42 ± 0,01 b	6,22 ± 0,27 b	14,81 ± 0,78 a	130 ± 6 b
Lactosa	48	0,38 ± 0,01 b	2,17 ± 0,12 c	2,87 ± 0,19 b	45 ± 2 c

<sup>a</sup> Todas las mediciones corresponden a cultivos en fase estacionaria temprana en medio mínimo, fuente de carbono a 10 g·L<sup>-1</sup>, pH 5,0, temperatura 30 °C; los valores representan la media ± desviación estándar de cuatro repeticiones

<sup>b</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05; prueba de Duncan)

b) Fuentes de carbono sólo asimilables en condiciones de aerobiosis<sup>a</sup>

Fuente de carbono	Tiempo de fermentación (h)	Biomasa (mg·mL <sup>-1</sup> )	PG (U·mL <sup>-1</sup> )	Y <sub>enz/X</sub> (U·mg <sup>-1</sup> )	Q <sub>vol</sub> PG <sup>b</sup> × 10 <sup>3</sup> (U·mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Glucosa <sup>c</sup>	12	4,07 ± 0,11	0,65 ± 0,12	0,16 ± 0,03	54 ± 2
Xilosa	26 (12) <sup>d</sup>	1,50 ± 0,04	0,64 ± 0,08	0,36 ± 0,03	46 ± 3
Celobiosa	60 (26) <sup>d</sup>	2,52 ± 0,06	0,66 ± 0,08	0,26 ± 0,02	19 ± 1
Inulina	14	1,92 ± 0,06	0,81 ± 0,08	0,42 ± 0,03	58 ± 3
Etanol	22	1,47 ± 0,05	ND <sup>e</sup>	—	—
Etanol + PGA	22	1,45 ± 0,05	ND	—	—
Citrato	60 (24) <sup>d</sup>	1,54 ± 0,04	ND	—	—

<sup>a</sup> Todas las mediciones corresponden a cultivos en fase estacionaria temprana en medio mínimo, fuente de carbono a 10 g·L<sup>-1</sup>, pH 5,0, temperatura 30 °C; los valores representan la media ± desviación estándar de cuatro repeticiones

<sup>b</sup> No se considera la fase lag del crecimiento en el cálculo

<sup>c</sup> Control de una fuente de carbono fermentable en condiciones de aerobiosis

<sup>d</sup> Entre paréntesis, tiempo correspondiente a la fase lag del crecimiento

<sup>e</sup> ND, no detectable

Como se puede apreciar, se presentaron fases de latencia relativamente largas en el crecimiento cuando la fuente de carbono fue xilosa, celobiosa y citrato; en estos dos últimos el crecimiento fue, además, mucho más lento. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el inóculo procede de un medio de cultivo basado en glucosa, lo cual obliga a una readaptación de la maquinaria enzimática celular para asimilar estos sustratos. La mayor concentración de biomasa correspondió al medio con glucosa, seguido de celobiosa e inulina. Para los demás sustratos la producción de biomasa fue similar, del orden de los  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

La producción de PG se observó solamente cuando la fuente de carbono fue un carbohidrato y alcanzó acumulados similares en todos los casos, aunque ligeramente superiores en la inulina. Para las variantes que emplean etanol o citrato no se detectó actividad pectinolítica (Tabla 13.b). A diferencia de lo descrito para *S. cerevisiae* por Gainvors y Belarbi (1995), *K. marxianus* es incapaz de utilizar o hidrolizar PGA, aún en presencia de etanol como fuente de carbono y energía, de modo que el crecimiento observado en las variantes que utilizan etanol fue idéntico independientemente de la presencia o no de PGA. Al igual que en PGA, el microorganismo es incapaz de crecer en presencia de ácido galacturónico, coincidiendo con lo reportado también por Schwan *et al.* (1996) para una cepa de *K. marxianus*.

La ausencia de actividad pectinolítica en las variantes que utilizan etanol y citrato como fuente de carbono concuerda con la hipótesis de la existencia de un vínculo entre el catabolismo glucolítico de los azúcares y la síntesis de PG en levaduras. A diferencia de los



azúcares, el etanol no requiere de su procesamiento por el ciclo glucolítico para ser incorporado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, del cual el citrato es un componente.

**Tabla 14** Influencia de la adición de sustancias pécticas sobre el crecimiento y la producción de PG<sup>a</sup>.

Aditivo	Tiempo de fermentación (h)	Biomasa <sup>b</sup> (mg·mL <sup>-1</sup> )	PG <sup>b</sup> (U·mL <sup>-1</sup> )	Y <sub>enz/X</sub> <sup>b</sup> (U·mg <sup>-1</sup> )
Sin aditivo	24	0,55 ± 0,04 a	8,50 ± 0,49 a	15,45 ± 0,89 a
PGA 5 g·L <sup>-1</sup>	24	0,49 ± 0,02 a	7,43 ± 0,48 ab	15,16 ± 1,17 a
AGU 5 g·L <sup>-1</sup>	30	0,40 ± 0,02 b	5,46 ± 0,21 c	13,65 ± 0,80 a
RLC	24	0,54 ± 0,01 a	6,50 ± 0,29 b	12,03 ± 0,66 b

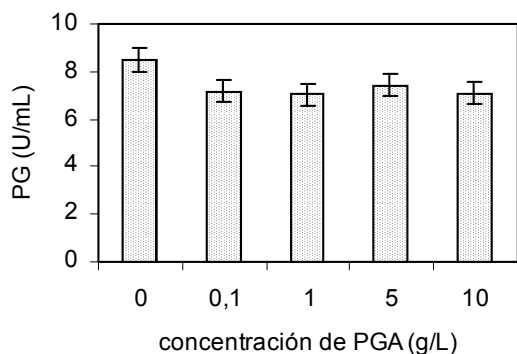
<sup>a</sup> Todas las mediciones corresponden a cultivos en fase estacionaria temprana en medio mínimo conteniendo glucosa 10 g·L<sup>-1</sup>, pH 5,0, temperatura 30 °C; los valores corresponden a la media ± desviación estándar de cuatro repeticiones

<sup>b</sup> Letras diferentes señalan diferencias significativas (p < 0,05; prueba de Duncan)

<sup>c</sup> AGU, ácido galacturónico; PGA, ácido poligalacturónico; RLC, residual líquido del beneficio húmedo del café (ver sección Materiales y Métodos)

#### 3.2.2.4. Efecto de la adición de sustancias pécticas

La adición de PGA a concentraciones de 0,1 – 10 g·L<sup>-1</sup> al medio conteniendo glucosa provoca una disminución ligera, no significativa estadísticamente (p>0,05; prueba de Duncan), en la síntesis de PG (Fig. 15), en tanto el crecimiento no sufre afectación alguna (Tabla 14). La presencia de ácido galacturónico 5 g·L<sup>-1</sup> conduce a una disminución notable en el rendimiento de biomasa y la producción de PG (Tabla 14). Podría suponerse la existencia de cierto efecto tóxico del ácido galacturónico a la concentración utilizada, lo cual implicaría mayores gastos de mantenimiento y, por ende, una menor producción de masa celular. Aunque existe una relación entre los acumulados de PG y la concentración final de biomasa, los rendimientos enzima/biomasa son significativamente (p<0,05) menores para la variante donde se adiciona ácido galacturónico en comparación con



**Figura 15** Influencia de la concentración de PGA adicionado sobre la producción de PG. Medio mínimo, glucosa 10 g·L<sup>-1</sup>; 30 °C.

aquellos obtenidos en las variantes que no lo contienen. Este resultado difiere de lo reportado por Blanco *et al.* (1994), quienes observaron un efecto claramente inductor del ácido galacturónico. En cambio, Gognies *et al.* (2001), en sus estudios sobre la regulación de la expresión del gen *PGUI* en *S. cerevisiae*, señalan la existencia de cierto efecto represor

en la síntesis de PG mediada por este compuesto, lo cual concuerda con los resultados aquí discutidos.

La adición del residual líquido del beneficio húmedo del café (10 % v/v) no afecta el crecimiento microbiano aunque sí disminuye significativamente ( $p < 0,05$ ) el acumulado de PG y el rendimiento enzima/biomasa (Tabla 14), siendo este último, incluso, inferior al obtenido en la variante con ácido galacturónico. Los residuales del beneficio húmedo del café poseen un alto contenido de sólidos solubles, mayormente pectina y otros azúcares y compuestos polifenólicos, procedentes de la pulpa de café (Serrat, 1998). Es probable que alguno de los componentes presentes en estos residuales afecte la estabilidad o actividad del enzima.

En general puede concluirse que la síntesis de PG en *K. marxianus* CCEBI 2011 no sufre del fenómeno de represión catabólica, no es afectada por la presencia de sustancias pécticas o sus productos de hidrólisis, en tanto es regulada negativamente por la concentración de oxígeno disuelto y está asociada a la actividad de la ruta glucolítica. Todo parece indicar

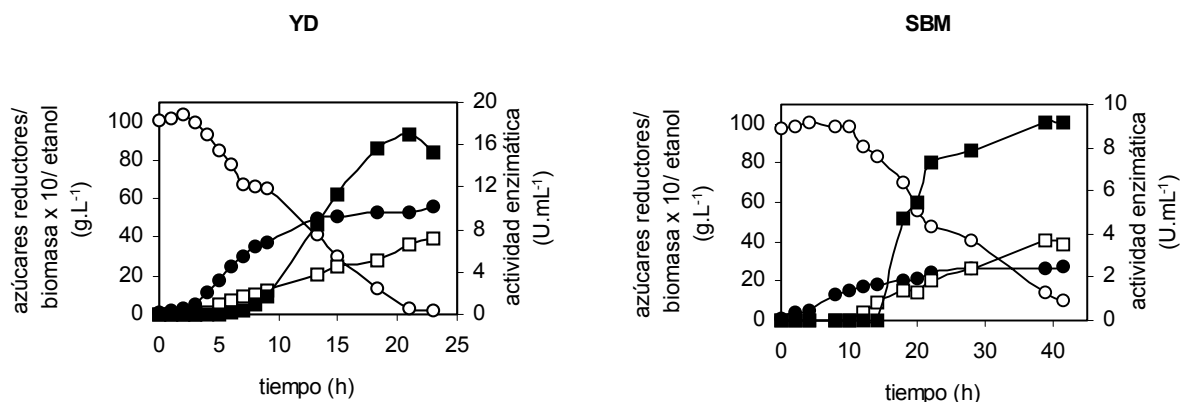
que la regulación de los genes de PG en *S. cerevisiae* y *K. marxianus* obedece a mecanismos diferentes.

### **3.2.3. Co-producción de PG y etanol en cultivo discontinuo a escala piloto**

#### **3.2.3.1. Producción de etanol**

En microbiología industrial el cambio de escala del laboratorio al nivel piloto constituye un paso crucial. Entre otras cosas, el escalado posibilita obtener información más precisa del proceso en estudio y validar el comportamiento del microorganismo bajo nuevas condiciones ambientales, en las cuales cobran relevancia aspectos tales como los gradientes de temperatura y concentración de nutrientes, entre otros. Por estos motivos y, teniendo en cuenta que la producción de PG tiene lugar bajo condiciones de limitación de oxígeno, se acometió el estudio del proceso de co-producción del enzima y etanol a escala piloto, utilizando dos medios de cultivo: uno compuesto por extracto de levadura y glucosa (YD) y otro basado en melazas de remolacha azucarera (SBM).

La Figura 16 muestra la cinética de la fermentación y en la Tabla 15 se resumen los parámetros productivos y fisiológicos de la fermentación para ambos medios. En SBM el valor de la velocidad máxima de crecimiento específico es casi la mitad de aquel obtenido para YD, como consecuencia de lo cual el tiempo de fermentación es casi dos veces mayor. El rendimiento de biomasa es también mucho menor en SBM (casi la mitad). La presencia en melazas de derivados furánicos, tales como furfural e hidroximetilfurfural, de reconocidos efectos inhibitorios sobre el crecimiento microbiano (Glacet *et al.*, 1985; Palmqvist *et al.*, 1999; Taherzadeh *et al.*, 2000) podría explicar los resultados observados.



**Figura 16** Cinética de la coproducción de PG y etanol en fermentación discontinua a escala piloto en los medios YD y SBM. (○), Azúcares reductores; (●), biomasa; (□), etanol; (■), PG.

**Tabla 15** Resumen de los parámetros productivos y fisiológicos de la coproducción en fermentación discontinua a escala piloto de etanol y PG<sup>a</sup>

Parámetros	YD	SBM	
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	0,562	0,281	
$Y_{X/S}$	0,057	0,031	
Eficiencia (%) <sup>b</sup>	76,8 ± 2,3	95,1 ± 1,5	*
$Q_{vol}$ etanol (g·L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	1,94 ± 0,05	1,37 ± 0,07	*
Etanol (g·L <sup>-1</sup> )	39,4 ± 1,2	40,6 ± 1,2	n.s
$Q_{vol}$ PG × 10 <sup>3</sup> (U·mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	740 ± 40	240 ± 20	*
$q_{esp\ max}$ PG (U·mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1,08	0,46	
PG (U·mL <sup>-1</sup> )	17,0 ± 0,95	9,1 ± 0,62	*
$Y_{enz/X}$ (U·mg <sup>-1</sup> )	3,2 ± 0,18	3,5 ± 0,24	n.s

<sup>a</sup> Leyenda: YD, medio extracto de levadura-glucosa; SBM, medio melazas de remolacha;  $\mu_m$ , velocidad máxima de crecimiento específico;  $Y_{X/S}$ , rendimiento biomasa/sustrato;  $Q_{vol}$ , productividad volumétrica;  $q_{esp\ max}$  PG, tasa específica máxima de producción de PG;  $Y_{enz/X}$ , rendimiento enzima/biomasa; \*, parámetro para el cual la diferencia entre las medias es significativa ( $p < 0,05$ ; prueba t-Student); n.s, diferencia no significativa ( $p > 0,05$ )

<sup>b</sup> Sobre la base del rendimiento teórico máximo de etanol con respecto al sustrato consumido (51,1 %)

<sup>c</sup> Estimada de la línea de regresión *concentración de etanol* vs. *tiempo* (Fig. 17-A)

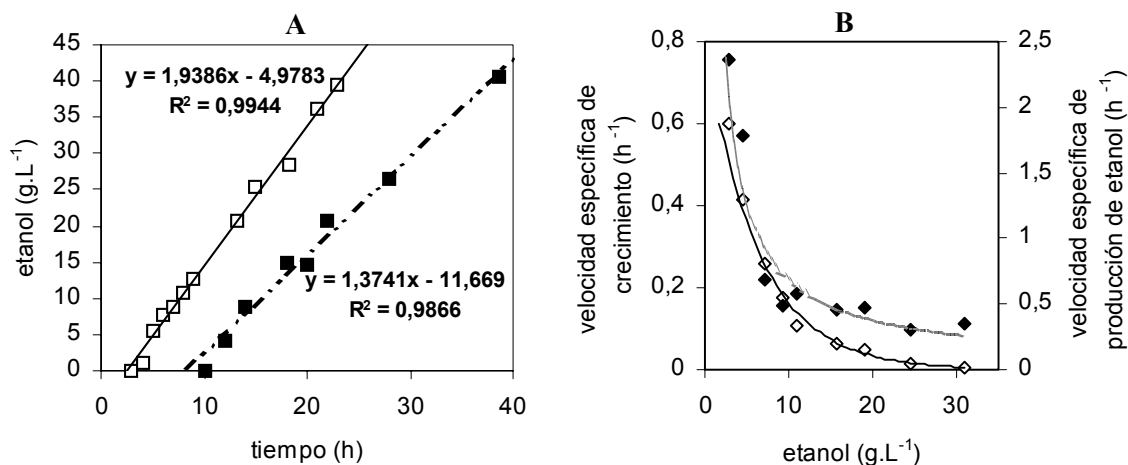
<sup>d</sup> Para el proceso total

La aplicación en esta experiencia de una agitación suave (100 min<sup>-1</sup>) garantizó una distribución homogénea de la biomasa dentro del reactor, evitándose la formación de gradientes indeseables de sustrato y la acumulación excesiva de dióxido de carbono en el

medio. Esta acción permitió reducir considerablemente el tiempo de fermentación (a la mitad en YD) en ambos medios, comparado a lo observado en la fermentación a escala de laboratorio (Fig. 13-C), garantizando, además, un agotamiento completo del sustrato.

Un hecho interesante observado en la producción de etanol es que éste se acumula a una velocidad prácticamente constante durante el curso de la fermentación en ambos medios (Fig. 17-A), cuando el comportamiento usual es que dicha velocidad disminuya en la medida que se acumula el etanol, debido a su efecto tóxico sobre el microorganismo. La mayor productividad volumétrica de etanol se alcanza en el medio YD ( $1,94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), valor éste que puede considerarse adecuado, teniendo en cuenta que los valores típicos observados en procesos discontinuos son del orden de  $1,8 - 2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$  (ICIDCA, 1990). La mayor productividad volumétrica de etanol en YD se corresponde con la mayor velocidad de crecimiento observada en este medio, lo que concuerda con el hecho de que el etanol es un metabolito primario, o sea, que su producción está asociada al crecimiento.

Las velocidades específicas de crecimiento y producción de etanol sufren una caída exponencial ( $R^2$  de la regresión = 0,98) (Fig. 17-B) cuando el etanol acumulado en el medio se encuentra por encima de  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cuando la concentración de etanol alcanza los  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  el crecimiento microbiano prácticamente cesa, pero la producción de etanol continúa hasta el total agotamiento del sustrato (Figs. 16 y 17-B). Esto concuerda con la relativamente baja tolerancia a etanol reportada para *K. marxianus* (O'Leary *et al.*, 1977; Ballesteros *et al.*, 1994; Hack y Marchant, 1998). Los acumulados de etanol al final de la fermentación en ambos medios (aprox.  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Tabla 15) son similares a aquellos reportados por Hack y



**Figura 17** Comportamiento de la producción de etanol en cultivo discontinuo a escala piloto. A) Cinética de la producción en los medios YD (□) y SBM (■). B) Efecto del etanol endógeno acumulado sobre las velocidades específicas de crecimiento (◇) y de producción de etanol (◆) durante la fermentación en medio YD.

Marchant (1998) para la cepa termotolerante *K. marxianus* IMB3. Sin embargo, los valores observados en esta experiencia para la velocidad específica de producción de etanol, cuando la concentración de este metabolito es mayor a  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , son muy superiores a los reportados por estos autores. La mejor eficiencia de la fermentación (95,1 %) se alcanza en el medio SBM, en correspondencia con la menor producción de biomasa observada.

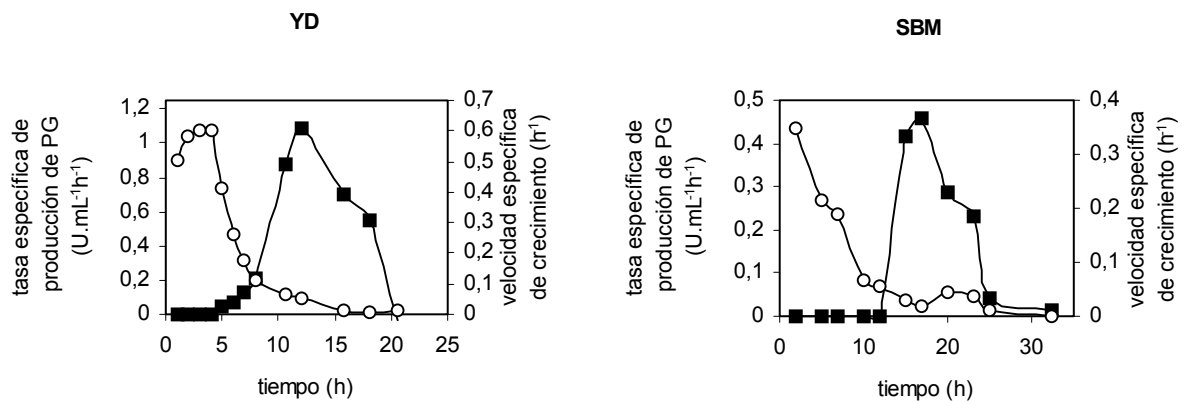
### 3.2.3.2. Producción de PG

Se observaron intervalos de latencia de cuatro y doce horas en la producción de PG en los medios YD y SBM, respectivamente (Fig. 16), en correspondencia con las latencias también presentadas en la producción de etanol (Fig. 17-A), ocurriendo luego un incremento continuo en la acumulación de PG hasta que se alcanza la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 16). Esta etapa de latencia inicial parece estar asociada a la existencia de ciertas condiciones aeróbicas en el cultivo, teniendo en cuenta que la densidad celular es

baja y que en las primeras cuatro horas de fermentación se establece un flujo de aire pequeño (0,15 vvm), con el fin de favorecer la formación de biomasa. Como consecuencia de esto, la síntesis de PG pudiera encontrarse parcialmente reprimida, de acuerdo con los resultados previamente discutidos al evaluar el efecto del oxígeno sobre este proceso.

Las curvas correspondientes a las velocidades específicas de crecimiento y de producción de PG respecto al tiempo de fermentación presentan una forma sigmoïdal (Fig. 18), con valores máximos para las 12 (YD) y 18 (SBM) horas, justo cuando el crecimiento específico es muy pequeño ( $0,02-0,05 \text{ h}^{-1}$ ) y el etanol acumulado es del orden de  $18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en ambos medios. De estos resultados se puede concluir que la velocidad máxima de síntesis de PG ocurre hacia el final de la fase de desaceleración del crecimiento. Schwan *et al.* (1996) encontraron que *K. marxianus* CCT 3172 secreta aproximadamente el 90 % del total de PG en la fase estacionaria temprana.

Aunque estos resultados no niegan la relación observada entre el crecimiento en condiciones de anaerobiosis y la inducción de la síntesis de PG, parece ser que, además, la



**Figura 18** Dependencia de la tasa específica de producción de PG (■) de la velocidad de crecimiento específica (○) en la fermentación discontinua. YD y SBM, medios de cultivo.

síntesis del enzima es reforzada bajo otras condiciones de estrés, tales como alta concentración de etanol y limitación de nutrientes, como ocurre en la fase de desaceleración del crecimiento. En consonancia con este resultado, Madhani *et al.* (1999) han demostrado que el gen *PGUI* de la PG de *S. cerevisiae* es regulado por la cascada de señalización MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la cual está implicada en la diferenciación filamentosa que tiene lugar en este microorganismo como respuesta a una limitación de nutrientes esenciales. Puig y Pérez-Ortín (2000) han descrito también la existencia de varios genes regulados por estrés en *S. cerevisiae*, los cuales muestran un pico de inducción cuando el cultivo se aproxima a la fase estacionaria durante el proceso de vinificación, pero caracterizados por poseer variados patrones de regulación.

El acumulado final de PG en el medio YD ( $17 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fue casi el doble de aquel en SBM, proporción similar a la observada en la producción de biomasa, de forma que los rendimientos enzima/biomasa resultaron similares (Tabla 15). Esto último sugiere que otro factor clave en la producción de PG, además de anaerobiosis y factores de estrés, es la concentración de células viables en el cultivo. La concentración final de enzima en YD obtenida en esta experiencia piloto es similar a la observada en estudios a escala de laboratorio usando medio mínimo y glucosa como fuente de carbono (Tabla 12), lo que indica que el cambio de escala no afecta los parámetros productivos de la cepa. Los mejores resultados corresponden siempre al medio YD, donde tiene lugar un crecimiento microbiano más activo (Fig. 16 y Tabla 15). La productividad volumétrica de PG casi duplica aquella alcanzada a nivel de laboratorio.



El hecho de que la velocidad máxima de síntesis del enzima tenga lugar hacia el final de la fase de desaceleración constituye una ventaja importante, al posibilitar el diseño de un proceso productivo de operación continua, dirigido a la co-producción de etanol y PG. Además, generalmente la tolerancia a etanol del microorganismo es mayor en cultivo continuo que en cultivo discontinuo.

Por otro lado, el uso de levaduras en la producción industrial de PG presentaría otras importantes ventajas, tales como, un tiempo de fermentación considerablemente menor y crecimiento unicelular, evitándose con esto último las dificultades que presentan las estructuras filamentosas en grandes tanques de cultivo (daño mecánico al micelio, elevada viscosidad del medio, distribución heterogénea de la biomasa, etc.). En la Tabla 16 se muestra una comparación donde se pueden evidenciar la superioridad de *K. marxianus* CCEBI 2011 con respecto a otras levaduras y mohos productores de PG.

**Tabla 16** Producción de PG en diferentes levaduras y mohos.

<b>Organismo</b>	<b>Producción (U·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tiempo de fermentación (h)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Aspergillus niger</i>	0,4	72	Maldonado y Navarro, 1995
<i>Aspergillus niger</i>	1,4	48	Garcés y Martínez, 1985
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2,12	240	Barnby <i>et al.</i> , 1990
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,3	48	Gainvors <i>et al.</i> , 2000
<i>Trichoderma reesei</i>	0,12	240	Markovič <i>et al.</i> , 1985
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	17	24	Este trabajo

### 3.2.3.3. Recobrado y caracterización del crudo enzimático

El crudo enzimático, procedente del cultivo a escala piloto en medio YD, se concentró cinco veces a través de un sistema industrial de membrana permitiendo una recuperación de

un 83 % de la actividad enzimática. Las pérdidas tuvieron lugar principalmente durante la etapa de ultrafiltración, lo cual pudo estar causado por desnaturalización irreversible del enzima debido a turbulencias en el fluido durante este proceso. Las especificaciones del producto son resumidas en la Tabla 17.

La débil intensidad del color y tonalidad amarilla del concentrado está acorde a los requerimientos habituales de estos aditivos en la industria de alimentos (Pariza y Foster, 1983). Del bajo contenido de ácidos grasos totales y volátiles tampoco es de esperar alteraciones en las cualidades sensoriales del alimento o bebida tratado enzimáticamente

**Tabla 17** Especificaciones del concentrado de PG obtenido de la fermentación a escala piloto en medio YD.

Parámetro	Valor <sup>a</sup>
Actividad enzimática (U·mL <sup>-1</sup> )	63 ± 4
Actividad específica (U·mg <sup>-1</sup> )	19,6 ± 0,6
Etanol (g·l <sup>-1</sup> )	39 ± 1
Acidez total <sup>b</sup> (g·l <sup>-1</sup> )	4,1 ± 0,1
Ácidos grasos volátiles <sup>b</sup> (mg·l <sup>-1</sup> )	290,1 ± 9,9
Color (tonalidad)	Amarillo
Color (intensidad) <sup>c</sup> (%)	72,7
pH	5,0

<sup>a</sup> Promedio ± desviación estándar de ocho determinaciones independientes

<sup>b</sup> Como ácido acético

<sup>c</sup> Como porcentaje de luminancia

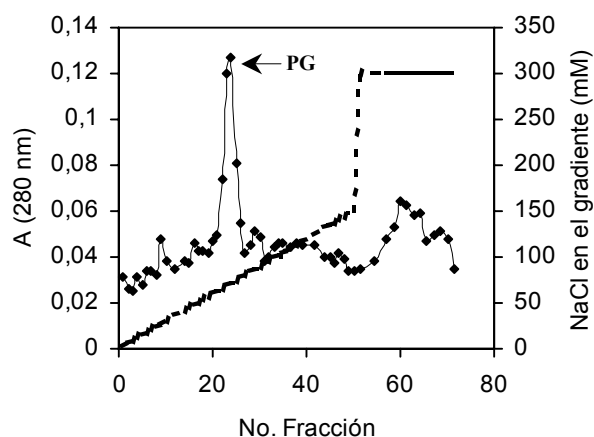
(Palacio, 1956). La presencia de concentraciones relativamente altas de etanol (5 % [v/v]) constituye, sin embargo, una cuestión importante a considerar. Un estudio sobre el potencial de aplicaciones de este enzima en el procesamiento de zumos de frutas y vegetales se presenta en el apartado A-II de la sección de Anexos.

### 3.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PG DE *K. marxianus* CCEBI 2011

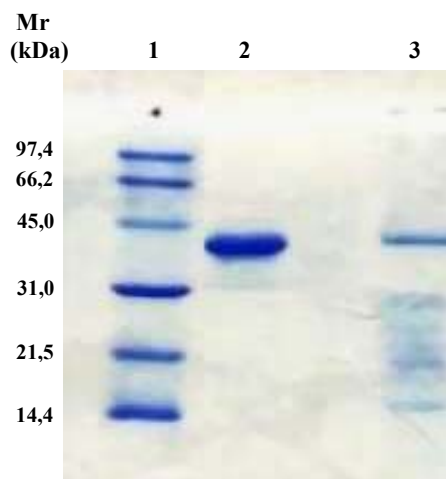
#### 3.3.1. Purificación y determinación de la masa molecular del enzima

El sobrenadante libre de células del medio de cultivo se concentró 10 veces por ultrafiltración a través de una membrana con límite de corte 10 kDa, observándose un incremento de 6,2 veces en la actividad específica, lo que sugiere la presencia en el medio de péptidos (<10 kDa) u otras moléculas pequeñas, interferentes en el ensayo de proteínas por el método de Lowry. Al aplicarse el crudo enzimático concentrado y equilibrado en tampón acetato 50 mM, pH 4,5, a la columna de SP – Sepharose Fast Flow toda la actividad enzimática quedó retenida a la matriz del intercambiador catiónico, eluyendo luego como un pico único entre los 65 y 80 mM de NaCl en el gradiente de fuerza iónica (Fig. 19).

La electroforesis SDS-PAGE de la muestra conformada por las fracciones pertenecientes al pico activo presenta una banda única, a la cual corresponde un peso molecular aproximado de 41,7 kDa (Fig. 20). Este resultado concuerda muy bien con los pesos moleculares reportados para otras PGs de *K. marxianus* y *S. cerevisiae*. Schwan *et al.* (1996) reportan la existencia de cuatro bandas PG-activas con Mr de 45, 42, 39 y 36 kDa que, según los propios autores, podrían pertenecer al mismo enzima con diferentes grados de glucosilación. También cuatro isoenzimas encontraron Barnby *et al.* (1990) en *K. marxianus* NCYC587, tres de ellas con Mr de 49,6 kDa y otra de 46,7 kDa. Según Šiekštelė *et al.* (1999), quienes clonaron y secuenciaron un gen de PG de una cepa salvaje de *K. marxianus* aislada de uvas, al polipéptido no glucosilado de este enzima corresponde un



**Figura 19** Perfil de elución de la corrida cromatográfica en SP-Sepharose FF. (♦), Absorbancia a 280 nm; (----), NaCl en el gradiente; PG, pico PG- positivo.



**Figura 20** SDS-PAGE del pico PG-activo de la cromatografía de intercambio iónico. Mr, masa molecular (kDa); (1), patrones de peso molecular (BioRad); (2), PG purificada; (3); crudo enzimático.

peso molecular de 34,7 kDa, presentando la molécula dos posibles sitios de glucosilación. De este modo, la PG purificada muestra una buena correspondencia con el gen de PG secuenciado. También resulta muy similar a la PG codificada por el gen *PGLI-1* de *S. cerevisiae*, la cual muestra una Mr de 42 kDa en SDS-PAGE (Gainvors *et al.*, 2000), a la PG I de *Aspergillus aculeatus* (Dalbøge, 1997) y a la PG de *Sclerotinia sclerotiorum* (Martel *et al.*, 1998).

Los resultados de las distintas etapas de purificación del enzima se resumen en la Tabla 18. Existe una aparente contradicción entre el relativamente bajo grado de purificación obtenido (9,2 veces) y la banda única observada en la corrida electroforética. Sin embargo, se ha reportado que la PG es el componente proteico mayoritario en el fluido extracelular de *K. marxianus*, representando alrededor del 85 % de la proteína total secretada al medio

(Schwan *et al.*, 1996), lo cual se corresponde muy bien con lo observado en la SDS-PAGE para el crudo enzimático (Fig. 20), donde la banda de mayor tamaño coincide con la del enzima purificado. La pérdida de actividad específica durante las etapas de diálisis (ver Fig. 4, sección Materiales y Métodos), es otra de las causas que puede contribuir a que el grado de purificación observado sea relativamente bajo. Esto último podría explicar también el recobrado final alcanzado, de un 42,6 %. Como se verá más adelante, para pHs en el entorno de 4,5 o menores, la estabilidad del enzima comienza a comprometerse.

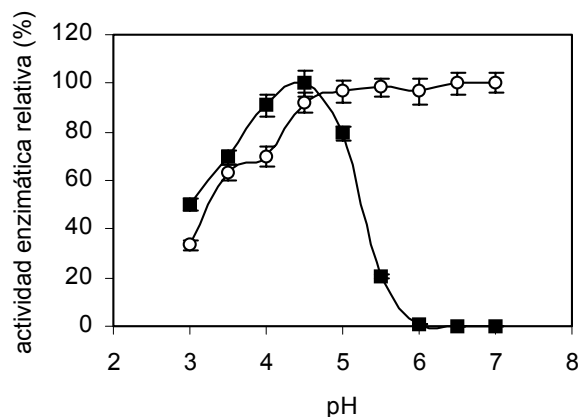
El proceso de purificación utilizado reúne como ventajas su sencillez, su efectividad para concentrar y purificar el enzima, obteniéndose un preparado con elevada actividad específica. Por último, el pH del proceso es similar al usado en la fermentación, lo cual contribuye a simplificar la integración de las etapas de producción y purificación, aspecto este de gran importancia práctica.

**Tabla 18** Resumen de la purificación de la PG de *K. marxianus* CCEBI 2011.

<b>Etapas de purificación</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Proteínas totales (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Actividad enzimática (<math>\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Actividad específica (<math>\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>Purificación (número de veces)</b>	<b>Recobrado (%)</b>
Fluido extracelular	250	121,3	2,89	23,8	1	100
Concentración y diálisis	24	139,0	22,3	160,4	6,7	74,1
Intercambio iónico + diálisis	5,5	255,7	56,0	219,0	9,2	42,6

### 3.3.2. Influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

El enzima purificado se muestra activo para un rango de pH de 3,0 – 5,0 con un pH óptimo de 4,5 (Fig. 21). A pH 3,0 presenta un 50 % de la actividad máxima, siendo completamente inactivo para pHs mayores que 6,0 (Fig. 21), de modo similar a otras PGs de levadura (Luh



**Figura 21** Efecto del pH sobre la actividad (■) y estabilidad (○) del enzima. La estabilidad se determina luego de 24 h de incubación a 4 °C. Barras de error indican la desviación estándar de cinco determinaciones independientes.

y Phaff, 1954; Lim *et al.*, 1980; Call *et al.*, 1985; Blanco *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1997b), aunque el rango de pH para el cual es activo el enzima es mucho más amplio que aquellos reportados previamente para PGs de mohos, levadura y plantas. Esta elevada actividad a bajos pHs (3,0 – 4,0) resulta de mucho interés, teniendo en cuenta sus posibles aplicaciones en la industria procesadora de

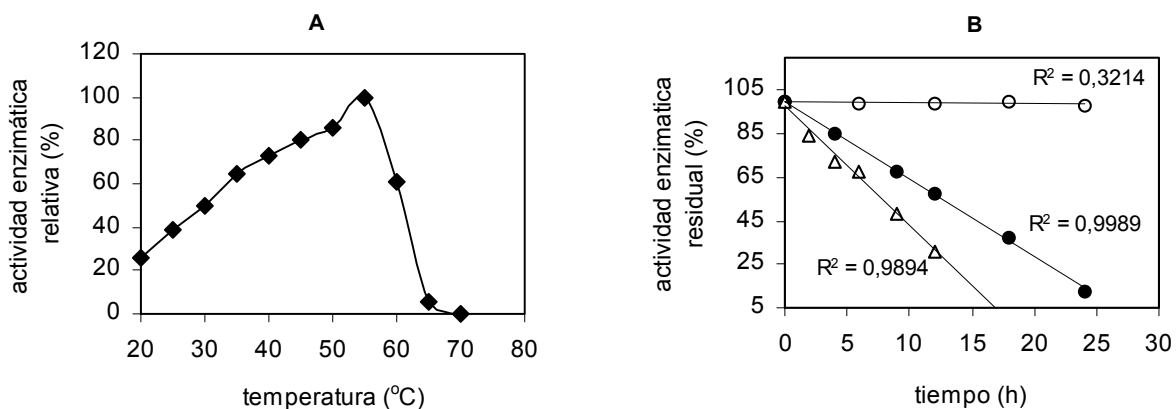
zumos de frutas, donde las condiciones de acidez son habituales. Sin embargo, después de 24 horas de exposición a pHs entre 3,0 y 4,0 se observan pérdidas irreversibles de actividad, siendo éstas mayores a medida que disminuye el pH (Fig. 21), con un 33 % de actividad residual a pH 3,0. Para pHs de 5,0 – 7,0 el enzima conserva toda su actividad en 24 horas.

La actividad del enzima se incrementa de modo prácticamente lineal entre 20 y 55 °C, cayendo bruscamente más allá de esa temperatura hasta no detectarse actividad alguna a 70 °C (Fig. 22-A). Este valor de temperatura óptima de 55 °C es superior a los reportadas por Schwan *et al.* (1996) y Blanco *et al.* (1994) para PGs de *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, respectivamente, aunque similar a aquella encontrada para la PG de una cepa de *K. fragilis* aislada de la fermentación del cacao (Sánchez *et al.*, 1984). A 40 °C no se observan pérdidas detectables de actividad enzimática tras 24 horas de incubación, en tanto existe una relativa estabilidad a 50 y 55 °C, conservándose el 50 % de la actividad después de 14 y

8,7 horas de exposición a estas temperaturas, respectivamente (Fig. 22-B). A 60 °C el enzima se inactiva completamente en 6 minutos.

Como puede apreciarse en la Figura 22-B, la desnaturalización térmica del enzima sigue una cinética de orden cero. De la pendiente de las rectas de regresión, correspondientes a las curvas de desnaturalización del enzima a las temperaturas examinadas, se obtuvieron las constantes de velocidad del proceso, con las que se calculó, mediante la ecuación de Arrhenius, la energía de activación correspondiente a la desnaturalización térmica, la que resultó ser de 498,5 kJ·mol<sup>-1</sup>.

Estos resultados permiten clasificar a la PG de esta cepa como moderadamente termoestable, lo cual concuerda con el carácter termotolerante del microorganismo (crece óptimamente a 42 °C). El alto valor de la energía de activación correspondiente a la desnaturalización térmica del enzima, también es indicativo de que pequeñas variaciones de temperatura afectarán sensiblemente su estabilidad.

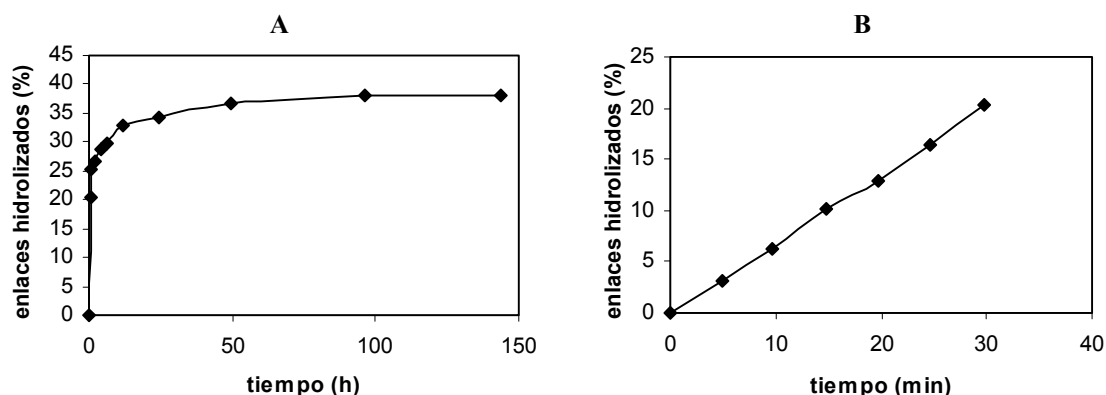


**Figura 22** Influencia de la temperatura sobre la actividad (A) y estabilidad (B) del enzima. (○), 40 °C; (●), 50 °C; (△), 55 °C.

### 3.3.3. Hidrólisis enzimática del PGA

Como puede observarse en la Figura 23-A, la reacción de hidrólisis enzimática del PGA transcurre con gran rapidez hasta alcanzarse aproximadamente un 20 % de hidrólisis, disminuyendo luego de forma moderada y continua hasta el 33 % de hidrólisis, momento a partir del cual la reacción transcurre con extrema lentitud, cesando cuando alrededor del 38 % de los enlaces han sido escindidos. Aunque la forma hiperbólica de la curva y la presencia de tres fases es coincidente con lo reportado tempranamente por Luh y Phaff (1954) en sus trabajos sobre la PG de *Saccharomyces fragilis* (syn. *K. marxianus*), existen diferencias en cuanto al inicio y duración de las fases y a la terminación de la reacción enzimática. Al hidrolizado enzimático total corresponde un grado de polimerización de 2,63, lo que corresponde a una mezcla de dímero-trímero en una proporción aproximada de 1:2. De estos resultados se puede deducir que el enzima no debe ser activo sobre el trímero.

En la Fig. 23-B puede verse que la reacción transcurre a velocidad constante y máxima hasta que se ha alcanzado un 20 % de progreso de la reacción. La disminución de la



**Figura 23** Cinética de la hidrólisis enzimática del PGA. Actividad PG total:  $0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , concentración de PGA 2 % (m/v). (A) ciclo completo de reacción; (B) fase lineal rápida.



velocidad de reacción para grados de hidrólisis mayores al 20 % (Fig. 23-A) no puede ser atribuida a la pérdida de actividad enzimática en el curso de la reacción, ya que no se observaron cambios apreciables de actividad bajo estas condiciones en 14 días (dato no mostrado).

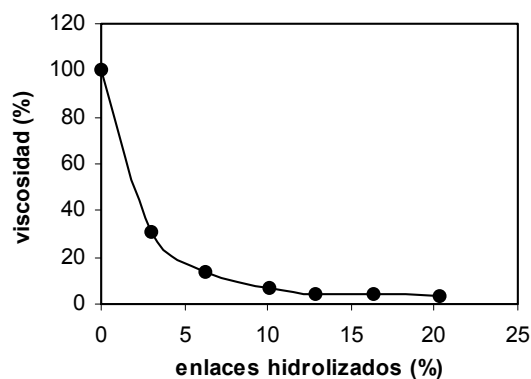
**Tabla 19** Efecto de los productos de hidrólisis del PGA sobre la actividad del enzima.

Concentración del hidrolizado ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	Actividad enzimática relativa (%)
0	100
40	126
200	103

<sup>a</sup> Se asume que la forma molecular dominante en el hidrolizado es el ácido trigalacturónico

Tampoco se observó inhibición de la actividad por los productos de reacción; por el contrario, la presencia de los productos de la hidrólisis enzimática total del PGA (144 h de reacción) a una concentración de 40  $\mu\text{M}$  provoca un incremento significativo ( $p < 0,05$ ; prueba de t-Student) en la actividad del enzima y a 200  $\mu\text{M}$  no se observa afectación de la actividad (Tabla 19). Todo lo anterior apunta, a que la causa de la disminución en la velocidad de reacción a medida que progresa la hidrólisis, radica en una disminución de la eficiencia catalítica asociada a la disminución del grado de polimerización del sustrato, fenómeno éste observado también para la endo-PG de *Trichoderma reesei* (Markovič *et al.*, 1985). Fragmentos pépticos de grado de polimerización mayores que cinco (correspondientes a un 20 % de hidrólisis o menos), parecen ser el sustrato natural de la PG de *K. marxianus*.

Con vistas a elucidar el modo de acción de la PG sobre el PGA se siguió el cambio de viscosidad del sustrato durante el curso de la reacción. Durante la hidrólisis enzimática tiene lugar un brusco descenso de la viscosidad en los primeros instantes de la reacción, reduciéndose en un 50 % cuando apenas un 3 % de los enlaces ha sido escindido (Fig. 24).



**Figura 24** Cambios de viscosidad durante la hidrólisis enzimática del PGA. Concentración de sustrato 0,5 % (m/v), pH 5,0; 37 °C.

Este resultado se corresponde con un ataque al azar sobre la cadena de PGA, lo que permite clasificar al enzima estudiado como una *endoplignalacturonasa* típica, de modo similar como ocurre con la mayoría de las PGs de levadura conocidas (Blanco *et al.*, 1999).

El carácter *endo* resulta muy favorable con vistas al potencial empleo del enzima en la obtención de oligogalacturónidos bioactivos, de los cuales se espera resultados muy beneficiosos en sus aplicaciones a la agricultura (Cabrera, 1999) y como posibles prebióticos (Lang y Dörnenburg, 2000). Además, la endo-PG es la actividad pectinolítica más importante en los procesos de remoción de pectina a escala industrial.

### 3.3.4. Influencia del DE del sustrato sobre la actividad enzimática

Todo el estudio anterior se ha realizado para el sustrato no esterificado (PGA). Sin embargo, las aplicaciones prácticas del enzima dependerán en mayor medida de su eficacia para depolimerizar pectinas naturales, cuyos DEs, masas moleculares, contenidos de azúcares neutros y grados de ramificación varían considerablemente de una fuente a otra. Por esta razón se seleccionaron cuatro sustratos: PGA y tres pectinas comerciales, cuyas principales características se reseñan en la Tabla 20, para evaluar la influencia del grado de esterificación del sustrato sobre la eficacia catalítica del enzima.

En todos los casos los valores de DE, masa molecular y contenido de ácido galacturónico encontrados para los sustratos se corresponden con las especificaciones de los fabricantes. De modo general, los mayores valores en el peso molecular corresponden a los polímeros con mayor DE. La disminución de la masa molecular con el grado de esterificación se explica por el hecho de que la desesterificación parcial de las pectinas naturales se realiza mediante saponificación alcalina, lo cual provoca una moderada degradación de la macromolécula.

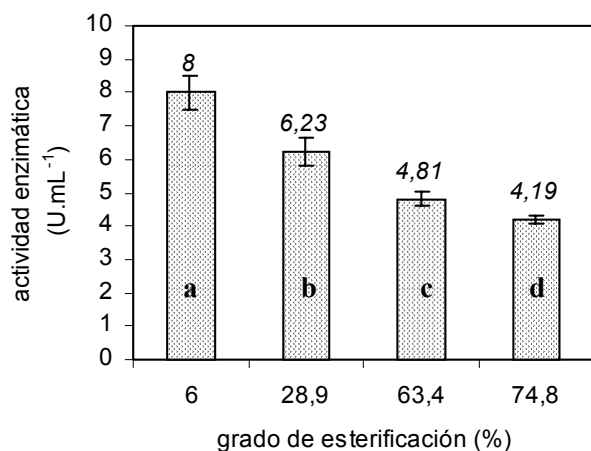
**Tabla 20** Caracterización de las sustancias pécticas usadas como sustratos en los ensayos enzimáticos<sup>a</sup>.

Sustrato	M <sub>r</sub> (g·mol <sup>-1</sup> )	AGU (%)	DE (%)
PGA <sup>b</sup>	16 000 ± 500	87,2 ± 1,4	6,0 ± 0,8
Pectina de manzana LM	25 700 ± 1 000	68,6 ± 1,2	28,9 ± 3,5
Pectina cítrica	65 600 ± 2 600	79,0 ± 1,2	63,4 ± 5,7
Pectina de manzana HM	48 700 ± 1 900	70,2 ± 1,5	74,8 ± 6,1

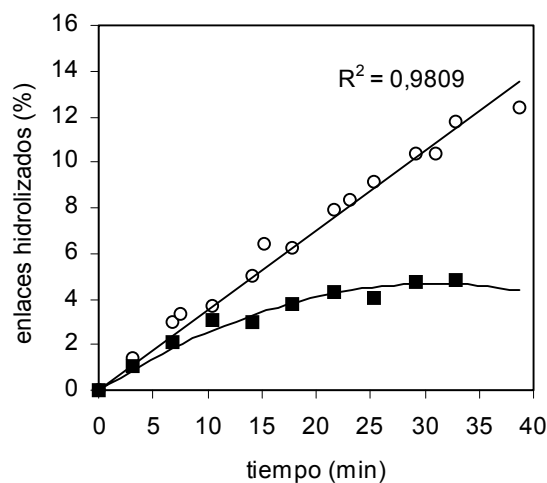
<sup>a</sup> Leyenda: M<sub>r</sub>, Masa molecular promedio viscosimétrica; AGU, contenido de ácido galacturónico, como porcentaje en masa; DE, grado de esterificación

<sup>b</sup> Caracterizado por Cabrera, 1999

La actividad PG estimada del incremento del poder reductor del sustrato, denotada en este experimento como PG total, disminuye conforme se incrementa el grado de esterificación del sustrato (Fig. 25). Similar comportamiento también ha sido reportado para otras PGs de levadura (Barnby *et al.*, 1990; Blanco, 1997). Aunque en este estudio la actividad observada sobre el sustrato de mayor DE resulta muy superior a lo reportado por estos autores. Una observación interesante es que la disminución en la actividad PG total guarda una buena correlación lineal ( $r^2 = 0,98$ ) con el incremento de DE, lo cual puede resultar muy útil al dosificar el enzima para determinadas aplicaciones prácticas.



**Figura 25** Dependencia de la actividad PG total del grado de esterificación del sustrato. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan).



**Figura 26** Progreso de la reacción de hidrólisis enzimática en PGA (○) y pectina de manzana HM (■). Concentración de sustrato 0,5 % (m/v); pH 5,0, 37 °C.

La cinética de la hidrólisis enzimática de la pectina de manzana HM (DE 75 %) difiere considerablemente de la del PGA (Fig. 26). En el caso de la pectina, la reacción no transcurre de modo lineal, sino que disminuye progresivamente su velocidad desde el inicio mismo de la reacción, llegando a ser muy lenta cuando apenas se ha alcanzado un 5 % de hidrólisis. Es conocida la incapacidad de ciertas PGs de levadura para hidrolizar enlaces glucosídicos situados entre residuos esterificados de ácido galacturónico. Las pectinas naturales están esterificadas al azar, conteniendo bloques de regiones esterificadas y no esterificadas (Daas *et al.*, 2000), por lo que es de esperar que el blanco de acción de las PGs corresponda a aquellas regiones no esterificadas del esqueleto de poligalacturonano. Estas regiones disminuyen en número y talla a medida que se incrementa el DE, lo que concuerda con la disminución observada en la actividad PG total conforme se hace mayor el DE (Fig. 25). Por otro lado, la disminución progresiva de la velocidad de reacción según avanza

(Fig. 26) puede explicarse sobre la base de la rápida disminución del tamaño de los bloques no esterificados. Como ya se discutió con anterioridad, este enzima sufre una acentuada disminución en su eficacia catalítica cuando el grado de polimerización del sustrato es inferior a cinco.

Al determinar las constantes cinéticas de la PG de *K. marxianus* para PGA y pectina (DE 75 %), se encontró que  $k_{cat}$  y  $K_M$  son 1,35 y más de 20 veces superiores, respectivamente, para la pectina (Tabla 21). Esto conduce a que la eficiencia catalítica, dada por  $k_{cat}/K_M$ , sea marcadamente superior (unas cinco veces) para el sustrato no esterificado (Tabla 21). El valor de  $K_M$  para PGA ( $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) es similar al reportado para las PGs de *Saccharomyces fragilis* (Lim *et al.*, 1980; Blanco *et al.*, 1997a), *S. chevalieri* (Sánchez, 1984), *S. pastorianus* (Astapovich y Ryabaya, 1997) y *C. albidus* (Federici, 1985). No se encontraron reportes en la literatura sobre valores de  $K_M$  para PGs de levadura actuando sobre pectinas HM. Los resultados aquí presentados confirman que las PGs de levadura catalizan preferentemente la hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -(1,4)-glucosídicos situados entre residuos no esterificados de ácido galacturónico.

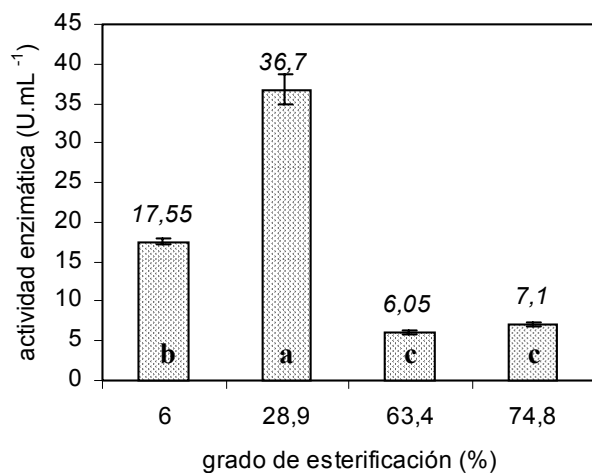
**Tabla 21** Constantes cinéticas para la PG de *K. marxianus* sobre PGA y pectina de alto grado de esterificación.

Sustrato	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_M$		$k_{cat}/K_M$ $\times 10^6$ ( $\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ )
		( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	
PGA	231	0,4	25	9,24
Pectina (de manzana, DE 75 %) <sup>b</sup>	312	8,6	177	1,76

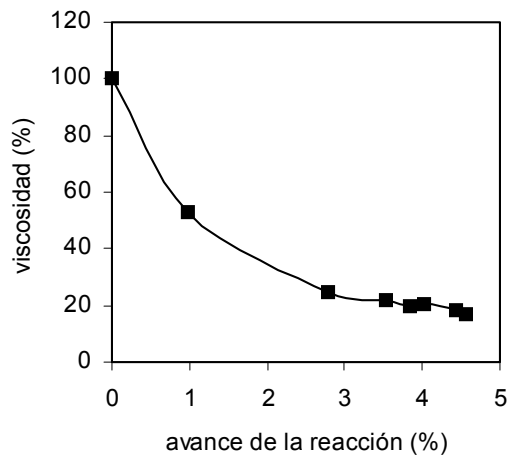
<sup>a</sup> Como ácido anhidrogalacturónico

<sup>b</sup> DE, grado de esterificación

En cuanto a la influencia del grado de esterificación sobre la actividad PG viscosimétrica, expresada en unidades arbitrarias referidas al cambio en la fluidez específica, se observa



**Figura 27** Actividad endo-PG para diferentes grados de esterificación del sustrato. Sustratos al 0,5 % (m/v), 37 °C, pH 5,0. Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan) se representan por letras diferentes.



**Figura 28** Cambios de viscosidad durante la hidrólisis enzimática de la pectina de manzana HM (DE 75 %). Concentración de sustrato 0,5 % (m/v), pH 5,0, 37 °C.

que el máximo valor corresponde a la pectina de manzana LM, seguido del PGA y finalmente la pectina cítrica y la pectina de manzana HM, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan) entre estas dos últimas (Fig. 27). Esta aparente anomalía en la actividad sobre pectina de manzana LM, respecto a lo observado para la PG total, revela la compleja naturaleza estructural de las sustancias pécticas. La masa, estructura molecular y comportamiento hidrodinámico de los productos de hidrólisis de la pectina y, por ende, la viscosidad de estas soluciones, variará de modo muy diferente dependiendo de la naturaleza de la molécula de pectina.

No obstante, esta disminución de la actividad PG sobre sustratos esterificados, observada tanto en la determinación viscosimétrica como en la estimación del incremento del poder reductor del sustrato, no significa necesariamente una disminución en la eficacia práctica del enzima. La Figura 28 muestra como la viscosidad de una solución de pectina de

manzana HM disminuye bruscamente, de modo similar a como ocurre en el caso del PGA, en los primeros instantes de la reacción enzimática, lo que ratifica el carácter *endo* de esta PG y avala favorablemente su aplicación al procesamiento de zumos de frutas, vegetales y otros materiales ricos en pectina. En el apartado A-II de la sección de Anexos, se muestran los resultados obtenidos al examinar el potencial de aplicaciones del enzima.

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



## CONCLUSIONES

1. Se aislaron e identificaron seis cepas de levaduras pectinolíticas a partir de frutos y residuales del beneficio húmedo del café, pertenecientes a las especies *Hansenula jadinii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Debaryomyces vanriijiae*; una de las cuales, la *K. marxianus* CCEBI 2011, presenta una actividad notablemente alta.
2. La actividad pectinolítica en las levaduras que habitan frutos y residuales del beneficio húmedo del café está asociada a aquellas estirpes mejor dotadas para crecer en cultivo limitado de oxígeno, lo que posibilita el establecimiento de estrategias de aislamiento selectivo basadas en esta propiedad.
3. La síntesis de PG en *K. marxianus* CCEBI 2011 es asociada al crecimiento, regulada negativamente por oxígeno, no se afecta en presencia de sustancias pécticas y no sufre del fenómeno de represión catabólica, aún a concentraciones tan altas del catabolito como  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
4. Los mejores niveles de producción de PG se obtienen en presencia de glucosa  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  como fuente de carbono, en cultivo limitado de oxígeno a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .
5. La producción simultánea de alcohol y PG por esta cepa es un proceso viable técnicamente y susceptible de ser optimizado.

6. La PG de *K. marxianus* CCEBI 2011 puede purificarse hasta homogeneidad en SDS-PAGE, con altos niveles de actividad específica y recobrado, en un procedimiento a simple etapa de cromatografía de intercambio iónico.
7. La PG de esta cepa muestra una banda única en SDS-PAGE, a la cual corresponde una masa molecular de 41,7 kDa y clasifica como una endo-PG típica, moderadamente termoestable y activa a pHs ácidos.
8. La eficiencia catalítica del enzima disminuye con el incremento del grado de esterificación del sustrato debido a un incremento en el valor de  $K_M$ , e igualmente decrece de modo considerable cuando el grado de polimerización del sustrato es inferior a cinco.

## **RECOMENDACIONES**

1. Estudiar la producción simultánea de PG y alcohol en cultivo continuo y modelar el sistema.
2. Clonar el gen de PG y estudiar sus secuencias reguladoras.
3. Emplear el enriquecimiento en cultivo limitado de oxígeno como metodología para el aislamiento de levaduras pectinolíticas.
4. Utilizar la PG de esta levadura en la preparación de oligogalacturónidos y otros derivados bioactivos de la pectina.
5. Utilizar la cepa objeto de estudio en procesos dirigidos al aprovechamiento de residuos agrícolas pectináceos, como los generados por el beneficio húmedo del café y la industria procesadora de cítricos.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams MR, Dougan J (1987) Waste products. En: Clarke RJ, Macrae R (eds) Coffee, vol. 2: Technology. Elsevier, Londres, 257-291.
2. Agate AD, Bhat JV (1966) Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. **Appl. Microbiol.** 14, 256-260.
3. Albersheim P (1968) Pectin lyase from fungi. **Methods Enzymol.** 8, 628-635.
4. Adlercreutz P, Iborra JL, Schmidt E, Pedersen S (1994) Applications (Cap. 3). En: Cabral JMS, Best D, Boross L, Tramper J (eds), Applied biocatalysis. Harwood Academic Publishers, Suiza, pp. 109-156.
5. Alkorta I, Garbisu C, Llama MJ, Serra JL (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochem.** 33, 21-28.
6. APHA (American Public Health Association), American Water Works Association, Water Environment Federation (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20<sup>a</sup> edn. American Public Health Association, Washington, D.C.
7. Astapovich NI, Ryabaya NE (1997) Isolation and characterisation of polygalacturonase from *Saccharomyces pastorianus*. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol.** 33, 287-291.
8. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (1992) Current protocols in molecular biology, 2<sup>a</sup> edn. Harvard Medical School 1.6, pp. 1-17.

9. Ballesteros I, Olivia JM, Carrasco JC, Ballesteros M (1994) Effect of media supplementation on ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation process. **Appl. Biochem. Biotech.** 45/46: 283-294
10. Barnby FM, Morpeth FF, Pyle DL (1990) Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterization of the enzyme. **Enzyme Microb. Technol.** 12, 891-897.
11. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1983) Yeasts: Characteristics and identification, 1<sup>a</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
12. Beldman G, Rombouts FM, Voragen AGJ, Pilnik W (1984) Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 503-507
13. Bell TA, Etchells JL (1956) Pectin hydrolysis by certain salt-tolerant yeast. **Appl. Microbiol.** 4, 196-202.
14. Belloch C, Barrio E, García MD, Querol A (1998) Inter.- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. **Yeast** 14, 1341-1354.
15. Belloch C, Fernández-Espinar T, Querol A, García MD, Barrio E (2002) An analysis of inter.- and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon. **Yeast** 19, 257-268.
16. Belloch C, Querol A, García MD, Barrio E (2000) Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-*c* oxidase II gene. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 50, 405-416.

17. Bergey DR, Orozco-Cárdenas M, de Moura DS, Ryan CA (1999) A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96, 1756-1760.
18. Beuchat LR (1983) Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. **J. Food Protect.** 46, 135-141.
19. Biely P, Slavikova E (1994) New search for pectolytic yeasts. **Folia Microbiol.** 39, 485-488.
20. Blanco P (1997) Caracterización bioquímica y genética de las poligalacturonasas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis Doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
21. Blanco P, Sieiro C, Díaz A, Villa TG (1994) Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Can. J. Microbiol.** 40, 974-977.
22. Blanco P, Sieiro C, Díaz A, Villa TG (1997a) Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13, 711-712.
23. Blanco P, Sieiro C, Reboredo NM, Villa TG (1997b) Genetic determination of polygalacturonase production in wild-type and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.** 167, 284-288.
24. Blanco P, Sieiro C, Villa TG (1999) Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.** 175, 1-9.
25. Boccas F, Roussos S, Gutiérrez M, Serrano L, Viniegra GG (1994) Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal

- isolate of high potency by a simple three-step screening technique. **J. Food Sci. Technol.** 31, 22-26.
26. Bonghi C, Rascio N, Ramina A, Casadoro G (1992) Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. **Plant Mol. Biol.** 20, 839-848.
27. Brown MR, Ough CS (1981) A comparison of activity and effects of two commercial pectic enzyme preparations on white grape musts and wines. **Am. J. Vitic. Enol.** 32, 272-276.
28. Bureau of Sugar Experiment Stations (1961) Laboratory manual for Queensland sugar mills, 4<sup>a</sup> edn. Division of Mill Technology, Brisbane, Australia.
29. Bussink HJ, Buxton FP, Visser J (1991) Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigensis* genes encoding polygalacturonase II. **Curr. Genet.** 19, 467-474.
30. Cabrera JC (1999) Obtención de una mezcla de (1→4)- $\alpha$ -D-oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria cítrica. *Tesis Doctoral*, Hormaza JV, Igartuburu JM (tutores), Universidad Agraria de La Habana/ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba.
31. Call HP, Walter J, Emeis CC (1985) Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. **J. Food Biochem.** 9, 325-348.
32. Carbonell R, Vilanova M (1952) Beneficiado rápido y eficiente del café mediante el uso de soda cáustica. En: Boletín Técnico, No. 13. Centro Nacional de Agronomía, Ministerio de Agricultura y Ganadería, El Salvador, pp. 65-66.



33. Carle GF, Olson MV (1985) An electrophoretic karyotype for yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82, 3756-3760.
34. Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.** 3, 1-30.
35. Carvalho-Silva M, Spencer-Martins I (1990) Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 57, 77-81.
36. Cavaco-Paulo A (1998) Processing textile fibres with enzymes: an overview. En: Eriksson K.-EL, Cavaco-Paulo A (eds) *Enzyme applications in fiber processing*, Cap. 15, ACS Symposium Series 687. American Chemical Society, Washington, D.C, pp. 180-189.
37. Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK (1995) Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **Appl. Environ. Microbiol.** 61, 1959-67.
38. Colquhoun IJ, Ralet MC, Thibault JF, Faulds CB, Williamson G (1994) Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 263, 243-256.
39. Cooney CL, Makiguchi N (1977) An assessment of single cell protein from methanol-growth yeast. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 7, 65-76.

40. Daas PJ, Voragen AG, Schols HA (2000) Characterization of non-esterified galacturonic acid sequences in pectin with endopoligalacturonase. **Carbohydr. Res.** 326, 120-129.
41. Dalbøge H (1997) Expression cloning of fungal enzyme genes; novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. **FEMS Microbiol. Rev.** 21, 29-42.
42. Dekker RFH, Richards GN (1972) Determination of pectic substances in plant material. **J. Sci. Food Agric.** 23, 475-483.
43. Destruelle M, Holzer H, Klionsky DJ (1994) Identification and characterization of a novel gene: the *YGPI* gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation. **Mol. Cell. Biol.** 14, 2740-2754.
44. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science** 278, 680-686.
45. De Vries RP, Visser J (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 65, 497-522.
46. Dinnella C, Stagni A, Lanzarini G, Alfani F, Gallifuoco A (1996) Pectin degradation in UF-membrane reactors with commercial pectinases. En: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectin and pectinases. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 439-449.
47. Droillard MJ, Guclu J, Le Caer JP, Mathieu Y, Guern J, Lauriere C (1997) Identification of calveticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells. **Planta** 202, 341-348.
48. Dubois M, Guilles K, Hamilton JK, Robers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.** 28, 350-356.

49. Emslie D, Stanley G, Fraser S, Chambers P (1999) Time-course differential display to identify ethanol stress induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** 35, 385.
50. Federici F (1985) Production, purification and partial characterisation of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. **Antonie van Leeuwenhoek** 51, 139-150.
51. Fogarty WM, Kelly CT (1983) Pectic Enzymes. En: Fogarty WM (ed) Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science Publishers, Londres, pp. 131-182.
52. Frank HA, Lum NA, Dela Cruz AS (1965) Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. **Appl. Microbiol.** 13, 201-207.
53. Gainvors A, Belarbi A (1995) Detection method for polygalacturonase-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 11, 1493-1499.
54. Gainvors A, Belarbi A (1996) Influence of glucose and polygalacturonic acid on the synthesis and activity of the polygalacturonase from the yeast strain SCPP. En: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectin and pectinases. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 739-746.
55. Gainvors A, Nedjaoum N, Gognies S, Muzart M, Nedjma M, Belarbi A (2000) Purification and characterization of acidic endopolygalacturonase encoded by the *PGL1-1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters** 183, 131-135.
56. Garcés N, Martínez J (1985) Estudios para la obtención de pectinasa a partir de *Aspergillus niger*. II Cultivo sumergido. En: Desarrollo de enzimas fúngicas para la

- industria, Boletín Técnico, No. 22, Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, La Habana, Cuba, pp. 36-43.
57. García R, Arriola D, de Arriola MC, de Porres E, Rolz C (1991) Characterization of coffee pectin. **Lebensm. –Wiss. U. –Technol.** 24, 125-129.
58. García-Garibay M, Gómez-Ruiz L, Bárzana E (1987) Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnol. Lett.** 9, 411-416.
59. Glacet A, Letoumeau F, Leveque P, Villa P (1985) Kinetic-study of nitrate inhibition during alcoholic fermentation of beet molasses. **Biotechnol. Lett.** 7, 47-52.
60. Gognies S, Gainvors A, Aigle M, Belarbi A (1999) Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (*PGLI*). **Yeast** 15, 11-22.
61. Gognies S, Simon G, Belarbi A (2001) Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene *PGUI* in *Saccharomyces*. **Yeast** 18, 423-432.
62. González-Blanco P, Saucedo-Castañeda G, Viniegra-González G (1990) Protein enrichment of sugar cane by-products using solid-state cultures of *Aspergillus terreus*. **J. Ferment. Bioeng.** 70, 351-354.
63. Gough S, Flynn O, Hack CJ, Marchant R (1996) Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimisation of media supplements. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 46, 187-190.
64. Hack CJ, Marchant R (1998) Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. **J. Ind. Microbiol. Biot.** 20, 323-327.

65. Hadfield KA, Rose JKC, Yaver DS, Berka RM, Bennett AB (1998) Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. **Plant Physiol.** 117, 363-373.
66. Hahn-Hägerdal B, Larsson M, Mattiasson B (1982) Shift in metabolism towards ethanol production in *S. cerevisiae* using alterations of the physical chemical microenvironment. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 12, 199-202.
67. Hensing M, Vrouwenvelder H, Hellinga C, Baartmans R, van Dijken H (1994) Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42, 516-521.
68. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST (1994). En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>a</sup> edn. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, p. 787.
69. ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar) (1990) Manual de los derivados de la caña de azúcar, 2<sup>a</sup> edn. GEPLACEA, México, DF; México.
70. Jonas R (2000) Production of industrially important metabolites by microorganisms. *Conferencia plenaria*, Congreso "Perspectivas y Limitaciones de la Biotecnología en Países en Desarrollo", San José, Costa Rica, Enero 24-28, 2000.
71. Jones KL, Jones SE (1984) Fermentations involved in the production of cocoa, coffee and tea. En: Bushell ME (ed) Progress in industrial microbiology, vol. 19. Elsevier, Amsterdam, pp. 411-456.
72. Jones RP, Pamment N, Greenfield PF (1981) Alcohol fermentation by yeasts. The effect of environmental and other variables. **Process Biochem.** 16, 42-45.

73. Kiyohara H, Takemoto N, Zhao J-F, Kawamura H, Yamada H (1996) Pectic polysaccharide from roots of *Glycyrrhiza uralensis*: Possible contribution of neutral oligosaccharide in the galacturonase-resistant region to anti-complementary and mitogenic activities. En: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectin and pectinases. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 673-678.
74. Laing E, Pretorius IS (1993) Co-expression of an *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase-encoding gene (*pelE*) and an *E. carotovora* polygalacturonase-encoding gene (*peh1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 75, 149-158.
75. Lang C, Dörnenburg H (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53, 366-375.
76. Larsson S, Cassland P, Jönsson LJ (2001) Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. **Appl. Environ. Microbiol.** 67, 1163-1170.
77. Lee JD, Komagata K (1980) Taxonomic study of metanol-assimilating yeasts. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 26, 133-158.
78. Lim J, Yamasaki Y, Suzuki Y, Ozawa J (1980) Multiple forms of endopolygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. **Agric. Biol. Chem.** 44, 473-480.
79. Llorente B, Malpertuy A, Blandin G, Artiguenave F, Wincker P, Dujon B (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetaceous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **FEBS Lett.** 487, 71-75.

80. Louis EJ (1998) Whole chromosome analysis. En: Brown AJP, Tuite M (eds) *Methods in Microbiology* vol. 26 (Yeast gene analysis), cap. 2. Academic Press, Londres, pp. 15-31.
81. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin-phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275
82. Luh BS, Phaff HJ (1951) Studies on polygalacturonase of certain yeast. **Arch. Biochem. Biophys.** 33, 213-227.
83. Luh BS, Phaff HJ (1954) Properties of yeast polygalacturonase. **Arch. Biochem. Biophys.** 48, 23-37.
84. Madhani HD, Galitski T, Lander ES, Fink GR (1999) Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signalling mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96, 12530-12535.
85. Maldonado MC, Navarro AR (1995) Pectinases production by *Aspergillus niger* using industrial by-products. **Microbiologie-Aliments-Nutrition** 13, 369-373.
86. Markovič O, Slezárik A, Labudová I (1985) Purification and characterization of pectinesterase and polygalacturonase from *Trichoderma reesei*. **FEMS Microbiol. Lett.** 27, 267-271.
87. Martel MB, Létoublon R, Fèvre M (1998) Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 158, 133-138.
88. McKay A (1990) Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett. Appl. Microbiol.** 11, 41-44.

89. Meakin PJ, Roberts JA (1991) Anatomical and biochemical changes associated with the induction of oilseed rape (*Brassica napus*) pod dehiscence by *Dasineura brassicae* (Winn.) **Ann. Bot.** 67, 193-197.
90. Moharib SA, El-Sayed ST, Jwanny EW (2000) Evaluation of enzymes produced from yeast. **Nahrung** 44, 47-51.
91. Muñoz JA, Coronado C, Pérez-Hormaeche J, Kondorosi A, Ratet P, Palomares AJ (1998) MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa-*Rhizobium meliloti* interaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95, 9687-9692.
92. Murad HA, Foda MS (1992) Production of yeast polygalacturonase in dairy wastes. **Bioresour. Technol.** 41, 247-250.
93. Nakagawa T, Miyaji T, Yurimoto H, Sakai Y, Kato N, Tomizuka N (2000) A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. **Appl. Environ. Microb.** 66, 4253-4257.
94. Nelson NJ (1957) Colorimetric analysis of sugars. **Methods Enzymol.** 3, 85-86.
95. O'Leary VS, Sutton C, Bencivengo M, Sulligan B, Holsinger VH (1977) Influence of lactose hydrolysis and solids concentration on alcohol production by yeast in acid whey ultrafiltrate. **Biotechnol. Bioeng.** 19, 1689-1702.
96. O'Shea DG, Walsh PK (2000) The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53, 316-322.
97. Owens HS, Lotzcar H, Merrill RC, Peterson M (1944) Viscosities of pectin solutions. **J. Am. Chem. Soc.** 66, 1178-1182.



98. Oyewole OB (2001) Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for 'fufu' production. **Int. J. Food Microbiol.** 65, 213-218.
99. Palacio H (1956) Fabricación de alcohol. 1ª edn, Salvat Editores, S.A.; Barcelona.
100. Palmqvist E, Almeida JS, Hahn-Hägerdal B (1999) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnol. Bioeng.** 62, 447-454.
101. Pardo C, Lapeña MA, Gacto M (1991) Purification and characterization of an extracellular exopolysaccharidase from *Geotrichum lactis*. **Can. J. Microbiol.** 37, 974-977.
102. Parenikova L, Benen JAE, Kester HCM, Visser J (1998) pgaE encodes a fourth member of the endopolysaccharidase gene family from *Aspergillus niger*. **Eur. J. Biochem.** 251, 72-80.
103. Pariza MW, Foster EM (1983) Determining the safety of enzymes used in food processing. **J. Food Protect.** 46, 453-468.
104. Patino B, Posada ML, González-Jaen MT, Martínez del Pozo A, Vázquez C (1997) Control of polysaccharidase synthesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. **Can. J. Microbiol.** 43, 1084-1090.
105. Pérez S, Mazeau K, Herve du Penhoat C (2000) The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiol. Biochem.** 38, 37-55.
106. Pharr DM, Dickinson DB (1973) Partial characterization of Cx cellulase and cellobiase from ripening tomato fruits. **Plant Physiol.** 5, 577-583.
107. Pilnik W, Rombouts FM (1979) Pectic Enzymes. En: Blanshard IMV, Mitchell JR (eds) Polysaccharides in food. Butterworths, Boston, pp.109-126.

108. Pressey R (1991) Polygalacturonase in tree pollens. **Phytochemistry** 30, 1753-1755.
109. Pretorius IS; Van der Westhuizen TJ (1991) The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry: a review. **S. Afr J. Enol. Vitic.** 12, 3-31.
110. Puig S, Pérez-Ortín JE (2000) Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. **Yeast** 16, 139-148.
111. Pvnun YR, Jo JS, Park JW, Shin HH (1999) Effects of oxygen on invertase expression in continuous culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing the *SUC2* gene. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 51: 334-339.
112. Ramírez MA, Reinaldo I (2002) Origen, preparación química y actividad biológica de oligosacarinas. Aplicaciones en agricultura. 1. Preparación química. En: Curso “*Productos Naturales para una Agricultura Sostenible*”, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de Las Lajas, La Habana, Noviembre 11-13, 2002.
113. Rankine B (1991) Some thoughts on enzymes in winemaking. *Aust. Grapegr. Winemak.* 334, 13.
114. Ravelomanana R, Guiraud JP, Galzy P (1986) Isolation of a pectin-utilizing yeast from cocoa beans. **Syst. Appl. Microbiol.** 8, 230-233.
115. Reymond-Cotton P, Fraissinet-Tachet L, Fevre M (1996) Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* *pg1* gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. **Curr. Genet.** 30, 240-245.
116. Roa-Mejía G, Oliveros-Tascón CE, Sanz-Uribe JR, Alvarez-Gallo J, Ramírez-Gómez CA, Álvarez-Hernández JR (1997) Desarrollo de la técnica BECOLSUB para el

- beneficio ecológico del café. En: Cenicafé. Avances técnicos, No.164. Cenicafé, Chinchiná, Colombia.
117. Rombouts FM, Pilnik WL (1989) Pectic enzymes. En: Rose AH (ed) *Economic Microbiology*, vol. 5. Academic Press, Londres, pp. 227-282.
118. Rose JKC, Hadfield KA, Labavitch JM, Bennett AB (1998) Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. **Plant Physiol.** 117, 345-361.
119. Roussos S, Ángeles-Aquíhuatl M, Trejo-Hernández MR, Gaime-Perraud I, Favela E, Ramakrishna M, Raimbault M, Viniegra-González G (1995) Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42, 756-762.
120. Russo P, Simonen M, Uimari A, Teesalu T, Makarow M (1992) Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast *HSP50* gene encoding a secretory glycoprotein. **Mol. Gen. Genet.** 239, 273-280.
121. Sánchez J, Guiraud JP, Galzy P (1984) A study of the polygalacturonase EC-3.2.1.15. activity of several yeast strains isolated from cocoa. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 20, 262-267.
122. Saulnier L, Brillouet JM (1988) Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries. **Carbohydr. Res.** 182, 62-78.
123. Schwan RF, Cooper RM, Wheals AE (1996) Endo-polygalacturonase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* is constitutive, highly active on native pectin and is the main extracellular protein. En: Visser J, Voragen AGJ (eds) *Pectin and pectinases*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 861-868.

124. Schwan RF, Cooper RM, Wheals AE (1997) Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme Microb. Technol.** 21, 234-244.
125. Schwan RF, Mororo RC (1989) Despulpamento enzimático de sementes de cacau. En: Congresso de Ciência e Tecnologia de Alimentos 25, Brazilian Society of Food Technology, Río de Janeiro, Brasil.
126. Schwan RF, Rose AH (1994) Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. **J. Appl. Bacteriol.** 76, 62-67.
127. Serra JL, Alkorta I, Llama MJ, Alaña A (1992) Aplicación industrial de los enzimas pécticos. Producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectinasa de *Penicillium italicum*. **Alimentación. Equipos y Tecnología**, Octubre, 127-134.
128. Serrat M (1998) Potencialidades de las levaduras en el aprovechamiento de los residuales del café. *Tesis de Maestría*, Bermúdez RC (tutor), Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
129. Shevchik VE, Condermine G, Hugouvieux-Cottepattat N, Robert-Baudouy J (1996) Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Mol. Microbiol.** 19, 455-66.
130. Šiekštelė R, Bartkevičiūtė D, Sasnauskas K (1999) Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (*EPG1*). **Yeast** 15, 311-322.
131. Sigarroa A (1985) Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba.

132. Silva CF, Schwan RF, Sousa Dias E, Wheals AE (2000) Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **Int. J. Food Microbiol.** 60, 251-260.
133. Sitrit Y, Downie B, Bennett AB, Bradford KJ (1996) A novel exo-polygalacturonase is associated with radicle protrusion in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. (abstract no. 752). **Plant Physiol.** 111, S-161.
134. Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 159, 19-23.
135. Spagnuolo M, Crecchio C, Pizzigallo MDR, Ruggiero P (1997) Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. **Bioresource Technology** 60, 215-222.
136. Spencer A, Lemenstein I (1967) Citrate content of liver and kidney of rat in various metabolic on fluoroacetic poisoning. *J. Biochem.* 103, 347-348.
137. Strauss ML, Jolly NP, Lambrechts MG, Van Rensburg P (2001) Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **J. Appl. Microbiol.** 91, 182-190.
138. Suykerbuyk MEG, Schaap PJ, Stam H, Musters W, Visser J (1995) Cloning, sequence and expression of the gene coding for rhamnogalacturonase of *Aspergillus aculeatus*: a novel pectinolytic enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43, 861-870.
139. Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, Lidén G (2000) Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53, 701-708.

140. Takayanagi T, Uchibori T, Yokotsuka K (2001) Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grape skins. **Am. J. Enol. Vitic.** 52, 41-44.
141. Taylor JE, Webb STJ, Coupe SA, Tucker GA, Roberts JA (1993) Changes in polygalacturonase activity and solubility of polyuronides during ethylene-stimulated leaf abscission in *Sambucus nigra*. **J. Exp. Bot.** 44, 93-98.
142. Van der Vlugt Bergmans CJ, Meeuwsen PJ, Voragen AG, Van Ooyen AJ (2000) Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 36-41.
143. Vilanova M, Blanco A, Cortés S, Castro M, Villa TG, Sieiro, C (2000) Use of a PGU1 recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations. **J. Appl. Microbiol.** 89, 876-883.
144. Vitolo M, Vairo MLR, Borzani W (1987) Invertase activity of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugarcane molasses. II. Unsteady-state continuous-culture tests. **Biotechnol. Bioeng.** 30, 9-14.
145. Wickerham LJ, Burton KA (1946) A modification of Henrici's vegetable-juice sporulation medium for yeasts. **J. Bact.** 52, 611-612.
146. Wimborne MP, Rickard PAD (1978) Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* cultured in controlled environments. **Biotechnol. Bioeng.** 20, 231-242.
147. Wood PJ, Saddiqui IR (1971) Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. **Anal. Biochem.** 39, 418-428.

148. Wubben JP, Mulder W, Ten Have A, Van Kan JAL, Visser J (1999) Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 1596-1602.
149. Zink RT, Chatterjee AK (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of pectinase genes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Appl. Environ. Microbiol.** 49, 714-717.

# ANEXOS



**A-I. Catálogo descriptivo de las características  
morfológicas y fisiológicas de las levaduras  
pectinolíticas aisladas de residuales del  
beneficio húmedo del café**

## ADA39 = P6

### Nombre:

*Hansenula jadinii* Lodder

### Morfología:

- Morfología de la colonia: colonias circulares a irregulares, de 2-3 mm de diámetro, opacas, lisas, bordes enteros, abultadas a convexas, de color blanco.
- Micro-morfología: células subglobosas a elipsoidales, gemación multipolar, pseudohifas. Ascas elipsoidales con 1-2 esporas.

### Imágenes:



Colonias en YPD, 24 horas

### Fisiología:

#### Ensayos de fermentación de azúcares

D-glucosa	+	lactosa	+	L-lisina	-
D-galactosa	+	rafinosa	+	cadaverina	+
celobiosa	-	melezitosa	+	sin vitaminas	+
lactosa	-	inulina	+	sin <i>myo</i> -inositol	+
sacarosa	+	almidón	w	sin biotina	+
inulina	-	glicerol	-	sin tiamina	+
		eritritol	-	sin piridoxina	+
		xilitol	-	sin niacina	+
		L-arabinitol	-	sin PABA	+
		D-glucitol	+	a 25 °C	+
		D-manitol	-	a 30 °C	+
		galactitol	+	A 35 °C	+
		<i>myo</i> -inositol	-	a 37 °C	+
		D-glucono-1,5-lactona	+	a 42 °C	+
		2-ceto-D-gluconato	¿?	D-glucosa 50 %	+
		D-gluconato	+	D-glucosa 60 %	+
		D-gluconato	-	D-glucosa 5 %/ NaCl 10 %	N
		DL-lactato	w		
		succinato	+	<i>Otras pruebas</i>	
		citrate	+	Formación de almidón	-
		etanol	+	Hidrólisis de la urea	-
		nitrate	+	Reacción del DBB	-
		etilamina	+		

*Leyenda:* +, respuesta positiva; -, negativa; w, débil; D, demorada (< 7 días); s, lenta; N, ensayo no realizado

**ADA40b = P7b**

**Nombre:**

*Debaryomyces vanriijiae* Lodder and Kreger-van Rij

**Imágenes:**



Colonias en YPD, 24 horas

**Morfología:**

- a) Morfología de la colonia: colonias circulares, de 2-3 mm de diámetro, opacas, lisas, bordes enteros, levantadas, de color blanco a blanco-amarillento.
- b) Micro-morfología: células ovoides a esferoidales, gemación multipolar, no se observa formación de pseudohifas. Ascas de conjugación célula-yema, cuatro ascosporas por asca.

**Fisiología:**

*Ensayos de fermentación de azúcares*

D-glucosa	+	lactosa	+	sin vitaminas	+
D-galactosa	+	rafinosa	+	sin <i>myo</i> -inositol	+
celobiosa	-	melezitosa	+	sin biotina	+
lactosa	-	inulina	-	sin tiamina	+
sacarosa	+	almidón	-	sin piridoxina	+
maltosa	+	glicerol	<b>w</b>	sin niacina	+
inulina	-	eritritol	-	sin PABA	+
		D-manitol	<b>w</b>	a 25 °C	+
		galactitol	+	a 30 °C	+
		<i>myo</i> -inositol	-	A 35 °C	+
		D-glucono-1,5-	-	a 37 °C	+
		lactona		a 42 °C	+
		2-ceto-D-gluconato	+	D-glucosa 50 %	+
		D-gluconato	-	D-glucosa 60 %	-
		D-gluconato	-	D-glucosa 5 %/	+
		DL-lactato	+	NaCl 10 %	
		succinato	-	<i>Otras pruebas</i>	
		citrato	-	Formación de	-
		metanol	-	almidón	
		etanol	+	Hidrólisis de la urea	-
		nitrate	-	Reacción del DBB	-
		etilamina	+		
		L-lisina	<b>w</b>		
		cadaverina	+		

*Legenda:* +, respuesta positiva; -, negativa; w, débil; D, demorada (< 7 días); s, lenta; N, ensayo no realizado

**ADA44 = P8****Nombre:***Hansenula jadinii* Lodder**Morfología:**

- a) Morfología de la colonia: colonias circulares a irregulares, de 2-3 mm de diámetro, opacas, lisas, bordes enteros, protuberantes, de color blanco.
- b) Micro-morfología: células subglobosas a elipsoidales, gemación multipolar, pseudohifas. Ascas elipsoidales con 1-2 esporas.

**Imágenes:***Colonias en YPD, 24 horas***Fisiología:***Ensayos de fermentación de azúcares*

D-glucosa	+	melezitosa	+	sin <i>myo</i> -inositol	+
D-galactosa	+	inulina	w	sin biotina	+
celobiosa	-	almidón	-	sin tiamina	+
maltosa	w	glicerol	w	sin piridoxina	+
inulina	-	eritritol	-	sin niacina	+
		xilitol	-	sin PABA	+
		L-arabinitol	-	a 25 °C	+
		D-glucitol	-	a 30 °C	+
		D-manitol	-	A 35 °C	+
		galactitol	+	a 37 °C	+
		<i>myo</i> -inositol	-	a 42 °C	+
		D-glucono-1,5-lactona	+	cicloheximida 0,01 %	-
		2-ceto-D-gluconato	-	cicloheximida 0,1 %	-
		D-gluconato	-	D-glucosa 50 %	+
		D-gluconato	-	D-glucosa 60 %	-
		D-gluconato	-	D-glucosa 5 %/ NaCl 10 %	N
		DL-lactato	+	<i>Otras pruebas</i>	
		succinato	+	Formación de almidón	-
		citrato	+	Hidrólisis de la urea	-
		hexadecano	-	Reacción del DBB	-
		etanol	+		
		nitrito	+		
		etilamina	+		
		L-lisina	-		
		sin vitaminas	+		

*Leyenda:* +, respuesta positiva; -, negativa; w, débil; D, demorada (< 7 días); s, lenta; N, ensayo no realizado

ADA49b = P9b

**Nombre:**

*Hansenula jadinii* Lodder

**Imágenes:**



Colonias en YPD, 24 horas

**Morfología:**

- a) Morfología de la colonia: colonias circulares, de 2-3 mm de diámetro, opacas, lisas, bordes enteros, abultada, de color blanco.
- b) Micro-morfología: células ovoides a esferoidales, gemación multipolar, pseudohifas. Formación de ascas esferoidales, conteniendo 4 ascosporas.

**Fisiología:**

*Ensayos de fermentación de azúcares*

D-glucosa	+
celobiosa	-
inulina	-

*Ensayos de asimilación y crecimiento aeróbico*

D-galactosa	+
L-sorbosa	-
D-glucosamina	-
D-xilosa	-
L-arabinosa	w
D-arabinosa	-
L-ramnosa	w
sacarosa	+
maltosa	+
α,α-trealosa	+
Me α-D-glucopiranosido	w
celobiosa	+
melibiosa	w
lactosa	+
rafínosa	+
melezitosa	N

inulina	-	sin vitaminas	+
almidón	w	sin <i>myo</i> -inositol	+
glicerol	w	sin biotina	+
eritritol	-	sin tiamina	+
xilitol	+	sin piridoxina	+
L-arabinitol	-	sin niacina	+
D-glucitol	-	sin PABA	+
D-manitol	-	a 25 °C	+
galactitol	-	a 30 °C	+
<i>myo</i> -inositol	-	A 35 °C	+
D-glucono-1,5-lactona	+	a 37 °C	+
2-ceto-D-gluconato	-	a 42 °C	+
D-gluconato	-	cicloheximida 0,01 %	-
D-gluconato	-	cicloheximida 0,1 %	-
DL-lactato	+	D-glucosa 50 %	+
succinato	+	D-glucosa 60 %	+
citrato	-	D-glucosa 5 %/ NaCl 10 %	N
metanol	-	<i>Otras pruebas</i>	
etanol	+	Formación de almidón	-
nitrate	+	Hidrólisis de la urea	-
etilamina	+	Reacción del DBB	-
L-lisina	-		
cadaverina	N		

*Legenda:* +, respuesta positiva; -, negativa; w, débil; D, demorada (< 7 días); s, lenta; N, ensayo no realizado

**ADA15F = EP915**

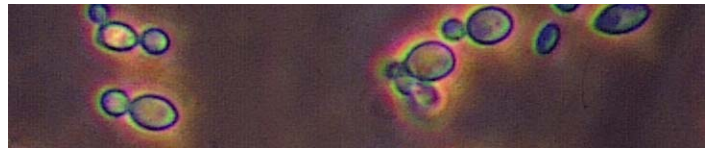
**Nombre:**

*Kluyveromyces marxianus* van der Walt emend. van der Walt

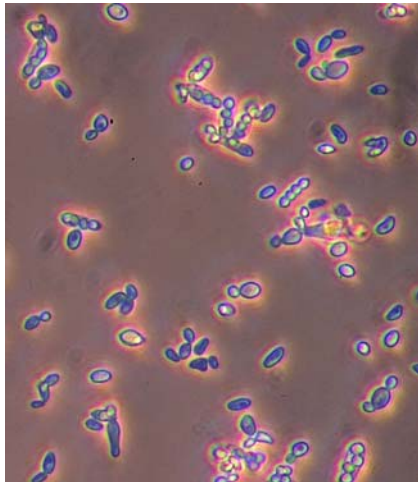
**Imágenes:**



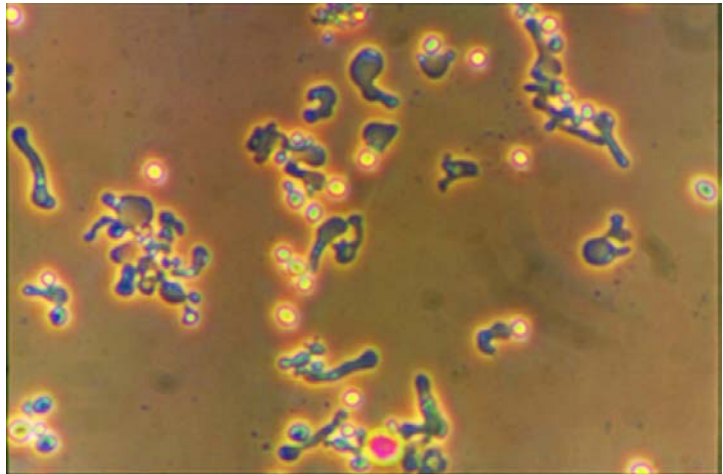
Colonias en YPDA, 24 horas



Células gemantes en YPD, 12 horas. Aumento 400 X.



Células gemantes y ascas. Agar V8 modificado, 24 horas. Aumento 400 X.



Filamentos rudimentarios y cortos en agar acetato, 72 horas. Aumento 400 X.

**Morfología:**

*Morfología de la colonia:* colonias circulares, de 2-3 mm de diámetro, opacas, lisas, bordes enteros, abultadas a protuberantes, de color blanco-amarillento.

*Micro-morfología:* células elipsoidales a esferoidales, gemación multipolar, filamentos cortos y rudimentarios. Formación de ascas elipsoidales a elongadas, mayormente no conjugadas, delicuescentes, conteniendo cuatro ascosporas esféricas y lisas.

## Fisiología:

<i>Ensayos de fermentación de azúcares</i>		melibiosa	–	nitrato	–
		lactosa	+	etilamina	+
D-glucosa	+	rafinosa	+	L-lisina	+
D-galactosa	+	melezitosa	–	cadaverina	N
maltosa	–	inulina	+	sin vitaminas	–
sacarosa	+	almidón	–	a 25 °C	+
lactosa	+	glicerol	+	a 30 °C	+
celobiosa	–	eritritol	–	A 35 °C	+
inulina	w	xilitol	+	a 37 °C	+
<i>Ensayos de asimilación y crecimiento aeróbico</i>		L-arabinitol	N	a 42 °C	+
		D-glucitol	N	cicloheximida 0,01 %	+
D-galactosa	+	D-manitol	+	cicloheximida 0,1 %	+
L-sorbosa	D	galactitol	–	D-glucosa 50 %	s
D-glucosamina	–	myo-inositol	–	D-glucosa 60 %	–
D-xilosa	+	D-glucono-1,5-lactona	+	D-glucosa 5 %/ NaCl 10 %	+
L-arabinosa	+	2-ceto-D-gluconato	–	<i>Otras pruebas</i>	
D-arabinosa	–	D-gluconato	–	Formación de almidón	–
L-ramnosa	–	D-gluconato	–	Hidrólisis de la urea	–
sacarosa	+	DL-lactato	+	Reacción del DBB	–
maltosa	–	succinato	+		
$\alpha,\alpha$ -trealosa	N	citrato	+		
Me $\alpha$ -D-glucopiranosido	–	metanol	–		
celobiosa	+	etanol	+		

*Leyenda:* +, respuesta positiva; –, negativa; w, débil; D, demorada (< 7 días); s, lenta; N, ensayo no realizado

**Comportamiento sexual:** homotática

**Tolerancia a etanol:** 8 % (v/v)

**CBA90 = P10**

**Nombre:**

*Kluyveromyces marxianus* van der Walt emend. van der Walt

**Morfología:**

- a) Morfología de la colonia: colonias circulares, de 2-3 mm de diámetro, opacas, rugosas, bordes enteros, protuberantes, de color blanco.
- b) Micro-morfología: células elongadas y crecimiento micelial bien desarrollado. Ascas elongadas, delicuescentes, conteniendo 1-2 ascosporas.

**Imágenes:**



*Colonias en YPD, 24 horas*

**Fisiología:**

*Ensayos de fermentación de azúcares*

D-glucosa	-
celobiosa	-
inulina	-

*Ensayos de asimilación y crecimiento aeróbico*

D-galactosa	-
L-sorbosa	-
D-glucosamina	-
D-xilosa	w
L-arabinosa	w
D-arabinosa	-
L-ramnosa	-
sacarosa	+
maltosa	+
α,α-trealosa	+
Me α-D-glucopiranosido	w
celobiosa	+
melibiosa	-
lactosa	+
rafinosa	+
melezitosa	-

Inulina	+
almidón	w
glicerol	-
eritritol	-
xilitol	+
L-arabinitol	-
D-glucitol	N
D-manitol	-
galactitol	-
myo-inositol	-
D-glucono-1,5-lactona	-
2-ceto-D-gluconato	-
D-gluconato	-
D-glucuronato	-
DL-lactato	-
succinato	+
citrato	-
metanol	-
etanol	+
nitrito	-
etilamina	+
L-lisina	+
cadaverina	+

sin vitaminas	+
sin myo-inositol	+
sin biotina	+
sin tiamina	+
sin piridoxina	+
sin niacina	+
sin PABA	+
a 25 °C	+
a 30 °C	+
A 35 °C	-
a 37 °C	-
a 42 °C	-
cicloheximida 0,01 %	+
cicloheximida 0,1 %	+
D-glucosa 50 %	+
D-glucosa 60 %	-
D-glucosa 5 %/ NaCl 10 %	N
<i>Otras pruebas</i>	
Formación de almidón	-
Hidrólisis de la urea	-
Reacción del DBB	-

*Leyenda:* +, respuesta positiva; -, negativa; w, débil; D, demorada (< 7 días); s, lenta; N, ensayo no realizado



## **A-II. ENSAYOS DE APLICACIÓN DE LA PG DE *K. marxianus* CCEBI 2011 AL PROCESAMIENTO DE VEGETALES Y ZUMOS DE FRUTA**

Estos ensayos tuvieron como objetivo evaluar el potencial de aplicaciones de la PG de *K. marxianus* en el procesamiento de vegetales y zumos de fruta.

### **Procedimientos Experimentales**

Procesamiento de zumos y pulpas de frutas. Se colectaron frutos sanos y maduros de naranja (*Citrus sinensis* L., variedad Valencia Tardía), pera (*Pyrus communis* L., variedad Conferencia Belga) y manzana (*Malus domestica* Borkh., variedad Roja Deliciosa). Mediante una licuadora doméstica (Moulinex turbomix plus R 35, Francia; 150 W) se prepararon papillas fluidas de frutos de pera y manzana, los cuales fueron previamente cortados en pequeños pedazos y desprovistos de sus semillas. La adición de una pequeña porción de agua fue necesaria en el caso de la manzana para facilitar el proceso. En tanto, por intermedio de un extractor doméstico, se extrajo el zumo de las naranjas. Entonces, se adicionó el enzima ( $1 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  en las pulpas de pera y manzana y  $1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el zumo de naranja) y las muestras se incubaron a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  por espacio de 60 y 120 min. Luego se procedió a la separación de los sólidos mediante centrifugación ( $8000 \text{ min}^{-1}$ ,  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min) determinándose el peso húmedo de los sólidos sedimentados. En las muestras de jugo de naranja, los sólidos gruesos de baja densidad se separaron mediante un colador de acero inoxidable (malla de 0,5 mm, diámetro interno) antes de la centrifugación. A los sobrenadantes libres de sólidos se les determinó la absorbancia a 650 nm, estimándose el grado de clarificación alcanzado de la disminución de los valores de absorbancia. Porciones de 250 mL de estos sobrenadantes se filtraron a vacío (55 mm Hg) a

través de un papel Whatman No. 1 (4,7 cm de diámetro; Whatman, Ltd.; UK) y se mide el tiempo de filtración con ayuda de un cronómetro (precisión 0,2 s).

Macerado de vegetales. Se seleccionaron frutos verdes y firmes de pepino (*Cucumis sativus* L.), tubérculos sanos y de mediano tamaño de zanahoria (*Daucus carota* L. ssp. *sativa*) y frutos maduros y firmes de plátano (*Musa paradisiaca* L., variedad Burro CENSA, La Habana, Cuba) para el ensayo de la actividad macerante de la PG de *K. marxianus*. Cortes cilíndricos (5 × 5 mm) del tejido interno no vascular de estos vegetales se sometieron a tratamiento enzimático siguiendo el procedimiento experimental desarrollado por Mussell y Morre (1969) en su bioensayo para la determinación de actividad PG. El experimento se desarrolló a 37 °C, pH 5,0 (buffer acetato de sodio 50 mM), actividad enzimática 1 U·mL<sup>-1</sup>, durante 120 min. La actividad macerante se expresó como el porcentaje de pérdida de peso en el tejido sometido a tratamiento enzimático con respecto al control sin tratar.

Todos los ensayos se realizaron con cinco réplicas, tanto para la variante sometida a tratamiento enzimático como para el control con el enzima inactivado térmicamente. Se utilizó el crudo enzimático concentrado procedente de la fermentación a escala piloto en medio YD.

## **Resultados y Discusión**

La Tabla 1A muestra los resultados obtenidos en el tratamiento enzimático del zumo de naranja y las pulpas de pera y manzana. Se obtuvo un incremento significativo ( $p < 0,01$  para manzana y pera;  $p < 0,05$  para naranja), de alrededor de dos veces, en la velocidad de

filtración de los zumos tratados enzimáticamente comparados con los controles, no ocurriendo así cuando se comparan los resultados obtenidos para los dos tiempos de incubación utilizados, entre los cuales no se observan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Estos resultados demuestran que una hora de tratamiento resulta suficiente y que la depolimerización de la pectina parece desempeñar el rol principal en el incremento velocidad de filtración de zumos de estas frutas.

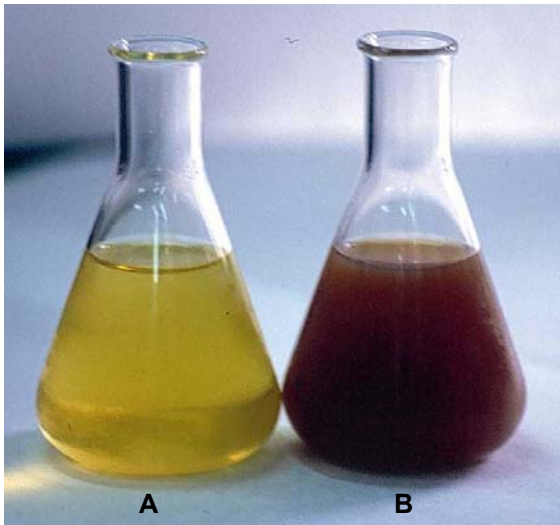
**Tabla 1A** Tratamiento de zumos de frutas con la PG de *K.marxianus*.

	Tiempo de tratamiento	Naranja		Pera		Manzana	
		C	P	C	P	C	P
<b>Velocidad de filtración (mL·s<sup>-1</sup>)</b>	60 min	2,24 ± 0,30	3,89 ± 0,42	3,45 ± 0,45	8,54 ± 0,96	2,44 ± 0,25	4,42 ± 0,37
	120 min	2,24 ± 0,34	3,95 ± 0,35	3,33 ± 0,53	8,33 ± 0,87	2,44 ± 0,21	4,42 ± 0,47
<b>Turbidez (A<sub>650</sub>)</b>	60 min	0,031 ± 0,004	0,020 ± 0,005	0,364 ± 0,004	0,363 ± 0,004	0,769 ± 0,006	0,035 ± 0,005
	120 min	0,031 ± 0,006	0,018 ± 0,004	0,362 ± 0,004	0,364 ± 0,005	0,767 ± 0,007	0,036 ± 0,004
<b>Sólidos sedimentados (%)</b>	60 min	—	—	24,41 ± 0,40	19,14 ± 0,30	17,85 ± 0,45	21,02 ± 0,32
	120 min	—	—	24,49 ± 0,33	19,11 ± 0,27	17,45 ± 0,32	20,84 ± 0,35

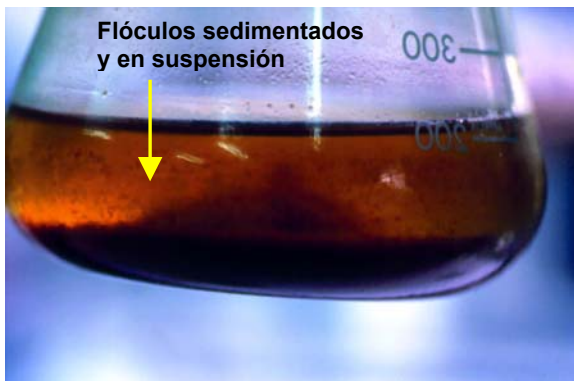
<sup>a</sup> Todos los valores corresponden al valor de la media ± desviación estándar de cinco determinaciones

<sup>b</sup> Leyenda: C, muestra control con el enzima inactivado; P, muestra problema

Con relación a la clarificación de los zumos, se obtuvo una prácticamente completa clarificación (95,3 %) para el zumo de manzana (Tabla 1A y Fig. 1A), resultando un producto clarificado de similar turbidez a la del zumo clarificado comercial (A<sub>650</sub> 0,06), de conformidad con los resultados reportados por Gómez-Ruiz *et al.* (1988). Un ligero pero significativo ( $p < 0,05$ ) incremento en los sólidos sedimentados (> 3 %) comparado con el control se observó para la pulpa de manzana, lo cual se corresponde con el grado de clarificación alcanzado. La nube coloidal del zumo de manzana está compuesta de un 30 a



**Figura 1A** Apariencia visual de la clarificación del zumo de manzana con la PG de *K. marxianus*. (A) muestra problema, (B) control con el enzima inactivado. Condiciones de reacción: PG 1 U·mL<sup>-1</sup>, temperatura 45 °C, 1 h.



**Figura 2A** Formación de flóculos en el zumo de manzana tratado con la PG de *K. marxianus*.

un 40 % de proteínas, cargadas positivamente al pH del zumo y asociadas a compuestos polifenólicos (Grassin y Frauquembergue 1996). Los fragmentos de la pectina parcialmente hidrolizada rodean estas estructuras, provocando la neutralización de las cargas electrostáticas, lo cual induce la floculación (Fig. 2A).

Como consecuencia de este proceso la masa de sólidos sedimentados debe incrementarse.

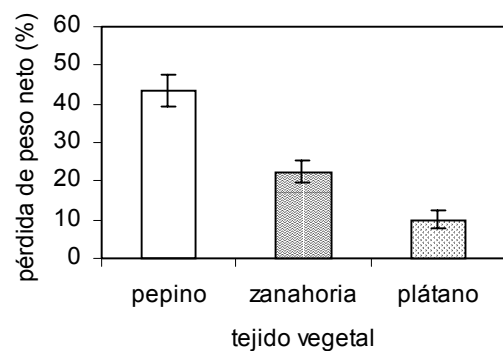
Para los zumos de naranja y pera no se observaron cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en la turbidez, en contraste con los incrementos alcanzados en la velocidad de filtración. No obstante, en el caso de la pera se obtuvo una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) de aproximadamente

el 22 % en los sólidos sedimentados, lo cual sugiere que las PG de levadura pueden contribuir al incremento en los rendimientos durante la extracción de los zumos.

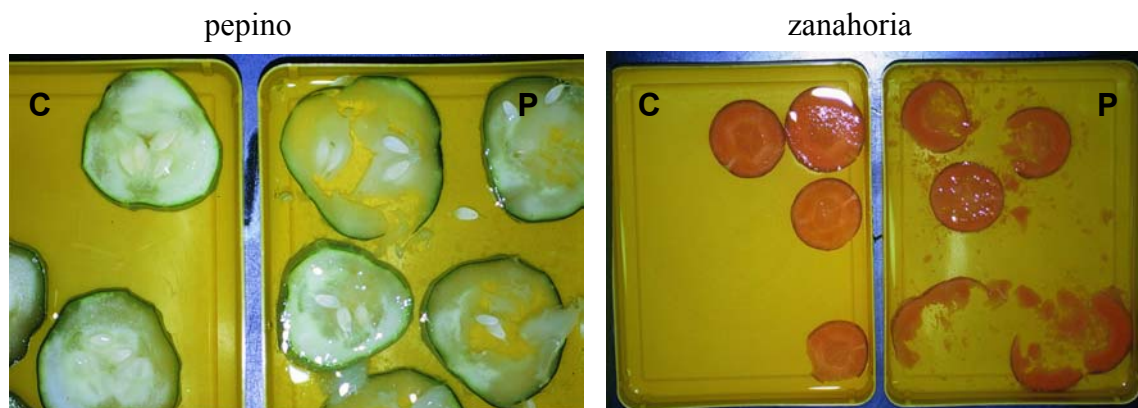
Los resultados obtenidos en el procesamiento enzimático del zumo de frutas permiten sugerir el uso de la PG de *K. marxianus* para tales fines. Por otro lado, resulta destacado el

hecho de que la acción enzimática tenga lugar en zumos naturales (sin algún tratamiento previo), caracterizados por presentar pHs muy bajos (3,3 para el zumo de manzana y 4,5 para el de pera). En el caso del zumo de naranja resulta atractivo que el tratamiento enzimático incremente la velocidad de filtración sin afectar la turbidez natural del zumo, un importante parámetro de calidad que debe preservarse durante su procesamiento, debido a que los compuestos responsables del aroma y el color de los zumos cítricos se encuentran en gran medida asociados o forman parte del material coloidal (Adlercreutz *et al.*, 1994).

Con respecto a la utilidad de las PG de levadura en el macerado de tejidos vegetales, los resultados se muestran en las Figuras 3A y 4A. Para las condiciones experimentales ensayadas se encontró una considerable



**Figura 3A** Pérdidas de peso neto en los tejidos vegetales tratados enzimáticamente cuando las células fluidizadas son separadas mediante lavado bajo una corriente de agua.



**Figura 4A** Visualización del fenómeno de macerado enzimático en los tejidos de pepino y zanahoria. (C), control con enzima inactivado; (P) muestra problema. Para todos los casos PG 1 U·mL<sup>-1</sup>, 37 °C, pH 5,0; 2h de tratamiento enzimático.

actividad macerante (42,3 %) para el pepino, en correspondencia con un reporte previo para una pectinasa fúngica (Serra *et al.*, 1992). Si se tiene en cuenta que Mussell y Morre (1969) usaron pepino como sustrato para su bioensayo cuantitativo de la actividad PG, este resultado resulta esperado. Con relación a zanahoria y plátano sólo el 22,3 y 10 por ciento de actividad macerante son obtenidos, respectivamente.

En el ensayo de macerado con el tejido de plátano se observaron pequeñas diferencias en las pérdidas de peso entre las muestras problema y los controles, de ahí el aparentemente bajo grado de macerado alcanzado (10 %). Sin embargo, tanto en las muestras problema como en los controles se observaron altos niveles de macerado (dato no mostrado). La causa de tal comportamiento puede explicarse sobre la base de la existencia de una alta actividad endógena de PG en el tejido. Prabha y Bhagyalakshmi (1998) han encontrado que las pectinasas juegan un papel determinante en el ablandamiento del fruto que tiene lugar durante la maduración del plátano.

En el caso de la zanahoria, se recomienda utilizar preparaciones pectinolíticas con alto contenido de actividad protopectinasa (Reiter *et al.*, 2003) con el objetivo de solubilizar la protopectina presente en estos tejidos. La ausencia de actividad protopectinasa en el crudo enzimático estudiado podría explicar el bajo grado de macerado obtenido para zanahoria. En este sentido, la aplicación del enzima para fines de macerado resulta aún limitada.

## Referencias

1. Adlercreutz P, Iborra JL, Schmidt E, Pedersen S (1994) Applications (Cap. 3). En: Cabral JMS, Best D, Boross L, Tramper J (eds), Applied biocatalysis. Harwood Academic Publishers, Suiza, pp. 109-156.
2. Gómez-Ruiz L, García-Garibay M, Bárzana E (1988) Utilization of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. **J. Food Sci.** 53(4), 1236-1237, 1240.
3. Grassin C, Fauquembergue P (1996) Applications of pectinases in beverages. En: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectin and pectinases. Elsevier Science, Amsterdam, pp 453-462.
4. Mussell HW, Morre DJ (1969) A quantitative bioassay specific for polygalacturonases. **Anal. Biochem.** 28, 353-360.
5. Prabha TN, Bhagyalakshmi N (1998) Carbohydrate metabolism in ripening banana fruit. **Phytochemistry** 48, 915-920.
6. Reiter M, Stuparic M, Neidhart S, Carle R (2003) The role of process technology in carrot juice cloud stability. **Lebensm. Wiss. Technol.** 36, 165-172.
7. Serra JL, Alkorta I, Llama MJ, Alaña A (1992) Aplicación industrial de los enzimas pécticos. Producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectina liasa de *Penicillium italicum*. **Alimentación. Equipos y Tecnología**, Octubre, 127-134.