

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

**“MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA GOMA DE  
MEZQUITE PARA LA OBTENCIÓN DE L-ARABINOSA”**

**T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A  
JUAN MANUEL LOEZA CORTE**

**D I R E C T O R  
DR. SERGIO HUERTA OCHOA**

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2007

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana  
está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT  
y además cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Iztapalapa, D. F. a 21 de diciembre de 2007.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA GOMA DE  
MEZQUITE PARA LA OBTENCIÓN DE L-ARABINOSA

Que presentó  
Juan Manuel Loeza Corte


Comité tutorial:


Director: Dr. Sergio Huerta Ochoa  
Universidad Autónoma Metropolitana

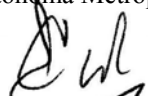
Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa  
Universidad Autónoma Metropolitana


Asesor: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter  
Universidad Autónoma Metropolitana

Comité de evaluación:

Presidente:   
Dr. Francisco Cruz Sosa  
Universidad Autónoma Metropolitana

Secretario:   
Dr. José Ramón Verde Calvo  
Universidad Autónoma Metropolitana

Vocal:   
Dr. Carlos Regalado González  
Universidad Autónoma de Querétaro

Vocal:   
Dr. Juan Orozco Villafuerte  
Universidad Autónoma del Estado de México

## RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio sobre la producción de un biocatalizador que se encarga de hidrolizar la goma de mezquite, permitiendo por una parte la liberación de L-arabinosa, mientras que por otra parte se obtengan agentes emulsificantes mejorados a partir de la misma goma de mezquite.

El interés de producir L-arabinosa recae en las aplicaciones potenciales que se le da a nivel industrial en la producción de bio-etanol y en cuanto a su uso como inhibidor no competitivo de la sacarosa intestinal evitando su absorción en el intestino delgado.

La producción de extractos enzimáticos crudos obtenidos a partir de *Aspergillus niger* ha sido reportada para la degradación de arabinofuranosil-glucósidos, arabinanos, arabinosilanos, etc. Dada esta producción y conocido el crecimiento de *A. niger* en fermentaciones en medio líquido y en medio sólido, se puede intuir que la goma de mezquite puede ser utilizada como sustrato para obtener un biocatalizador enzimático a partir de *A. niger*. Los parámetros de crecimiento obtenidos para *A. niger* 10 sobre la goma de mezquite fueron:  $X_{\max} = 3.03 \text{ g L}^{-1}$  y  $\mu_{\max} = 0.07 \text{ h}^{-1}$ .

La enzima de interés es la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), ya que es la encargada de hidrolizar los enlaces 1 $\rightarrow$ 3 y 1 $\rightarrow$ 5 de la L-arabinosa presente en distintos polisacáridos, obteniéndose una máxima actividad enzimática de  $65.93 \text{ U L}^{-1}$ . Se determinó la temperatura óptima y la energía de activación para el extracto crudo y para una enzima comercial  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa siendo éstos  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $46.15 \text{ KJ mol}^{-1}$  y  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $52.76 \text{ KJ mol}^{-1}$ , respectivamente. Se compararon los parámetros cinéticos aparentes del extracto crudo con aquellos obtenidos para una enzima comercial sobre la goma de mezquite. Los valores de  $K_{m-app}$  y  $V_{max-app}$  para el extracto crudo fueron de  $4.87 \text{ g L}^{-1}$  y  $0.15 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , y para la enzima comercial fueron de  $76.45 \text{ g L}^{-1}$  y  $3.85 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , respectivamente.

Los rendimientos de L-arabinosa con el extracto crudo y la enzima comercial fueron de 17.04 % y 2.78 %, respectivamente, basados en lo reportado para el contenido promedio de L-arabinosa en la goma de mezquite.

Del fraccionamiento de la goma de mezquite y la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis se obtuvieron tres fracciones en ambos casos. El análisis de la composición de azúcares y proteínas revela diferencias en el balance hidrofílico-lipofílico, las fracciones con una posible importancia para su utilización como agentes emulsificantes son la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis, la fracción 1 de la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis y las fracciones 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis.

En conclusión, el uso de la goma de mezquite para la obtención de L-arabinosa vía enzimática es viable y al mismo tiempo es posible obtener agentes emulsificantes con alto valor agregado.

## ABSTRACT

In this work a study about production of a biocatalyst that is responsible of the hydrolysis of mesquite gum to obtaining L-arabinose released and emulsifies agents was carried out.

Production of crude enzymatic extracts obtained from *Aspergillus niger* has been reported for the degradation of arabinofuranosyl-glucosides, arabinans, arabinoxylans, etc. Growth of *A. niger* is well known in both submerged and solid stated fermentations. Growth parameters of *A. niger* 10 obtained were  $X_{\max} = 3.03 \text{ g L}^{-1}$  and  $\mu_{\max} = 0.07 \text{ h}^{-1}$ .

$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) is responsible of the hydrolysis attributable to the cleavage of the 1 $\rightarrow$ 3 and 1 $\rightarrow$ 5 bonds of the L-arabinose in distinct polysaccharides. Maximum enzymatic activity obtained was  $65.93 \text{ U L}^{-1}$ . Optimal temperature and activation energy for the crude extract were  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $46.15 \text{ KJ mol}^{-1}$  and for the commercial enzyme  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $52.76 \text{ KJ mol}^{-1}$ , respectively. Apparent kinetic parameters for the crude extract were compared with those obtained for a commercial enzyme over the mesquite gum. The  $K_{m\text{-app}}$  and  $V_{\max\text{-app}}$  values to the crude extract were  $4.87 \text{ g L}^{-1}$  and  $0.15 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , and to commercial enzyme were  $76.45 \text{ g L}^{-1}$  and  $3.85 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , respectively.

Yields of L-arabinose recovery for the crude extract and the commercial enzyme were 17.04 % and 2.78 %, respectively, based on the reported average content of L-arabinose in mesquite gum.

Mesquite gum pretreatment with 24 h of enzymatic hydrolysis and mesquite gum without hydrolysis were fractioned by hydrophobic interaction column. Three fractions were obtaining in both cases and the sugar and protein contents were determinate to evaluate indirectly the hydrophilic-lipophilic balance. Mesquite gum pretreatment with 24 h of

enzymatic hydrolysis and first fraction of mesquite gum pretreatment with 24 h of enzymatic hydrolysis and second fractions of mesquite gum without hydrolysis and with hydrolysis could be useful like emulsifier agents.

In conclusion the use of mesquite gum to release L-arabinose via enzymatic is possible and at the same time is possible the obtaining of emulsifier agents with add high value.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	vi
ÍNDICE GENERAL .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xvi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Goma de Mezquite .....	3
2.1.1. Mezquite ( <i>Prosopis</i> sp.) .....	3
2.1.2. Gomas .....	4
2.2. <i>Aspergillus niger</i> .....	7
2.2.1. Clasificación .....	7
2.2.2. Morfología .....	7
2.2.3. Fisiología .....	8
2.3. Fermentación .....	8
2.3.1. Fermentación en medio líquido .....	9
2.3.2. Fermentación en medio sólido .....	10
2.4. Enzimas .....	11
2.4.1. $\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa .....	11
2.4.2. Proteasas .....	13
2.5. L-arabinosa .....	15
2.6. Agente estabilizante .....	16
2.7. Cromatografía de interacción hidrofóbica .....	17
2.7.1. Cromatografía de permeación en gel .....	18
3. JUSTIFICACIÓN .....	20
4. HIPÓTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	23



5.1. Objetivo general .....	23
5.2. Objetivos particulares .....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1. Goma de Mezquite .....	24
6.2. Microorganismo utilizado.....	24
6.3. Propagación de esporas .....	24
6.4. Fermentación en medio líquido .....	25
6.4.1. Cuantificación de biomasa .....	25
6.4.2. Modelamiento de la biomasa.....	25
6.4.3. Determinación de actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa .....	26
6.4.4. Modelamiento de la producción de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa .....	26
6.5. Contenido de proteína en el catalizador enzimático .....	27
6.6. Temperatura óptima y energía de activación.....	27
6.7. Medio Pontecorvo con diferente fuente de carbono .....	28
6.8. Medios con diferente relación carbono-nitrógeno.....	28
6.9. Fermentación en medio sólido.....	28
6.10. Determinación de actividad proteolítica.....	29
6.11. Cinética de hidrólisis enzimática de la goma de mezquite.....	29
6.12. Cuantificación de L-arabinosa.....	30
6.13. Hidrólisis enzimática de la goma de mezquite .....	30
6.14. Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) .....	31
6.14.1. Contenido de azúcares totales .....	31
6.14.2. Contenido de proteína en la goma de mezquite.....	32
6.14.3. Contenido de ácido glucurónico.....	32
6.14.4. Contenido de cenizas y humedad .....	32
6.14.5. Cromatografía de permeación en gel (CPG) .....	33
6.15. Análisis estadísticos.....	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	34
7.1. Producción del extracto enzimático utilizando goma de mezquite como fuente de carbono.....	34

---

7.1.1. Crecimiento de <i>A. niger</i> 10.....	34
7.1.2. Producción de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa.....	37
7.1.3. Efecto de la fuente de carbono .....	39
7.1.4. Efecto de la relación carbono-nitrógeno.....	41
7.1.5. Producción de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en medio sólido .....	42
7.1.6. Actividad proteolítica .....	45
7.2. Hidrólisis de la goma de mezquite .....	46
7.2.1. Hidrólisis con el extracto crudo.....	46
7.2.2. Hidrólisis con la enzima comercial .....	47
7.2.3. Rendimientos de L-arabinosa .....	50
7.3. Caracterización de las fracciones obtenidas mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (CIH) de la goma de mezquite sin hidrolizar y parcialmente hidrolizada.....	51
7.3.1. Fraccionamiento de la goma de mezquite por CIH. ....	51
7.3.2. Fraccionamiento de goma de mezquite hidrolizada enzimáticamente por CIH.....	53
7.3.3. Caracterización de la goma de mezquite sin hidrolizar e hidrolizada enzimáticamente.....	55
7.3.4. Distribución de pesos moleculares por CPG.....	60
8. Conclusiones.....	64
9. Perspectivas .....	66
10. Referencias .....	68
11. Anexos .....	77
12. Glosario .....	96
13. Artículo.....	101

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Pág.
2.1. Componentes de la goma del Mezquite, varía dependiendo de la especie.....	6
7.1. Comparación de $X_{\max}$ y $\mu_{\max}$ para <i>Aspergillus niger</i> utilizando diferentes sacáridos como sustrato.....	36
7.2. Comparación de la actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa obtenida por gramo de carbono en fermentación en medio líquido (FML) con 48 h de fermentación y fermentación en medio sólido (FMS) con 80 h de fermentación.....	44
7.3. Rendimientos obtenidos de L-arabinosa para la hidrólisis enzimática de la goma de mezquite.....	50
7.4. Rendimientos obtenidos por CIH de las fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar y parcialmente hidrolizada.....	54
7.5. Contenido de cenizas y humedad para la goma de mezquite y sus fracciones, tanto sin hidrolizar como hidrolizadas.....	58
7.6. Distribución del peso molecular de las distintas fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar.....	62
7.7. Distribución del peso molecular de las distintas fracciones de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada.....	63
11.1. Diluciones de <i>p</i> -nitrofenol ( $2 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) utilizadas para hacer la curva estándar.....	80
11.2. Diluciones de BSA ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizadas para hacer la curva estándar.....	82
11.3. Composición del medio de cultivo Pontecorvo.....	83
11.4. Diseño experimental de las fuentes de carbono probadas.....	84
11.5. Composición de la solución stock de metales traza.....	84
11.6. Cantidad de $\text{NaNO}_3$ agregada al medio de cultivo Pontecorvo (Anexo F).....	86
11.7. Diluciones para obtener distintas concentraciones de medio de cultivo.....	87
11.8. Diluciones de la curva estándar de tirosina.....	88
11.9. Diluciones de L-arabinosa ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizadas en la curva estándar.....	90
11.10. Diluciones de sacarosa ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizadas para hacer la curva estándar.....	91

11.11. Diluciones de ácido glucurónico ( $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizadas para hacer la curva estándar .....93

11.12. Estándares utilizados en la curva estándar de cromatografía de permeación en gel. ....95

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Pág.
2.1. Estructura de la L-arabinosa.....	15
7.1. Cinética de crecimiento de <i>A. niger</i> 10 en medio líquido utilizando goma de mezquite como fuente de carbono a 30 °C.....	34
7.2. Actividad volumétrica $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa obtenida de <i>A. niger</i> 10 en medio líquido a diferentes tiempos de fermentación. pH inicial = 5.6 y 30 °C. ....	37
7.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en el extracto crudo. El eje “y” representa la actividad específica relativa, que es, la proporción de la máxima actividad específica expresada como porcentaje. ....	38
7.4. Efecto de la fuente de carbono sobre la biomasa y la actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa. A.- Goma de mezquite. B.- Goma de mezquite – L-arabinosa (1:1). C.- L-arabinosa. D.- Goma de mezquite – glucosa (1:1). E.- Glucosa.....	40
7.5. Efecto de la relación carbono-nitrógeno sobre la actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en fermentación en medio líquido. ....	42
7.6. Efecto de la concentración del medio de cultivo sobre la actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en fermentación en medio sólido. ....	43
7.7. Cinética de hidrólisis de la goma de mezquite utilizando el extracto crudo enzimático.....	46
7.8. Efecto de la temperatura sobre la actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en la enzima comercial. El eje “y” representa la actividad específica relativa, que es, la proporción de la máxima actividad específica expresada como porcentaje.....	47
7.9. Cinética de hidrólisis de la goma de mezquite utilizando la enzima comercial. ....	49
7.10. Fraccionamiento de la goma de mezquite sin hidrolizar por CIH. Elución de las tres fracciones a través del tiempo. Cada fracción eluyó con una fase móvil, representada por el cambio de conductividad. La fracción 1 eluyó con NaCl (4.2 M), la fracción 2 eluyó con NaCl (2.0 M) y la fracción 3 eluyó con agua.....	51

7.11. Cromatograma de la fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar obtenido por CIH. Se observó la presencia indistintamente de un hombro a la izquierda o derecha del pico. ....	52
7.12. Fraccionamiento de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada por CIH. Elución de las tres fracciones a través del tiempo. Cada fracción eluyó con una fase móvil, representada por el cambio de conductividad. La fracción 1 eluyó con NaCl (4.2 M), la fracción 2 eluyó con NaCl (2.0 M) y la fracción 3 eluyó con agua. ....	53
7.13. Porcentaje de azúcares totales, proteína y ácido glucurónico para la goma de mezquite sin hidrolizar (A), las fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar (fracción 1 = B, fracción 2 = C y fracción 3 = D), la goma de mezquite hidrolizada (E) y sus fracciones de la goma de mezquite hidrolizada (fracción 1 = F, fracción 2 = G y fracción 3 = H). ND = No determinado. ....	56
7.14. Relación del contenido de azúcar entre la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras. Goma de mezquite sin hidrolizar (A), las fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar (fracción 1 = B, fracción 2 = C y fracción 3 = D), la goma de mezquite hidrolizada (E) y sus fracciones de la goma de mezquite hidrolizada (fracción 1 = F, fracción 2 = G y fracción 3 = H). ....	57
7.15. Perfil de cromatografía de permeación en gel para la fracción 1 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis. ....	59
7.16. Perfil de cromatografía de permeación en gel para la fracción 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis. ....	60
7.17. Perfil de cromatografía de permeación en gel para la fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis. ....	61
11.1. Cinética de liberación de <i>p</i> -nitrofenol. Temperatura = 30 °C. ....	78
11.2. Curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol. ....	79
11.3. Curva estándar de albúmina sérica bovina. ....	81
11.4. Curva estándar de tirosina. ....	89
11.5. Curva estándar de L-arabinosa. ....	90
11.6. Curva estándar de sacarosa. ....	92

11.7. Curva estándar de ácido glucurónico.....	94
11.8. Curva estándar de distribución de pesos moleculares. ....	95

---

---

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Pág.
A. Medio mínimo .....	77
B. Conteo de esporas .....	77
C. Cinética de liberación de <i>p</i> -nitrofenol.....	78
D. Curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol .....	79
E. Curva estándar de Albúmina Sérica Bovina .....	81
F. Medio de cultivo Pontecorvo .....	83
G. Medio de cultivo con diferentes relaciones carbono-nitrógeno.....	85
H. Soporte para la fermentación en medio sólido .....	86
I. Medio de cultivo de la fermentación en medio sólido .....	86
J. Curva estándar de Tirosina .....	87
K. Curva estándar de L-arabinosa .....	89
L. Curva estándar de Sacarosa.....	91
M. Contenido de Proteína por el método de Kjeldahl .....	92
N. Curva estándar de Ácido Glucurónico.....	93
Ñ. Curva estándar de Cromatografía de Permeación en Gel .....	94



## **1. INTRODUCCIÓN**

La biotecnología ha sido definida en varios libros de texto (Bull y col., 1982; Quintero, 1985; Bu'lock y Kristiansen, 1987; Arias-Ortiz y col., 2003; Ballesteros y Fernández, 2006). México, en la actualidad, es miembro de la Convención sobre la Diversidad Biológica, impulsado por la Organización de las Naciones Unidas (Naciones Unidas, 2007) para la utilización sostenible de los componentes de la diversidad biológica y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos. Es por esto, que tomamos la definición propuesta en el convenio sobre la diversidad biológica (1993), que define biotecnología como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

Partiendo de esta definición y manteniendo el espíritu de combatir la falta de oportunidades en países dotados de enormes recursos biológicos, en este trabajo se buscan alternativas biotecnológica a la pobreza extrema que presentan los habitantes de las regiones áridas y semiáridas donde crece el árbol de mezquite, aprovechando la goma excretada de estos árboles para la obtención de productos con alto valor agregado como es la L-arabinosa.

La hidrólisis ácida para la obtención de L-arabinosa ha sido un proceso utilizado desde 1947 (White, 1947), pero en comparación con la hidrólisis enzimática, ésta última tiene alta especificidad sobre el substrato, requiere condiciones de reacción suaves y no hay pérdida del sacárido debido a reacciones laterales (Park y col., 2001).

El uso de biocatalizadores que realizan este tipo de hidrólisis vía enzimática ha sido reportado (Saha, 2000), sin embargo, no se ha encontrado una aplicación específica sobre la hidrólisis enzimática de la goma de mezquite para la obtención de L-arabinosa, por lo que se realizó un estudio en donde se estableció la producción de un biocatalizador capaz de hidrolizar la goma partiendo del conocimiento de su composición (Vernon-Carter y col.,

2000). Se emplearon fermentaciones en medio líquido y fermentaciones en medio sólido. Con el biocatalizador obtenido se determinaron los parámetros enzimáticos para evaluar el proceso de hidrólisis.

De una comparación de la enzima comercial encargada de la liberación de L-arabinosa ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, EC 3.2.1.55) y el extracto crudo obtenido, se lograron obtener rendimientos de L-arabinosa. Además, debido a la semejanzas de la goma de mezquite, en cuanto a la composición y estructura con la goma arábiga (Vernon-Carter y col., 2000), la goma de mezquite ha sido utilizada como emulsificante (Beristain y col., 1996). Posterior a una hidrólisis enzimática parcial, donde el rompimiento de cierta cantidad de azúcares modifique la estructura de la goma de mezquite y cambien sus propiedades reológicas (Dickinson y Stainsby, 1988), se espera poder modificar así su acción emulsificante, De tal manera que se obtengan por un lado L-arabinosa y por otro goma de mezquite modificada enzimáticamente con un uso potencial como emulsificante, para lo cual se hizo una caracterización de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada.

Por último, si bien es cierto que una de las razones más importantes que no justifican el uso de procesos enzimáticos es el alto costo de las enzimas, por lo que también se decidió producir el biocatalizador a partir de *A. niger* 10 utilizando la goma de mezquite como substrato, buscando así una tercera aplicación de este recurso natural.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Goma de Mezquite

#### 2.1.1. Mezquite (*Prosopis* sp.)

A nivel mundial, el género *Prosopis* tiene 44 especies, de las cuales 42 se encuentran en el Continente Americano en dos grandes centros: el norteamericano (México-Texano) y el sudamericano (Argentino-Paraguayo-Chileno). En México los mezquites se distribuyen en una superficie aproximada de 555,500 hectáreas (SFF, 1980), comúnmente en lugares áridos y semiáridos. Su distribución es amplia, exceptuando las montañas y las partes bajas del sureste del país. Donde el mezquite es la especie dominante, caracteriza a una comunidad vegetal denominada mezquital, la cual forma parte del bosque espinoso. Los mezquites constituyen parte importante de la flora nacional, alcanzando inclusive carácter predominante en ciertas regiones; han estado ligados con la vida del campesino mexicano desde tiempos remotos (Villanueva, 1983). El complejo mezquite se encuentra firmemente establecido en más de 3.5 millones de hectáreas del norte de México e incluye las siguientes especies autóctonas: *P. glandulosa*, *P. juliflora*, *P. velutina*, *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. palmeri* y *P. laevigata*. De acuerdo a Signoret (1970), las mayores concentraciones de mezquites se localizan en los estados del norte y centro del país, entre las que sobresalen Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro.

El interés económico, ecológico y taxonómico del género *Prosopis* se ha manifestado en años pasados. A los usos de *Prosopis spp.*, en términos de recursos económicos renovables listados por Felker y Bandurski (1979), debe añadirse el hecho de que estos árboles frecuentemente proveen de exudados (gomas) con valor comercial. La especie *Prosopis*

exuda una goma soluble en agua denominada “goma de mezquite”; la cual ha sido usada como sustituto de la goma arábica (Anderson y Farquhar, 1982).

### **2.1.2. Gomas**

Las gomas son moléculas hidrofóbicas o hidrofílicas de alto peso molecular, usualmente con propiedades coloidales, que en un solvente apropiado o un agente turgente produce geles, suspensiones altamente viscosas o soluciones con contenido de sustancia casi seco (Whistler, 1993). El término goma es vago, inconsistente y utilizado para una amplia variedad de sustancias con éstas características y no ha podido ser definido de manera precisa a lo largo de la historia (Glicksman, 1969; Whistler, 1993).

Las gomas verdaderas se forman como resultado de la desintegración de tejidos internos, en especial de la descomposición de la celulosa por un proceso conocido con el nombre de gomosis. (Belitz y Grosch, 1985; Braverman, 1980; Hill, 1965). La gomosis es un fenómeno poco difundido en el reino vegetal, mediante el cual las plantas responden a los diferentes tipos de estrés ambientales. Existen diferentes opiniones en lo que respecta al mecanismo fisiológico de la formación de las gomas. En algunos casos puede ser sencillamente la exudación y desecación por heridas producidas accidentalmente o deliberadamente, y con esta exudación la naturaleza protege esas heridas. Algunos investigadores sostienen que es un proceso patológico, ya que la gomosis, o sea el proceso de degeneración de la célula es más rápida en las superficies heridas que están expuestas a la infección por bacterias, hongos y parásitos. Otros trabajos sugieren que las gomas se almacenan en depósitos colocados en las raíces y tallos de algunas plantas, y cuando se acumulan en gran cantidad, rompen los tejidos y salen al exterior (Braverman, 1980; Hill, 1965; Ruiz, y col., 1950).

Las gomas contienen una gran cantidad de carbohidratos y están íntimamente relacionados con las pectinas. Son de naturaleza coloidal y solubles en agua, ya sea

disolviéndose completamente o hinchándose, pero no se disuelven en alcohol ni en éter. Son exudadas por los tallos, de modo natural o bien artificialmente a través de incisiones practicadas en ellos. Las gomas comerciales se expenden en el mercado en forma de polvo. Son frecuentes en las plantas de las regiones secas. Las tres gomas exudadas de árboles con importancia económica son: la goma arábica, la goma tragacanto y la goma karaya (Belitz y Grosch, 1985; Braverman, 1980; Hill, 1965).

El mezquite exuda de su tronco una resina amarillada semejante a la goma arábica que se acumula en las rugosidades de la corteza. En términos generales, se puede establecer que la goma de mezquite es una sal neutra de un polisacárido ácido ramificado complejo, formado por un núcleo de residuos de  $\beta$ -D-galactosa (43.3 %), que consta de una cadena principal de enlaces 1 $\rightarrow$ 3 con ramificaciones de enlaces 1 $\rightarrow$ 6 (Vernon-Carter y col., 2000), relacionados con L-arabinosa (40.4 %), L-ramnosa (1.3 %),  $\beta$ -D-glucuronato (16.2 %) (Anderson y Weiping, 1989; Vernon-Carter y col., 2000; Orozco-Villafuerte y col., 2003), y 4-O-metil- $\beta$ -D-glucuronato (Anderson y Weiping, 1989; Vernon-Carter y col., 2000) como azúcares simples o cadenas laterales de oligosacáridos. La goma de mezquite también contiene una pequeña cantidad de proteína (0.7-5.8 %), la cual puede estar en el centro de todas las ramificaciones de la estructura primaria (Vernon-Carter y col., 2000).

Los análisis químicos realizados a la goma establecen que es una sal neutra de un polisacárido ácido (tabla 2.1.), altamente ramificado y constituido por residuos de L-arabinosa, D-galactosa, ácido 4-O-metil-D-glucourónico y L-ramnosa en una relación molar 2:4:1:1 (Vernon-Carter y col., 2000).

En términos de composición de azúcar, las gomas de *Prosopis* contienen los mismos residuos de azúcar que los exudados de *Acacia* y son menos complejos que los de otros géneros e.g. *Combretum*, *Terminalia*, *Anacordium* (Anderson y Farquhar, 1982).

La goma de *Prosopis* ha sido usada por varias compañías químicas y farmacéuticas como fuente de arabinosa y galactosa después de un proceso de hidrólisis, se ha propuesto

además como una alternativa más económica a los tradicionales polímeros solubles en agua (goma arábica) (Anderson y Weiping, 1989).

Tabla 2.1. Componentes de la goma del Mezquite, varía dependiendo de la especie.

Componente	%
L-arabinosa	40 – 48
D-galactosa	32 – 45
Acido 4-O-metil-D-glucurónico	10.9 – 15
L-Ramnosa	1 – 13
Proteína	1.2 – 5.9
Humedad	8.5 – 12.9
Ceniza	2.2 – 3.4

Tomado de Anderson y Farquhar, 1982.

El contenido de metoxilo de la goma de *Prosopis* tiende a ser más alto que en la mayoría de las especies comerciales de *Acacia*. El alto contenido de metoxilo puede actuar de manera similar a los altos contenidos de ramnosa incrementando el poder emulsificante de la goma en la formación de emulsiones de aceite en agua; las gomas de las diferentes especies de *Prosopis* tienen pesos moleculares comparables y dan una viscosidad intrínseca similar a las presentadas por las gomas de *Acacia*, cuya acidez es similar a la de *Prosopis* (Anderson y Farquhar, 1982).

El alto contenido de L-arabinosa en la goma del mezquite y la facilidad con la cual es hidrolizada, hacen de este producto una fuente potencial para la producción de L-arabinosa en forma industrial (Greenwod y Morey, 1979).

## 2.2. *Aspergillus niger*

Las especies de *Aspergillus* están distribuidas a escala mundial. Se encuentran en el suelo y entre la materia vegetal, siendo *Aspergillus niger* la especie más común. Este organismo es el contaminante más frecuente en los laboratorios de microbiología. Es un hongo filamentoso perteneciente al grupo de los Deuteromicetos, familia *Eurotium*. Este organismo no presenta ciclo sexual, por lo que se le incluye entre los llamados hongos imperfectos junto con otros *Aspergilli* y algunas especies de los géneros *Mucor* y *Penicillium* (Herrera y Ulloa, 1990).

### 2.2.1. Clasificación

La clasificación del género *Aspergillus* es complicada principalmente porque los requisitos que debe cumplir un hongo para ser considerado como un *Aspergillus niger* son vagos, presentar esporas de color negro, no tener ciclo sexual conocido y no pertenecer a otro género. Este sistema de clasificación deja muchos organismos parecidos dentro de la misma especie, sin que obligatoriamente lo sean. Últimamente, se ha desarrollado una nueva serie de sistemas de clasificación molecular por medio de análisis de fragmentos de restricción o expresión de genes específicos. La clasificación de *Aspergillus niger*, es por lo tanto, propia de un complejo taxonómico más que de una especie. De acuerdo con Kuster-van Someren y col. (1990) se debe utilizar el nombre *Aspergillus niger* variedad *awamori* en lugar de identificar a la especie *Aspergillus awamori*, aclarando que siempre se ha reportado esta cepa como *A. awamori*.

### 2.2.2. Morfología

Se caracteriza por presentar: hifas septadas, esporas asexuales llamadas conidiosporas (se encuentran en una estructura llamada conidióforo con una vesícula hinchada en el ápice

(Ulloa y Hanlin, 1978), que al llegar a la madurez adquiere la forma de un hisopo. Ulloa y Hanlin (1978) aclaran que estos conidios son producidos por fiálides que pueden ser uniseriadas cuando se originan directamente sobre la vesícula o biseriadas cuando se originan sobre métulas que a su vez provienen de la vesícula), aspensor o regadera (que origina el nombre del género). La forma vegetativa o micelio de *A. niger* es de color blanco o amarillento, al llegar a la madurez se producen estructuras reproductoras llamadas conidióforos que dan origen, en el tipo silvestre, a esporas negras, lo que da el nombre de la especie. Cuando a algún representante de este grupo se le observa ciclo sexual se le traslada al grupo Ascomiceto y el nombre se cambia de *Aspergillus* a *Emericela*. Tal es el caso de *Aspergillus nidulans* que presenta ciclo sexual por lo que sería más adecuado llamarle *Emericela nidulans*. Sin embargo, la mayoría de las personas lo conocen y citan con su primer nombre por lo cual se ha conservado (Herrera y Ulloa, 1990).

### **2.2.3. Fisiología**

Los hongos son heterótrofos aerobios, esto es que el carbono que necesitan como fuente de energía para sintetizar el material celular en el crecimiento y mantenimiento de sus funciones, lo obtienen de compuestos orgánicos y su metabolismo de respiración tiene como aceptor final de electrones al oxígeno.

## **2.3. Fermentación**

La fermentación es aquel conjunto de reacciones catabólicas productoras de ATP en las cuales las moléculas orgánicas actúan tanto como donadores primarios de electrones, como aceptores finales de éstos (Lehninger, 1979). Durante estas reacciones se producen compuestos de utilidad práctica para el hombre y es una costumbre hablar de fermentaciones



para referirse, en el ámbito industrial, a los procesos microbiológicos de producción de tales compuestos (Brock y col., 1987; Scriban, 1985).

La mayoría de las fermentaciones industriales en la sociedad occidental han utilizado y desarrollado la denominada “fermentación en medio líquido” o “fermentación sumergida” (Hesseltine, 1972). Además de ésta existe otra técnica general de fermentación denominada “fermentación en medio sólido”.

### **2.3.1. Fermentación en medio líquido**

Se puede definir a la fermentación líquida o sumergida como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede o no ser aireado por medios mecánicos. La forma de fermentación líquida más utilizada en los laboratorios de investigación es el matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, pues no es raro ver fermentadores con volúmenes superiores a 10 mil litros, en los cuales se producen todo tipo de compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: 1) Dispersa el gas en burbujas más pequeñas incrementando el área de interfase gas-líquido. 2) Incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas y 3) Disminuye el grosor de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia del cultivo.

Además, la agitación mezcla el cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto es particularmente importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Henzler y Schedel, 1991). Los productos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente, por lo que, no son un factor limitante para el crecimiento del microorganismo. La barrera principal

de transferencia del O<sub>2</sub> en la fermentación líquida, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar, aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético que debe realizarse en la fermentación líquida está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos, esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger*, que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento y producir muchos de los metabolitos de interés (Righelato, 1975; Solomon, 1975; Raimbault, 1998).

### 2.3.2. Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido es toda aquella en la cual el sustrato no es líquido (Hesseltine, 1972). La fermentación en medio sólido puede ser definida más precisamente como una técnica de cultivo de microorganismos sobre la superficie de partículas sólidas humedecidas a un grado tal que permite el crecimiento de dichos microorganismos en contacto con una fase aérea porque el nivel de humedad no excede el nivel de retención máxima de agua de la matriz sólida (Viniestra-González, 1997). La fermentación en medio sólido se considera como la transformación microbiana en condiciones aerobias de materiales sólidos y que puede definirse en términos de las siguientes propiedades del sustrato que será transformado:

La matriz sólida porosa puede o no ser biodegradable con una gran superficie de área por volumen. En el intervalo de  $10^3$  hasta  $10^6$  m<sup>2</sup> L<sup>-1</sup> que favorece un rápido crecimiento microbiano sobre la interfase sólido/gas. La matriz deberá absorber agua varias veces su peso seco para presentar una alta actividad de agua (A<sub>w</sub>) con respecto a la interfase sólido/gas y de esta manera facilitar los procesos bioquímicos.

Se podrá suministrar una corriente convectiva de una mezcla de oxígeno y otros gases o se permitirá el intercambio pasivo de gases entre una capa delgada y porosa del material

fermentable. La interfase sólido/gas deberá permitir el rápido crecimiento de cepas específicas de hongos, levaduras o bacterias, ya sea en forma aislada o mezclas de microorganismos.

Las propiedades mecánicas de la matriz sólida pueden permitir la agregación de material poroso sin comprimirse. La mejor estructura podría ser compuesta de pequeñas partículas fibrosas o granulares que no tiendan a romperse o a compactarse entre ellas. De otra manera se necesitará usar capas delgadas no compactas. La matriz sólida no deberá estar contaminada ni presentar inhibidores de crecimiento microbiano, y deberá absorber nutrimentos para los microorganismos, tales como carbohidratos (celulosa, almidón, azúcares, etc.), fuentes de nitrógeno (amonio, urea, péptidos, etc.) y sales minerales (Viniegra-González, 1997).

A escala industrial se le da aplicación a la fermentación en medio sólido para la producción de enzimas de uso en la tecnología de alimentos, diagnóstico clínico, análisis químico, etc., para la producción de metabolitos como ácidos de gran demanda industrial como son el ácido cítrico, ácido gálico, ácido glucónico, etc.; antibióticos y proteína de origen microbiano, por mencionar algunos (Hesseltine, 1972).

## **2.4. Enzimas**

### **2.4.1. $\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa**

El interés de las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas se ha incrementado en años recientes debido a sus aplicaciones en forma parcial a varios procesos agroindustriales, como su eficiente conversión de biomasa hemicelulósica a combustibles y químicos, mejora la digestibilidad de la materia prima animal, clarificación de jugos y mejoramiento en la consistencia de la cerveza (Saha, 2000).

La utilización de azúcares hemicelulósicos es esencial para la conversión eficiente de materiales lignocelulósicos a etanol y otros productos de alto valor. La dilución con ácido a altas temperaturas convierte la hemicelulosa a azúcares monoméricos, sin embargo, este tratamiento produce sustancias que son tóxicas para los microorganismos fermentativos. Otros pre-tratamientos, como los alcalinos, solubilizan los xilanos y producen xilano-oligosacáridos. Estos oligosacáridos no son fermentables, y deben convertirse a azúcares monoméricos con enzimas u otros métodos antes de la fermentación. Las enzimas degradadores de xilanos son una gran promesa en pre-tratamientos de sacarificación. Las enzimas que atacan los enlaces  $\alpha$ -L-arabinofuranosídicos pueden activarse sinérgicamente con xilanasas en la hidrólisis de arabinoxilanos (Saha, 2000).

La  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa es una enzima involucrada en la liberación de arabinosa de diversos sustratos como los arabinanos, arabinoxilanos y arabinogalactanos (Saha, 2000). Beldman y col. (1997) clasificaron las arabinofuranosidasas basados en la especificidad sobre el sustrato: 1) Arabinofuranosidasas, inactivas contra polímeros; 2) Arabinofuranosidasas, activas contra polímeros; y 3) Arabinofuranohidrolasas, específicas por arabinoxilanos. (Saha, 2000).

Las arabinofuranosidasas de *Aspergillus pullulans*, tiene acción hidrolítica sobre ambos enlaces,  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5) de los residuos terminales no reductores. No actúan en los enlaces internos de  $\alpha$ -arabinosil. Las arabinofuranosidasas de *Aspergillus niger* hidrolizan ambos enlaces (1 $\rightarrow$ 3) y (1 $\rightarrow$ 5)-arabinosil de los arabinoxilanos (Saha, 2000).

Kormelink y col. (1991) describieron un tipo de arabinofuranosidasa de *Aspergillus awamori* que es altamente específica para arabinoxilanos, y contrario a otras enzimas, no muestra actividad hidrolítica sobre arabinanos y arabinogalactanos (Saha, 2000).

La arabinofuranosidasa de *Penicillium purpurogenum*, es altamente específica para  $\alpha$ -L-arabinofuranósidos y libera arabinosa de los arabinoxilanos. La enzima de *Cytophaga*

*xylanolytica* libera arabinosa del maíz, el trigo y otros arabinosilanos, pero no actúa sobre los arabinogalactanos. La arabinofuranosidasa de *Trichoderma reesei* ataca de manera preferencial las ramificaciones de la cadena principal del arabinano, mucho más que los residuos terminales arabinosil presentes en la cadena principal (Saha, 2000).

## 2.4.2. Proteasas

La hidrólisis de proteínas es un fenómeno de amplia difusión en la naturaleza y tiene una serie de aplicaciones tecnológicas, sobre todo en tecnología de alimentos (García-Carreño, 1992). Las enzimas encargadas de la hidrólisis de proteína se agrupan en: proteinasas (EC 3.4.2.1 -24) y peptidasas (EC 3.4.1.1 -17) dependiendo del sitio del enlace peptídico hidrolizable; enlace peptídico interno o en los extremos de la proteína. El término proteasa es sólo aceptable cuando se desconoce la especificidad de la enzima (García-Carreño, 1996). La proteólisis de una proteína puede ser deseable en tecnología de alimentos, mientras que es indeseable cuando la hidrólisis de proteína tiene efectos nocivos para el proceso o producto, y más aún cuando la proteína es la razón de estudio, como en los procesos de caracterización y purificación de proteínas y de enzimas.

Para muchos científicos del área de biología celular, bioquímica y microbiología, las proteasas no son enzimas de gran interés y muy pocas veces son herramientas de trabajo o razón de estudios. En muchas ocasiones, las proteasas representan un grave problema en sus investigaciones. Ciertos estudios pueden realizarse satisfactoriamente sin poner atención a la presencia de proteasas, pero el problema de la proteólisis es un problema universal involucrado en el estudio de proteínas y de enzimas de diversos organismos. Dado lo anterior, es importante poder diagnosticar la presencia de proteólisis *in vitro*, así como prevenirla.

Las proteínas celulares son un sustrato potencial para una o más proteasas endógenas. Sin embargo, dentro de la célula, la proteólisis es altamente controlada por diversos factores, como son la presencia de inhibidores endógenos de proteasas y la influencia fisicoquímica de

la célula que le confieren una conformación especial a las proteínas. Cuando los tejidos son macerados para la extracción de las enzimas, esos controles se pierden y los compartimentos subcelulares son destruidos, por lo que los complejos enzima-inhibidor son disociados y las interacciones entre proteínas y otras moléculas son alteradas. Además el efecto del amortiguador de extracción sobre la conformación de las proteínas puede incrementar la vulnerabilidad hacia la proteólisis (Pringle, 1975).

A los problemas de proteólisis no siempre se les da la importancia, sin embargo, son un verdadero problema en algunos casos de caracterización y purificación de proteínas. Pringle (1975) comentó que no existe una poción mágica para eliminar el problema de la proteólisis indeseada, sino que debe seguirse un protocolo definido dependiendo de la fuente celular del extracto en estudio.

Existen factores intrínsecos determinantes de las proteínas que incrementan su susceptibilidad a la proteólisis, ya que la estabilidad de las proteínas es diferente *in vivo* que *in vitro*. Se ha observado que las proteínas que más rápidamente salen al medio extracelular son más susceptibles a la proteólisis. Las proteínas más pequeñas son más resistentes a la proteólisis, observado frecuentemente por la desaparición de bandas pesadas, mientras que las ligeras permanecen, cuando se corren en SDS-PAGE. La estructura tridimensional de las proteínas también es un factor importante, ya que se ha observado que las proteínas globulares son más resistentes a la proteólisis, posiblemente porque algunos enlaces peptídicos no están disponibles a la acción de las proteasas, por otro lado, las proteínas fibrosas son más vulnerables a la proteólisis. Cualquier cambio estructural de la proteína afecta su susceptibilidad a la proteólisis, pues se pueden exponer sitios de fácil acceso para las proteasas, mientras que la glicosilación puede proveer protección a la proteólisis *in vitro*, y moléculas como el glicerol y el dimetilsulfóxido mantienen estable la conformación de las proteínas incrementando su estabilidad (Pringle, 1975).

Es indispensable conocer el tipo catalítico de las proteasas para poder determinar el inhibidor que se utilizará para evitar la proteólisis y evitar la pérdida de la actividad

enzimática de interés. El problema de la proteólisis puede ser desde la hidrólisis de un simple enlace peptídico hasta la hidrólisis total del polipéptido. Para identificar la proteólisis indeseada no solo dependerá de la extensión de la proteólisis sino también del tipo de ésta. Algunos síntomas que revelan proteólisis son: ausencia de la proteína específica, bajos rendimientos o pérdida de actividad enzimática, cambios en la actividad específica, cambios revelados por electroforesis así como discrepancias de las propiedades reportadas por otros autores. En los SDS-PAGE se pueden presentar los siguientes síntomas que indican problemas de proteólisis: pobre resolución de bandas, pérdida de bandas de alto peso molecular y un incremento en el número de las bandas de bajo peso molecular, discrepancias entre los valores de peso molecular reportadas por diferentes autores, discrepancia entre los valores de peso molecular de la misma proteína purificada por diferentes procedimientos, una disminución del peso molecular aparente durante el almacenamiento, micro-heterogeneidad de bandas en soluciones de proteínas puras (Hames, 1981, García-Carreño y col., 1993).

## 2.5. L-arabinosa

La L-arabinosa es un monosacárido reductor con estructura de pentosa, ampliamente distribuido en plantas, usualmente en forma de polisacáridos complejos. Su peso molecular es de  $150 \text{ g mol}^{-1}$  y forma un anillo de cinco carbonos (figura 2.1.), es soluble en agua y presenta mutarrotación (Badui, 1988).

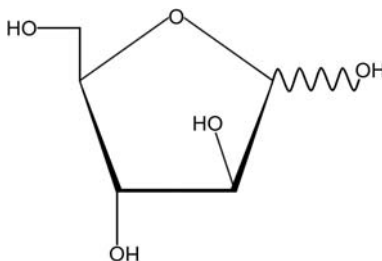


Figura 2.1. Estructura de L-arabinosa.

La L-arabinosa está distribuida en forma de polisacáridos complejos (arabinoxilanos, arabinogalactanos, etc.) en la goma arábica, la goma de mezquite, en la fibra del maíz. Existen dos formas de producir L-arabinosa a partir de estos materiales: hidrólisis ácida y/o hidrólisis enzimática. En comparación con la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática tiene la ventaja de una alta especificidad sobre el sustrato, condiciones de reacción estables, y no se presenta pérdida del sacárido debido a estas reacciones (Park y col., 2001).

## **2.6. Agente estabilizante**

Las emulsiones son sistemas dispersos de por lo menos dos fases líquidas inmiscibles y son termodinámicamente inestables debido a que el contacto entre las moléculas, esto es agua y aceite, no es favorable energéticamente, sin embargo, es posible formar emulsiones que son cinéticamente estables (meta-estables) por un periodo razonable de tiempo (días, semanas, meses, o años) mediante la incorporación de sustancias conocidas como emulsificantes y/o agentes estabilizantes.

Un agente estabilizante es un compuesto químico o mezcla que confiere estabilidad a la emulsión a largo plazo, posiblemente por un mecanismo de adsorción, pero no necesariamente. Los estabilizantes son generalmente biopolímeros y el mecanismo por el cual estabilizan los polisacáridos es vía modificación de las propiedades reológicas del medio de dispersión (Dickinson y Stainsby, 1988).

Para que un biopolímero sea un buen agente emulsificante debe ser superficialmente activo. Esto es, que tenga la capacidad de disminuir la tensión en la interfase aceite-agua, de manera sustancial y rápida cuando se usa en concentraciones típicas durante la emulsificación. Además, para que un biopolímero sea superficialmente activo, debe tener un carácter anfifílico. En caso de ser un hidrocoloide, como la goma de mezquite, debe de contener un número suficiente de grupos hidrofóbicos (fracción proteica) suficientemente accesibles en una escala de tiempo corto, que permita que las moléculas se adhieran a y distribuyan en la interfase, protegiendo a las gotas recién formadas. Por lo tanto, un agente emulsificante ideal,



capaz de formar gotas pequeñas, está compuesto por especies de baja masa molecular con buena solubilidad en la fase continua acuosa (Dickinson, 1992).

## **2.7. Cromatografía de interacción hidrofóbica**

La denominación de cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) se emplea para aquellas separaciones en las que la adsorción de los solutos se debe a interacciones hidrofóbicas, o mejor dicho a la asociación entre compuestos hidrofóbicos, promovida por su entorno acuoso, para disminuir los contactos agua-soluto apolar (García y col., 1996).

Al igual que en la precipitación de proteínas por disminución de la solubilidad, la interacción hidrofóbica se favorece en presencia de altas concentraciones de sal, que desplazan el agua que solvata las zonas hidrofóbicas, disminuyendo el número de moléculas de agua disponibles para solvatar las superficies hidrofóbicas, favoreciendo las interacciones hidrofóbicas por las fuerzas iónicas altas (García y col., 1996).

En general, todos los bio-polímeros tendrán un mayor o menor grado de hidrofobicidad, lo que hace que este tipo de cromatografía pueda ser utilizado para muy diversos problemas experimentales. En el caso de las proteínas, su hidrofobicidad global vendrá determinada por el número de aminoácidos apolares que tengan en su superficie. Para una proteína plegada en su conformación nativa, la mayor parte de estos aminoácidos se encontrarán interaccionando hidrofóbicamente en el interior del glóbulo proteico. Sin embargo, siempre pueden quedar aminoácidos más o menos hidrofóbicos en la superficie, expuestos al medio acuoso. La hidrofobicidad de estos aminoácidos expuestos es la que da cuenta de la interacción en cromatografía hidrofóbica. En otras palabras, se trata de una cromatografía no desnaturizante, en la que se preservan las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas (García y col., 1996).

Uno de los factores que permiten hablar de la cromatografía hidrofóbica como una cromatografía no desnaturalizante, es el empleo de fases estacionarias de moderado carácter hidrofóbico. En cromatografía hidrofóbica se suele trabajar con fases estacionarias basadas en polímeros hidrofílicos (ej.: agarosa, polímeros acrílicos), a los que se han unido covalentemente grupos hidrocarbonados como metilo, butilo o fenilo. Cuanto mayor sea la longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor será la hidrofobicidad (García y col., 1996).

En este tipo de cromatografía, la mayoría de las veces, las muestras que se aplican proceden de un paso previo de precipitación con sulfato de amonio, de tal manera que se asegura que la muestra se encuentre en condiciones idóneas para su retención. Si no es así, se añadirá a la muestra dicha sal o NaCl, hasta alcanzar una fuerza iónica suficientemente alta y compatible con la solubilidad de los componentes (García y col., 1996).

La elución se puede llevar a cabo mediante gradientes continuos o discontinuos de fuerza iónica decreciente.

### **2.7.1. Cromatografía de permeación en gel**

La cromatografía de permeación en gel (CPG) es un método que se utiliza para separar, purificar y analizar las mezclas de sustancias. Se emplea principalmente en la estimación de pesos moleculares (Angulo, 1999).

Esta técnica se originó en la década de los 60's con el trabajo de Moore, quien en 1964 describió el procedimiento para la obtención de geles con tamaño de poro controlado, también demostró la utilidad de la técnica de separación para determinar pesos moleculares. Actualmente existe toda una gama de materiales para analizar polímeros con diferentes características de solubilidad y peso molecular.

El proceso de separación dentro de las columnas empacadas con el material poroso es el resultado de las diferencias en tamaño y, consecuentemente, en el grado de penetración de las moléculas en solución a los poros del empaque. Las moléculas de mayor tamaño al del poro del gel no tienen acceso a éste y pasan a través de la columna por el espacio que ocupa el disolvente entre las partículas del empaque. Las moléculas de menor tamaño, penetran en el gel con un mayor o menor grado, dependiendo de su tamaño. Por consiguiente, las moléculas más grandes eluyen de la columna antes que las pequeñas, con lo que es posible determinar la curva de distribución de pesos moleculares obtenidos por otros métodos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los árboles del género *Prosopis* son utilizados para una gran variedad de propósitos y su uso es tradicional en los lugares donde crece (Felker, 1993). Así mismo, es de gran importancia económica para los habitantes de las regiones donde crece ya que es utilizado como fuente de alimento, forraje, combustible, material para construcción y hasta como medicamento. Además, estas especies tienen un gran valor ecológico debido a que ayudan al control de la erosión y a mejorar la fertilidad del suelo. Sin embargo, muchos de los habitantes que viven donde este recurso crece, se encuentran en condiciones de pobreza extrema y para poder tener sustento ellos deforestan el hábitat cortando los árboles para usarlos como forraje, madera y carbón vegetal, lo cual ha causado una irreversible pérdida de diversidad genética (Buendía-González y col., 2007). Así, un esfuerzo actual consiste en buscar nuevas alternativas tecnológicas que incluyan la explotación no destructiva de este recurso en espera de proveer a los habitantes de éstas regiones con beneficios económicos, de tal manera que se evite su deforestación (Vernon-Carter y col., 2000).

La L-arabinosa contenida en la goma de mezquite tiene actualmente aplicaciones potenciales e industriales. El sabor dulce de la L-arabinosa es similar al de la sacarosa, pero presenta aproximadamente la mitad de su poder edulcorante. En la naturaleza encontramos a la arabinosa en su forma L, la cual no es metabolizada por los animales, incluyendo al humano, por lo que es un azúcar no calórico. Además, inhibe fuertemente de manera no competitiva la sacarosa intestinal y por consecuencia su absorción en el intestino delgado. La adición del 2 al 3 % de L-arabinosa a la sacarosa causa alrededor del 60 % de reducción de la digestión de la sacarosa en el intestino delgado (Susumu, 1999).

La L-arabinosa es ampliamente usada en el desarrollo de agentes antivirales como los nucleótidos análogos (Drogas que combaten el VIH, Poz Ireland, 2005) y es sustrato para la elaboración de L-ribosa, la cual se utiliza en aplicaciones farmacéuticas, esto es

oligonucleótidos sintéticos (Danisco, 2007). La utilización simultánea de L-arabinosa y D-xilosa con cepas recombinantes de *Sacharomices cerevisiae* mejora la producción de bio-etanol a partir de biomasa de lignocelulosa (Karhumaa y col., 2006).

Por otra parte, la goma de mezquite, dada su similitud en composición y estructura con la goma arábica (Vernon-Carter y col., 2000), ha sido utilizada en la estabilización de emulsiones sencillas y múltiples, de aceite en agua y agua/aceite/agua, respectivamente (Beristain y col., 1996), también se ha demostrado que da una mejor protección a la degradación de colorantes naturales emulsificados (Vernon-Carter y col., 1996; Vernon-Carter y col., 1998; Vernon-Carter y col., 2000) y que se puede utilizar en la micro-encapsulación de aceites esenciales (Beristain y Vernon-Carter, 1994; 1995; Beristain y col., 2001; Beristain y col., 2002) y alimento para larvas de camarón (Pedroza-Islas y col., 1999; Pedroza-Islas y col., 2000). Dado su alto grado de solubilidad, atrapa más fácilmente los compuestos aceitosos y estabiliza por mayor tiempo las mezclas. Además, al ser menos viscosa que la goma arábica, permite una homogenización más consistente de las mezclas, lo que permite hacer uniforme el tamaño de partícula.

Por lo anterior, substratos de polisacáridos complejos como la goma de mezquite podrían ser usados para inducir actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en fermentaciones para preparar hidrolizados conteniendo L-arabinosa y al mismo tiempo, la goma parcialmente hidrolizada pueda ser utilizada como estabilizante con alta actividad superficial mejorando sus propiedades emulsificantes.

## 4. HIPÓTESIS

Si *Aspergillus niger* 10 puede utilizar la goma de mezquite como substrato para la producción de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa entre otras enzimas, las cuales presenten la capacidad de hidrolizar (de manera individual o sinérgica) arabinogalactanos como la misma goma de mezquite, es posible obtener L-arabinosa en largos tiempos de reacción y estabilizantes con alta actividad superficial en tiempos cortos de reacción a partir de la goma de mezquite utilizando un extracto enzimático crudo o bien una enzima comercial  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Obtener un extracto enzimático crudo con actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa para modificar enzimáticamente la goma de mezquite, y obtener con dicho extracto crudo productos de alto valor agregado como L-arabinosa y estabilizantes con alta actividad superficial.

### 5.2. Objetivos particulares

Obtener un extracto enzimático con actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa a partir de *Aspergillus niger* 10 utilizando goma de mezquite como fuente de carbono y analizar el proceso fermentativo en términos de la formación de biomasa y producto.

Comparar los rendimientos de L-arabinosa obtenida de la hidrólisis de la goma de mezquite con el extracto crudo y con una enzima comercial.

Caracterizar las fracciones obtenidas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada y sin hidrolizar.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Goma de Mezquite

En todos los experimentos se utilizó goma de árboles de mezquite localizados en los alrededores del municipio de Río Verde en San Luis Potosí, colectada durante la estación seca (octubre de 1999 y mayo de 2000). La goma fue purificada disolviéndola en agua y filtrada a través de papel filtro Whatman No. 1. Se dializó en agua bi-destilada y desionizada en membrana de celulosa de 10, 000 Da, con recambios cada 4 h durante 24 h. Posteriormente se secó en un liofilizador LABCONCO<sup>®</sup> LYPHLOCK 6 (Cole Parmer, Chicago, ILL) como lo reportan Orozco-Villafuerte y col. (2003).

### 6.2. Microorganismo utilizado

Se utilizó el hongo *Aspergillus niger* 10 obtenido de la Planta Piloto de Fermentaciones del Departamento de Biotecnología de la UAM – Iztapalapa. La cepa se conservó en tubos de ensaye (tapa de rosca) con agar papa dextrosa (PDA) inclinado (pico de flauta). Se utilizó la técnica de sembrado por estría bajo condiciones de esterilidad. Los tubos inoculados fueron almacenados a 4 °C.

### 6.3. Propagación de esporas

La cepa se propagó en matraces Erlenmeyer de 150 mL con 50 mL de medio PDA por un periodo de 5 días a una temperatura de 30 °C. Las esporas fueron cosechadas utilizando 20 mL de Tween 80 al 0.01 % y un agitador magnético en un matraz esterilizado previamente y bajo condiciones asépticas. Una vez cosechadas las esporas, para que el PDA no se re-



hidrate y evitar así una variación en la concentración de la suspensión, se procedió a colocar las esporas cosechadas en un matraz estéril sin PDA para su utilización en la fermentación en medio líquido.

## **6.4. Fermentación en medio líquido**

La fermentación en medio líquido se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio mínimo (Anexo A) durante 152 h. Todas las fermentaciones en medio líquido se inocularon con  $2 \times 10^7$  esporas (Anexo B) y se mantuvo la temperatura constante a 30 °C con agitación continua a 150 rpm.

### **6.4.1. Cuantificación de biomasa**

Se llevó a cabo gravimétricamente por el método de peso seco. Se pesó papel filtro Whatman No. 41 previamente secado durante 24 h a 60 °C. La muestra, producto de la fermentación, fue vertida sobre la membrana de celulosa. El extracto enzimático fue recuperado en un matraz kitazato y la membrana con biomasa fue lavada dos veces con agua, NaCl 0.85 % y nuevamente agua. Por último el filtro se colocó en un horno a 60 °C durante 24 h para ser pesado nuevamente y por diferencia conocer los gramos de biomasa obtenidos.

### **6.4.2. Modelamiento de la biomasa**

La biomasa obtenida fue modelada con la forma integrada del modelo logístico (Díaz-Godínez y col., 2001; Mirón y col., 2002; Liu y col., 2003):

$$X(t) = \frac{X_{\max}}{1 + \left( \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \right) \cdot e^{(-\mu_{\max} \cdot t)} \right)} \quad (1)$$

donde  $X$  es la concentración de biomasa a cualquier tiempo =  $t$ ,  $t$  es el tiempo de fermentación,  $\mu_{\max}$  es la máxima velocidad específica de crecimiento,  $X_{\max}$  es la máxima concentración de biomasa y  $X_0$  es la concentración de biomasa cuando  $t = 0$ . La estimación de los parámetros de crecimiento fue hecha mediante un ajuste no-lineal de mínimos cuadrados utilizando la aplicación “Solver” dentro de la hoja de cálculo “Microsoft Excel”.

#### 6.4.3. Determinación de actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa

La reacción consistió de la mezcla de 150  $\mu$ L del extracto con 150  $\mu$ L de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido 4 mM en amortiguador citrato–fosfato (0.2 M y 0.1 M, respectivamente) pH 5.6 a 30 °C durante 10 min. La reacción se detuvo con 900 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M. La actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa se determinó espectrofotométricamente (Shimadzu UV–160A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) midiendo la cantidad de *p*-nitrofenol liberado a una absorbancia de  $\lambda = 400$  nm (Tagawa y Kaji, 1988). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo. Previamente se hizo un barrido para determinar el tiempo de reacción, siendo éste de 10 min (anexo C), también se preparó una curva estándar con *p*-nitrofenol (anexo D).

#### 6.4.4. Modelamiento de la producción de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa

El modelo de Soto-Cruz (Soto-Cruz y col., 2002) fue utilizado para la estimación de la producción del extracto crudo con actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa:

$$P(X) = P_0 + \alpha \cdot (X - X_0) + \frac{\beta \cdot X_{\max}}{\mu_{\max}} \cdot \text{Ln} \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right) \quad (2)$$

donde  $P_0$  es la actividad enzimática al tiempo  $t = 0$ ,  $\alpha$  es el coeficiente asociado al crecimiento para la enzima y  $\beta$  es el coeficiente no asociado al crecimiento para la enzima. La estimación de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  fue hecha como en el caso anterior usando un ajuste no-lineal de mínimos cuadrados con la aplicación “Solver” dentro de la hoja de cálculo “Microsoft Excel”.

## 6.5. Contenido de proteína en el catalizador enzimático

El contenido de proteína fue determinada de acuerdo al método de Lowry (Lowry y col., 1951), usando albúmina sérica bovina como estándar (anexo E).

## 6.6. Temperatura óptima y energía de activación

La temperatura para obtener la actividad óptima del extracto crudo y la enzima comercial se estableció realizando el ensayo de actividad enzimática en los intervalos de temperatura de 20 a 70 °C y de 20 a 60 °C respectivamente, con incrementos cada 10 °C.

La energía de activación requerida para iniciar la reacción de hidrólisis por el extracto crudo o la enzima comercial fue determinado usando una expresión tipo Arrhenius:

$$A = A_0 \cdot e^{-E_a/RT} \quad (3)$$

donde  $A$  es la actividad enzimática,  $A_0$  es el factor de Arrhenius,  $E_a$  es la energía de activación,  $R$  es la constante de los gases ( $8.314 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura absoluta. Una gráfica del  $\ln(A)$  versus  $1/T$  genera una línea recta con pendiente  $-E_a/R$ .

## 6.7. Medio Pontecorvo con diferente fuente de carbono

Con el medio Pontecorvo se realizaron cinco tratamientos por triplicado, cada uno contenía una de las siguientes fuentes de carbono: goma de mezquite, goma de mezquite – L-arabinosa (1:1), L-arabinosa, goma de mezquite – glucosa (1:1) y glucosa en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo Pontecorvo (anexo F) con una duración de 48 h.

## 6.8. Medios con diferente relación carbono-nitrógeno

Dado el conocimiento de la composición de la goma de mezquite (Orozco-Villafuerte y col., 2003) se pudo formular un medio de cultivo con diferentes relaciones carbono-nitrógeno (anexo G). Se probaron 5 tratamientos con las siguientes relaciones carbono-nitrógeno: 1, 5, 10, 15 y 20 en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo Pontecorvo (anexo F) y un tiempo de 48 h.

## 6.9. Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido se llevó a cabo en columnas de 2 cm de diámetro por 30 cm de longitud. Las columnas se empacaron con 2 g de soporte inerte (anexo H) y se inocularon con  $2 \times 10^7$  esporas por gramo de materia húmeda. Los tratamientos contenían 60, 120, 180 y 240 mg de fuente de carbono por gramo de soporte inerte (anexo I). Las

condiciones de la fermentación fueron: temperatura constante a 30 °C, pH inicial de 5.6, humedad inicial del 70 % y un tiempo de incubación de 80 h.

### **6.10. Determinación de actividad proteolítica**

La actividad proteolítica fue evaluada utilizando caseína 1 % (p v<sup>-1</sup>) en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 como sustrato. 1 mL de caseína fue incubado a 40 °C durante 1 h con 1 mL de extracto diluido adecuadamente. La reacción se detuvo con la adición de 2 mL de ácido tricloro-acético (TCA) 0.6 M (Gandolfi y Peralta, 2000). Después de la agitación, los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm (2436 g) durante 15 min. La tirosina liberada fue estimada por el método de Lowry (1951) utilizando una curva estándar de tirosina (anexo J). Una unidad de actividad proteolítica fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µg de tirosina por minuto bajo las condiciones del ensayo.

### **6.11. Cinética de hidrólisis enzimática de la goma de mezquite**

Se mezclaron 150 µL de extracto crudo o de la enzima comercial (ambos con 1 U de actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa) con 150 µL de distintas concentraciones de goma de mezquite (5, 10, 40, 70, 100, 130, 160 y 200 g L<sup>-1</sup>) disueltas en amortiguador citrato-fosfato pH 5.6, con tiempos de incubación de 1, 2, 3 y 4 h con una temperatura constante de 30 °C. La reacción se detuvo adicionando 900 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M. Las muestras se filtraron y congelaron para su posterior análisis. Los tiempos de incubación fueron cada hora porque las concentraciones promedio de L-arabinosa liberada no presentaron diferencias significativas a menores tiempos de hidrólisis. La reacción enzimática tuvo un comportamiento conforme al modelo de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (4)$$

donde  $v$  es la velocidad de reacción,  $V_{\max}$  es la máxima velocidad de liberación de L-arabinosa,  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten y  $S$  es la concentración de la goma de mezquite. El ajuste de los parámetros  $K_m$  aparente y  $V_{\max}$  aparente se hizo con el ajuste no lineal de mínimos cuadrados usando la aplicación “Solver”.

## 6.12. Cuantificación de L-arabinosa

La cantidad de L-arabinosa producida se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un equipo Agilent 1100 Series operado en fase normal utilizando una columna Rezex RHM de monosacáridos (Phenomenex, 300 x 7.8 mm, 8  $\mu$ m) y un detector de índice de refracción. Las muestras eluyeron a 0.4 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> utilizando agua como fase móvil a 35 °C. La integración de los picos obtenidos del sistema cromatográfico fue hecha con el software analítico Agilent Chem Station (Agilent, U.S.A.). Se hizo una curva estándar con L-arabinosa (anexo K)

## 6.13. Hidrólisis enzimática de la goma de mezquite

Los rendimientos de L-arabinosa fueron determinados por la hidrólisis de 300  $\mu$ L de una solución de goma de mezquite al 16 % (p v<sup>-1</sup>) con 300  $\mu$ L de extracto crudo o enzima comercial con 8 U de actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en amortiguador citrato-fosfato (0.2-0.1 M) a pH = 5.6 y 30 °C durante 96 h. La reacción se detuvo con la adición de 1.8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M. La cuantificación de L-arabinosa se hizo como se explicó en la sección anterior (6.11.).

## 6.14. Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH)

Esta técnica de CIH se utilizó para hacer un fraccionamiento de la goma de mezquite sin hidrolizar y con una hidrólisis de 24 h con el extracto crudo (Randall y col., 1989). Se inyectaron 100 mL de goma de mezquite o goma de mezquite con 24 h de hidrólisis (100 y 60 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) previamente filtrada (0.45 µm) en un sistema cromatográfico de baja presión (FPLC) con una columna (2.5 x 45 cm) empacada con un gel de interacción hidrofóbica (phenyl-sepharose CL-4B, Pharmacia). La elución se hizo con tres fases móviles, a un flujo de 40 mL h<sup>-1</sup>, en el siguiente orden: NaCl 4.2 M, NaCl 2.0 M y agua destilada y desionizada. Las fracciones fueron monitoreadas a 280 nm. Las diferentes fracciones obtenidas fueron recuperadas, dializadas y liofilizadas.

### 6.14.1. Contenido de azúcares totales

Los azúcares totales se determinaron por el método de fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956), el cual cuantifica azúcares simples, reductores, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados. En un tubo de ensaye con tapón de rosca, se agregaron 2 mL de muestra con 1 mL de una solución de fenol al 5 %. Se mezcló muy bien y se adicionaron, rápidamente por la pared del tubo, 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se mezclaron y dejaron reposar las muestras o estándares durante 10 min. Los tubos se colocaron en baño maría (30 °C) durante 20 min. y se leyó absorbancia espectrofotométricamente a 480 nm. Se hizo una curva patrón con sacarosa (Anexo L).

### **6.14.2. Contenido de proteína en la goma de mezquite**

El contenido de proteína fue determinado por el método de Kjeldahl, usando un sistema de digestión y destilación Büchi (Anexo M). El factor de conversión utilizado para ésta determinación fue de 6.25, que es el propuesto por Anderson y Faquhar (1982).

### **6.14.3. Contenido de ácido glucurónico**

El contenido de ácido glucurónico fue hecho por el método del Carbazol (Randall y col., 1989). Se mezcló 1 mL de muestra con 5 mL de tetraborato de sodio disuelto en ácido sulfúrico (a 0 °C). Se colocaron las muestras en baño de aceite a 85 °C durante 30 min. Se enfriaron las muestras en hielo y se les adicionó 0.2 mL de una solución de carbazol (disuelto en etanol al 1.25 % p v<sup>-1</sup>). Se volvió a calentar a 85 °C durante 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 530 nm. Se utilizó ácido glucurónico (Sigma, St. Luis, MO) como estándar (anexo N).

### **6.14.4. Contenido de cenizas y humedad**

El contenido de cenizas se obtuvo por calcinación de la muestra a 550 °C en una mufla, hasta obtener un peso constante. El contenido de humedad de las fracciones se obtuvo colocando un gramo de la muestra en las charolas de la termobalanza OHAUS (modelo 6010) a una potencia de 5 Watts, a una temperatura 105 °C y un tiempo de secado de 30 min (suficiente para poder obtener un peso constante).



#### **6.14.5. Cromatografía de permeación en gel (CPG)**

Un volumen de inyección de 1 mL de las fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis, a una concentración de 50 g L<sup>-1</sup>, fueron sometidos a una separación cromatográfica de permeación en gel (Randall y col., 1989), en una columna (2.5 x 90 cm) empacada con Sephacryl S-500-HR (farmacia), previamente equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 0.02 M conteniendo cloruro de sodio 0.1 M a un pH de 7.0. Como fase móvil se utilizó NaCl 0.5 M con el amortiguador antes descrito, a un flujo de 34.5 mL h<sup>-1</sup>. Las fracciones fueron monitoreadas a 280 nm. La columna fue calibrada usando estándares de proteína y dextrano (Pharmacia) en un intervalo de 13700 a 669000 Da (anexo Ñ).

#### **6.15. Análisis estadísticos**

Todas las curvas estándar fueron hechas por triplicado y los experimentos por duplicado, excepto cuando se indica lo contrario. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el paquete estadístico NCSS (2001, Kaysville, Utah). Las pruebas utilizadas fueron el análisis de varianza (ANOVA) y en caso de encontrar diferencias significativas se utilizó posteriormente la prueba de Duncan, en ambos casos el nivel de significancia fue del 5 %.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1. Producción del extracto enzimático utilizando goma de mezquite como fuente de carbono

#### 7.1.1. Crecimiento de *A. niger* 10

El crecimiento de *A. niger* en medio mínimo se muestra en la figura 7.1. Se han distinguido tres fases de crecimiento: la fase de latencia, fase logarítmica (Crueger y Crueger, 1993) o exponencial (Madigan y col., 1999) y la fase de estacionaria.

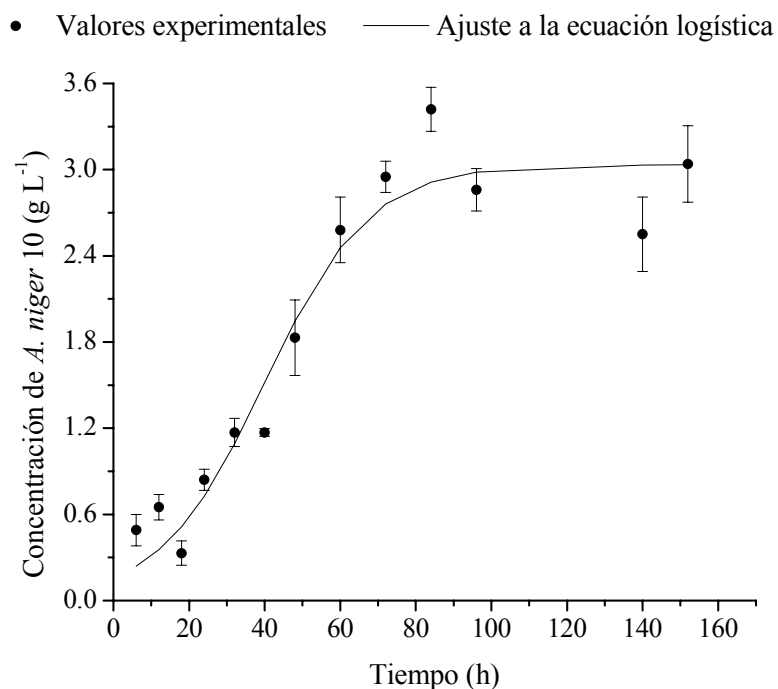


Figura 7.1. Cinética de crecimiento de *A. niger* 10 en medio líquido a 30 °C. El medio contenía 10 g de goma de mezquite, 2.54 g de NaNO<sub>3</sub>, 1.5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g de KCl, 0.5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en 1.0 L de agua desionizada, a un pH de 5.6.

La estimación de los valores de crecimiento se hizo con el ajuste de los valores experimentales al modelo logístico ( $R^2 = 0.9412$ ). La fase de latencia se estimó hasta las 9.13 h de fermentación, la máxima concentración de biomasa ( $X_{\max}$ ) fue de  $3.03 \text{ g L}^{-1}$  y la tasa específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) fue de  $0.07 \text{ h}^{-1}$ . Estos datos se han comparado con los obtenidos para la misma cepa de *A. niger* 10 (Favela-Torres y col., 1998) y para la cepa *A. niger* C28B25 (Díaz-Godínez y col., 2001) utilizando en ambos casos fuente de carbono distintas (Tabla 7.1.).

Podemos decir que el valor de  $X_{\max}$  depende de la complejidad del sacárido a utilizar como fuente de carbono. Favela-Torres y col. (1998) utilizan glucosa, que es un compuesto fácil de asimilar, y obtienen el mayor valor de  $X_{\max}$  ( $12.0 \text{ g L}^{-1}$ ), mientras que Díaz-Godínez y col. (2001) cuando utilizan pectina, un polisacárido lineal con un peso molecular en el intervalo de  $50 \times 10^3$  a  $180 \times 10^3 \text{ Da}$  (Pedersen, 1980), obtienen un valor bajo de biomasa ( $X_{\max} = 4.38 \text{ g L}^{-1}$ ). Así mismo, dada la complejidad de la goma de mezquite que tiene una estructura altamente ramificada y en promedio un peso molecular mayor a  $2 \times 10^6 \text{ Da}$  (Vernon-Carter y col., 2000), es congruente la obtención de un valor todavía más bajo de  $X_{\max}$  (Tabla 7.1.).

En el caso de la estimación de  $\mu_{\max}$ , cuando se utilizó goma de mezquite como fuente de carbono fue considerablemente más bajo ( $0.07 \text{ h}^{-1}$ ) que cuando se utilizó pectina ( $0.22 \text{ h}^{-1}$ ), pero es prácticamente el mismo que cuando se utilizó glucosa ( $0.08 \text{ h}^{-1}$ ). Esto es difícil de explicar en términos de estructura molecular del substrato y los valores de  $\mu_{\max}$  parecen estar en función del microorganismo utilizado, ya que, para la glucosa y la goma de mezquite se utilizó la cepa *A. niger* 10, mientras que para la pectina se utilizó la cepa *A. niger* C28B25 (Tabla 7.1.).

Tabla 7.1. Comparación de  $X_{\max}$  y  $\mu_{\max}$  para *Aspergillus niger* utilizando diferentes sacáridos como sustrato.

Substrato	$X_{\max}$ (g L <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Microorganismo	Referencia
Goma de mezquite (10 g L <sup>-1</sup> )	3.03	0.07	<i>A. niger</i> 10	Este trabajo
Glucosa (100 g L <sup>-1</sup> )	12.00	0.08	<i>A. niger</i> 10	Favela-Torres y col. (1998)
Pectina (15 g L <sup>-1</sup> )	4.38	0.22	<i>A. niger</i> C28B25	Díaz-Godínez y col. (2001)
Pectina + sacarosa (15 + 40 g L <sup>-1</sup> )	11.00	0.19	<i>A. niger</i> C28B25	Díaz-Godínez y col. (2001)

### 7.1.2. Producción de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa

La producción del extracto crudo con actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa se muestra en la figura 7.2. La máxima actividad se encontró a las 84 h de fermentación y fue de 65.93 U L<sup>-1</sup>. Se hizo el ajuste de los datos a la ecuación de Soto-Cruz y col. (2002) para determinar los parámetros  $\alpha$  (coeficiente asociado al crecimiento para la enzima) y  $\beta$  (coeficiente no asociado al crecimiento para la enzima), siendo 19.64 U g<sup>-1</sup> y -0.01 U g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente.

- Valores experimentales — Ajuste a la ecuación de Soto-Cruz y col.

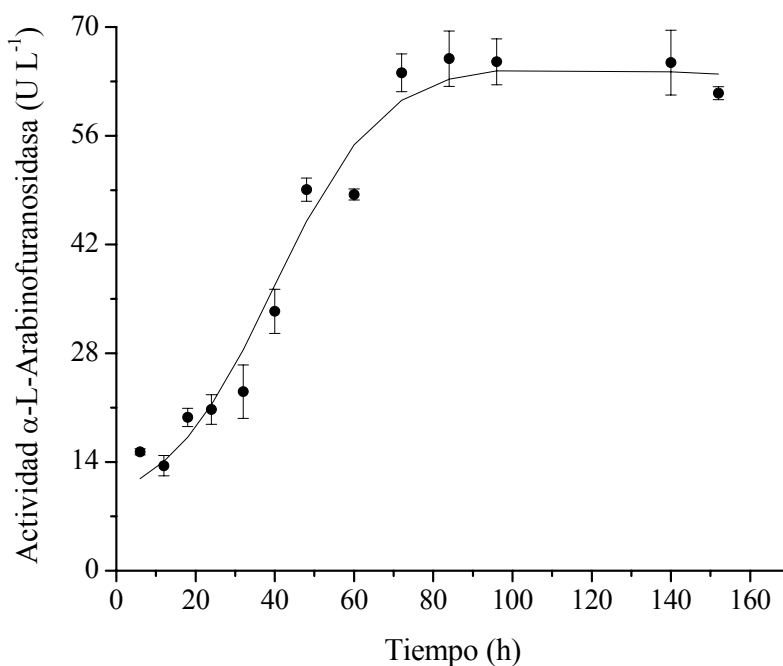


Figura 7.2. Actividad volumétrica  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa obtenida de *A. niger* 10 en medio líquido a diferentes tiempos de fermentación. pH inicial = 5.6 y 30 °C. El medio contenía 10 g de goma de mezquite, 2.54 g de NaNO<sub>3</sub>, 1.5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g de KCl, 0.5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en 1.0 L de agua desionizada.

Dado que el valor del parámetro  $\beta$  es prácticamente cero y el relativamente alto valor del parámetro  $\alpha$ , podemos afirmar que la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en el extracto crudo se encuentra asociada al crecimiento de *A. niger* 10. Esto es congruente, ya que por ser un microorganismo saprófito, secreta enzimas que son necesarias para hidrolizar las moléculas de la goma de mezquite, quedando libres los azúcares que la componen y posteriormente puedan ser utilizados por el hongo. La actividad específica del extracto crudo fue de  $0.33 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína después de las 84 h de fermentación.

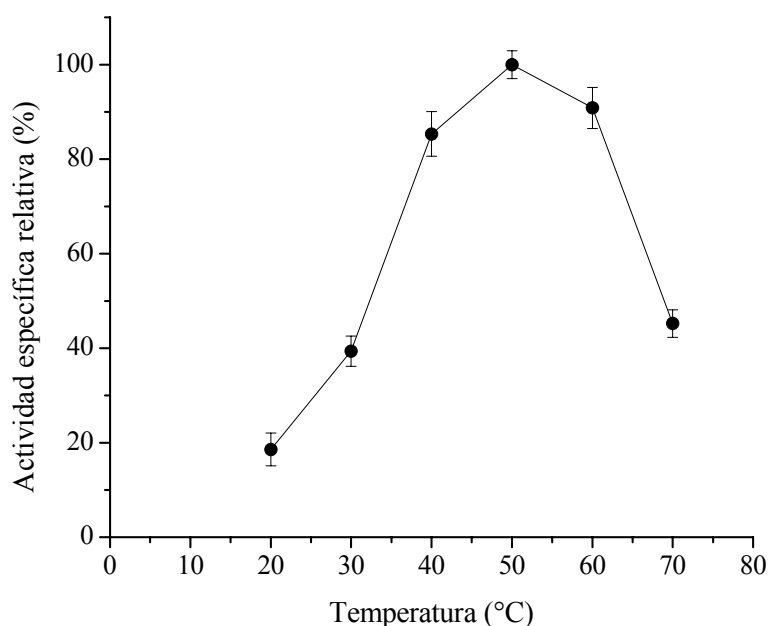


Figura 7.3. Temperatura óptima para la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en el extracto crudo sobre la goma de mezquite a pH = 5.6. El eje “y” representa la actividad específica relativa, que es, la proporción de la máxima actividad específica expresada como porcentaje.

El efecto de la temperatura sobre la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa del extracto crudo utilizando la goma de mezquite como sustrato se muestra en la figura 7.3. La actividad enzimática más alta se encontró a los 50 °C. Esta temperatura se encuentra entre los 46 °C reportados por van der Veen y col. (1991) y 60 °C reportado por Kaneko y col. (1993) y por

Gunata y col. (1990) como temperatura óptima para  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa producida por cepas de *A. niger*. La energía de activación requerida para llevar a cabo la hidrólisis de la goma de mezquite fue de 46.15 KJ mol<sup>-1</sup>.

### 7.1.3. Efecto de la fuente de carbono

Se compararon cinco fuentes de carbono y se evaluó su efecto sobre la producción de biomasa y de actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, los resultados se muestran en la figura 7.4. Cuando *A. niger* 10 creció únicamente con goma de mezquite se obtuvo una concentración de 0.82 g L<sup>-1</sup>. Este crecimiento fue significativamente menor ( $P < 0.05$ ) al obtenido para la goma de mezquite – L-arabinosa (1:1) y para el medio con únicamente L-arabinosa, 0.94 g L<sup>-1</sup> y 0.96 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Cuando se utilizó glucosa y goma de mezquite glucosa (1:1) se obtuvieron los valores más altos de biomasa, siendo 2.20 g L<sup>-1</sup> y 2.59 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos datos indican que el hongo tiene preferencia por la glucosa que por la L-arabinosa y/o goma de mezquite. Además, como el tiempo de fermentación fue de 84 h, posiblemente después de este tiempo el hongo llegue a su crecimiento máximo con la L-arabinosa. También podríamos pensar que fuentes de carbono de fácil asimilación (moléculas de bajo peso molecular) como la glucosa, favorecen el crecimiento del hongo, mientras que fuentes de carbono complejas (moléculas de alto peso molecular) como la goma de mezquite, afectan significativamente su crecimiento. Sin embargo, es difícil de afirmar esto ya que sería necesario tener una cinética de producción de biomasa completa para determinar si estos valores están afectados solamente por la velocidad de crecimiento.

La comparación de la producción de actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa sólo se vio afectada positivamente cuando se utilizó glucosa – goma de mezquite (1:1) obteniendo 64.5 U L<sup>-1</sup> (figura 7.4.). Cuando se utilizaron las otras fuentes de carbono no se observaron diferencias significativas en su producción (goma de mezquite = 41.2 U L<sup>-1</sup>, goma de mezquite – L-arabinosa (1:1) = 47.8 U L<sup>-1</sup>, L-arabinosa = 47.0 U L<sup>-1</sup> y glucosa = 49.5 U L<sup>-1</sup>). El hecho de que no existieran diferencias significativas con y entre los otros tratamientos indica que ésta

enzima es constitutiva, ya que no pudo ser inducible con L-arabinosa ni con goma de mezquite. Por otra parte, podríamos especular que el hongo realiza un metabolismo simultáneo de la glucosa y la goma de mezquite (no diáxico), utilizando la glucosa como fuente de carbono (sin represión catabólica) en la producción de biomasa y la goma de mezquite como inductor de la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa que libera L-arabinosa, la cual también podría ser utilizada como fuente de carbono.

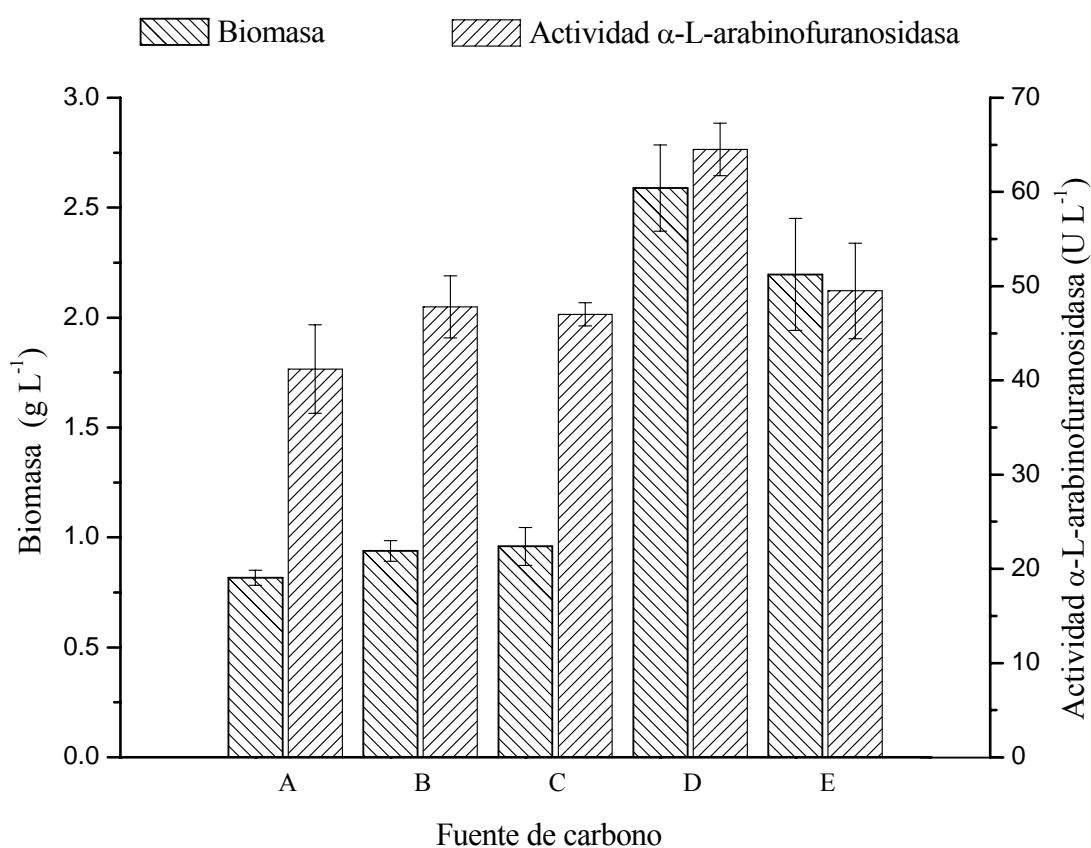


Figura 7.4. Efecto de la fuente de carbono sobre la biomasa y la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa. A.- Goma de mezquite. B.- Goma de mezquite – L-arabinosa (1:1). C.- L-arabinosa. D.- Goma de mezquite – glucosa (1:1). E.- Glucosa.



#### 7.1.4. Efecto de la relación carbono-nitrógeno

Como ya es bien sabido, el medio de cultivo debe tener los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento del microorganismo. En particular, la relación carbono-nitrógeno es de importancia ya que son los componentes mayoritarios de los microorganismos (Cannel y Moo Young, 1980). La formulación del medio de cultivo tiene que ver con aspectos cuantitativos del medio de cultivo y una aproximación de las cantidades a utilizar está dada por el conocimiento de la composición de la biomasa del microorganismo empleado (Ertola y col., 1994). La figura 7.5 muestra el efecto de los cinco tratamientos probados. Se puede observar que la relación carbono-nitrógeno tiene un efecto sobre la producción  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa. La relación carbono-nitrógeno donde se obtuvo la mayor actividad enzimática fue de 10, los tratamientos con las relaciones carbono-nitrógeno de 5, 15 y 20 son lo que presentaron el siguiente valor más bajo de actividad enzimática. La relación carbono-nitrógeno con menor actividad enzimática obtenida fue la de 1, los valores promedio se evaluaron con un análisis de varianza y los tres grupos presentaron diferencias significativas con un valor de  $P < 0.05$ .

Se podría presentar el caso de que al aumentar la cantidad de carbono y nitrógeno, manteniendo la misma relación ( $C/N = 10$ ), aumentara la producción de enzima, como en el caso de producción de koji producido por *A. flavus* (Rosfarizan y Ariff, 2000). Por lo anterior decidimos probar el efecto de la concentración del medio de cultivo en fermentación en medio sólido. Esta alternativa fue considerada porque en la fermentación en medio sólido no se presentan limitaciones dadas por el incremento de la concentración del medio de cultivo, principalmente la disponibilidad del oxígeno disuelto (Raimbault, 1998) teniendo la posibilidad de evaluar si el microorganismo es capaz de producir una mayor cantidad de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa.

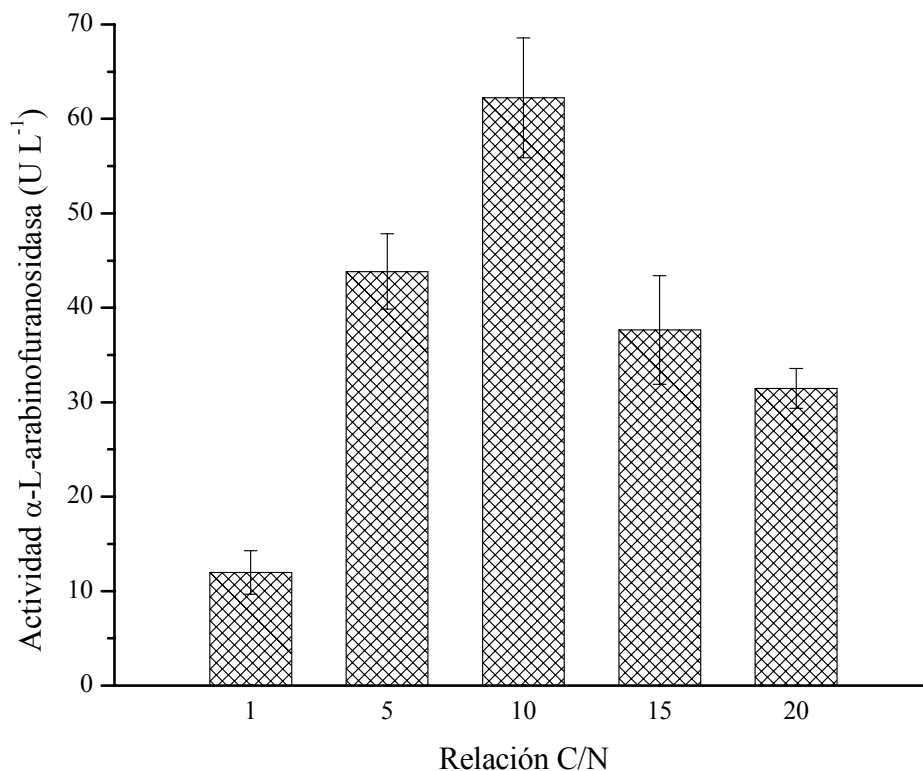


Figura 7.5. Efecto de la relación carbono-nitrógeno sobre la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en fermentación en medio líquido. Se utilizó medio Pontecorvo con 10 g L<sup>-1</sup> de goma de mezquite-glucosa (1:1) como fuente de carbono. La relación C/N se modificó agregando NaNO<sub>3</sub>.

### 7.1.5. Producción de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en medio sólido

El efecto de la concentración del medio de cultivo sobre la actividad enzimática en fermentación en medio sólido se muestra en la figura 7.6. Podemos observar un incremento lineal de la actividad enzimática con respecto al incremento en la concentración de sustrato ( $y = 163 X - 34.03$ ,  $R^2 = 0.9967$ ), obteniendo una máxima producción  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de 622.3 U L<sup>-1</sup>.

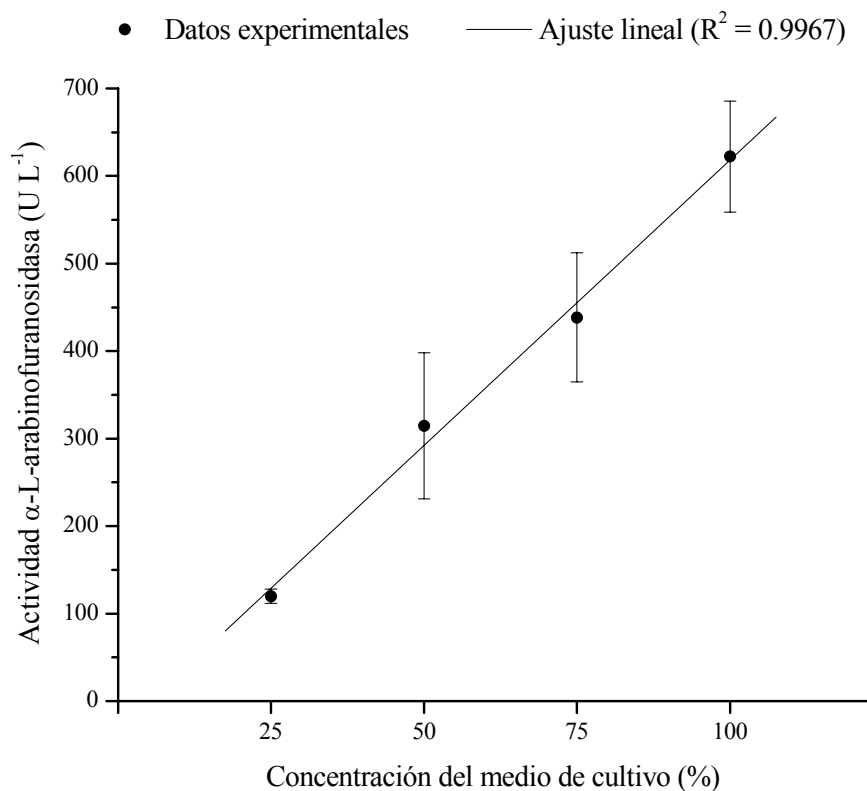


Figura 7.6. Efecto de la concentración del medio de cultivo sobre la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en fermentación en medio sólido. Se utilizó el medio Pontecorvo con goma de mezquite-glucosa (1:1) como fuente de carbono y una C/N = 10. Este medio se concentró diez veces (100 %) y se hicieron las diluciones correspondientes.

Estos altos niveles de producción enzimática en fermentación en medio sólido con concentraciones de fuente de carbono de hasta 100 g L<sup>-1</sup> de substrato confirman la ausencia de represión catabólica en este tipo de procesos (Favela-Torres y col., 1998). Al comparar la actividad enzimática volumétrica de la fermentación en medio líquido (sección 7.1.3.) con la obtenida en medio sólido, esta última es casi 10 veces mayor a la producida en medio líquido. Sin embargo, decidimos hacer una comparación de la actividad enzimática utilizando como base de comparación los gramos de carbono utilizados (tabla 7.2.).

En este caso, estadísticamente no se observan diferencias significativas en la producción de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa entre fermentación en medio líquido y fermentación en medio sólido ( $P < 0.05$ ).

Tabla 7.2. Comparación de la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa obtenida por gramo de carbono en fermentación en medio líquido (FML) con 48 h de fermentación y fermentación en medio sólido (FMS) con 80 h de fermentación.

Substrato	Actividad enzimática ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g-C}^{-1}$ )
FML - Goma de Mezquite	$11.77 \pm 1.34^a$
FML - Goma de Mezquite – L-rabinosa (1:1)	$12.75 \pm 0.88^a$
FML - L-Arabinosa	$11.76 \pm 0.31^a$
FML - Goma de Mezquite – Glucosa (1:1)	$17.21 \pm 0.74^a$
FML - Glucosa	$12.37 \pm 1.27^a$
FMS - Goma de Mezquite – Glucosa (1:1) 100 g L <sup>-1</sup>	$13.83 \pm 2.91^a$
FMS - Goma de Mezquite – Glucosa (1:1) 75 g L <sup>-1</sup>	$12.99 \pm 2.19^a$
FMS - Goma de Mezquite – Glucosa (1:1) 50 g L <sup>-1</sup>	$13.98 \pm 3.71^a$
FMS - Goma de Mezquite – Glucosa (1:1) 25 g L <sup>-1</sup>	$10.65 \pm 0.72^a$

<sup>a</sup> Nivel de significancia  $< 0.05$ .

Una comparación de las ventajas y desventajas del tipo de fermentación a utilizar ha sido reportada (Raimbault, 1998). De aquí que las características de importancia en la fermentación líquida para nosotros sean: alto volumen de descarga de efluentes, fácil control de pH, buena homogeneización y equipos industriales disponibles para su escalamiento. Por lo anterior se decidió el uso de la fermentación en medio líquido para la producción de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa utilizando goma de mezquite – Glucosa (1:1) como fuente de carbono.

### **7.1.6. Actividad proteolítica**

La presencia de proteasas es evidente cuando se utilizan sustratos que contienen proteína, la cual es capaz de inducir tal actividad, y debido a que la goma de mezquite presenta una fracción proteica (0.7 – 5.8 %; Vernon-Carter y col., 2000) se sospechó la presencia de proteasas. De este estudio se observó que para el extracto crudo obtenido por fermentación en medio líquido bajo las condiciones anteriormente establecidas fue de  $1.09 \pm 0.0179 \text{ U mL}^{-1}$ , lo que confirma la presencia de proteasas en nuestro extracto crudo, que puede estar afectando la obtención de una mayor cantidad de títulos de actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa.

## 7.2. Hidrólisis de la goma de mezquite

### 7.2.1. Hidrólisis con el extracto crudo

Se hizo una cinética de hidrólisis de la goma de mezquite con el extracto crudo producto del filtrado de la fermentación de la goma de mezquite con *A. niger* 10 (figura 7.7). Los valores estimados para los parámetros cinéticos  $K_{m-app}$  y  $V_{max-app}$  fueron  $4.87 \text{ g L}^{-1}$  y  $0.15 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína, respectivamente.

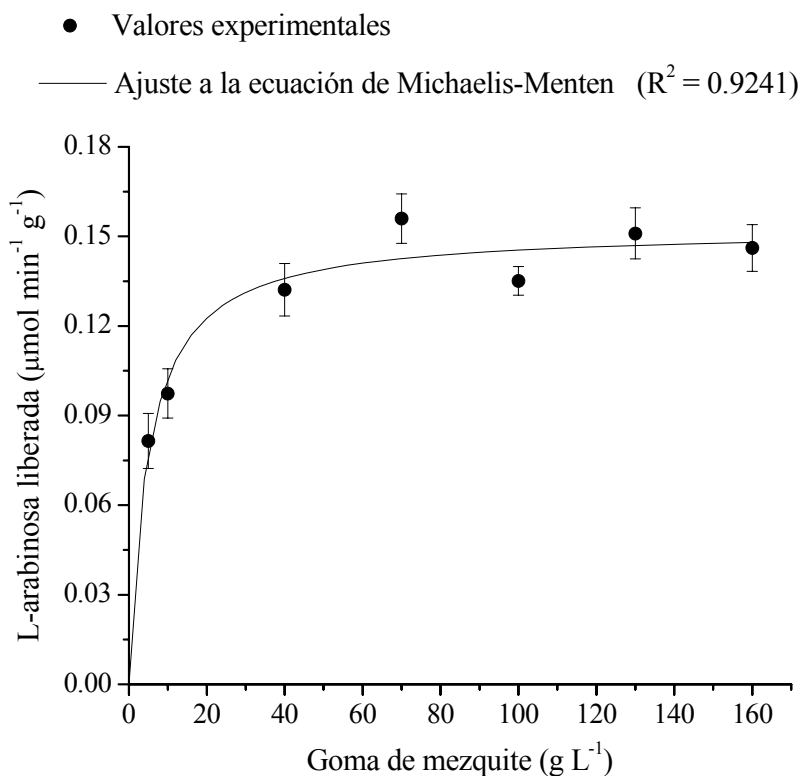


Figura 7.7. Cinética de hidrólisis de la goma de mezquite utilizando el extracto crudo enzimático (1 U) a un pH de 5.6 y  $30 \text{ } ^\circ\text{C}$  con un amortiguador citrato-fosfato (0.2-0.1 M).

Estos datos sirven para comparar los rendimientos de la hidrólisis de la goma de mezquite de la hidrólisis con la enzima comercial.

### 7.2.2. Hidrólisis con la enzima comercial

Antes de hacer la hidrólisis de la enzima comercial se verificó la actividad específica, siendo de  $40 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína. Comparando la actividad específica obtenida para el extracto crudo (sección 7.1.2.) con la obtenida para la enzima comercial, ésta es casi 121 veces mayor. También se evaluó la temperatura sobre la actividad de la enzima comercial utilizando la goma de mezquite como sustrato y se obtuvo una temperatura óptima de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  (figura 7.8.).

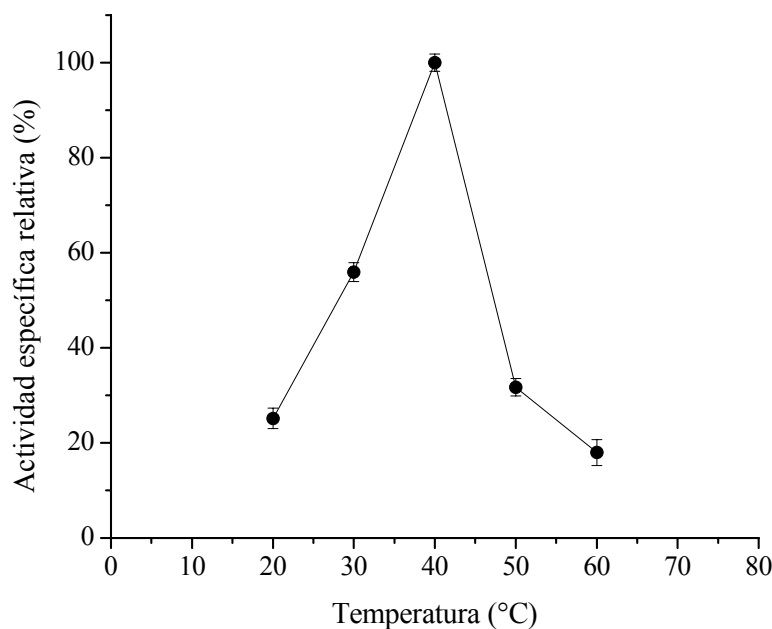


Figura 7.8. Temperatura óptima para la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de la enzima comercial sobre la goma de mezquite a  $\text{pH} = 5.6$ . El eje “y” representa la actividad específica relativa, que es, la proporción de la máxima actividad específica expresada como porcentaje.

La energía de activación requerida para la hidrólisis de la goma de mezquite fue de  $52.76 \text{ KJ mol}^{-1}$ . Comparando este valor con el obtenido para el extracto crudo (sección 7.1.2.) podemos decir que la reacción de hidrólisis es más susceptible a los cambios de temperatura con el extracto crudo que con la enzima comercial, esto posiblemente debido a la acción enzimática sinérgica de diversas enzimas contenidas en el extracto crudo (glucosidasas y ramnosidasas), inducidas por la presencia de residuos de galactosa y ramnosa presentes en la estructura de la goma de mezquite.

Una vez establecida la actividad específica, el efecto de la temperatura en la enzima comercial y la energía de activación, se evaluó la cinética de hidrólisis para la enzima comercial (figura 7.9). Los valores estimados para los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{\max}$  fueron  $76.45 \text{ g L}^{-1}$  y  $3.85 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína, respectivamente.

Como bien se sabe, el valor de  $K_m$  es un indicador de la afinidad de la enzima por el substrato. Los resultados obtenidos muestran que el extracto crudo tiene una afinidad 16 veces mayor sobre la goma de mezquite que la enzima comercial. Con respecto a los valores de  $V_{\max}$ , se observa que para la enzima comercial es 25 veces mayor que con el extracto crudo. La comparación de los valores de  $V_{\max}$  puede parecer muy subjetiva ya que la velocidad está expresada en función de la cantidad de proteína y como en el extracto crudo el contenido de proteína es 121 veces mayor el valor de  $V_{\max}$  va a disminuir considerablemente y sólo se podría definir un mejor proceso de hidrólisis con base en los rendimientos de L-arabinosa.

Considerando que Tagawa y Kaji (1988) reportaron que la hidrólisis de L-arabinano por una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa purificada está dada en dos procesos cinéticos, donde uno es rápido y responsable de la hidrólisis de casi el 30 % que se atribuye al rompimiento de una unidad de L-arabinofuranosa en las cadenas laterales que se encuentra junto y a lo largo de la cadena principal, y un segundo proceso que es lento y responsable del rompimiento de la cadena principal compuesta de unidades de arabinofuranosa con enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5), se podría sugerir que en nuestro caso, la enzima comercial hidroliza principal y rápidamente los enlaces de los azúcares laterales que están expuestos, pero no hidroliza los monómeros que se



encuentran en la cadena principal afectando el rendimiento final de L-arabinosa. Mientras que el extracto crudo, con distintas enzimas inducidas con la misma goma de mezquite y posiblemente presentando una menor cantidad de enzima  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, presenta menor velocidad de hidrólisis de la goma de mezquite pero se esperaría obtener rendimientos mayores. Lo cual podría reforzarse por lo mencionado por Saha (2000) que menciona que la mayoría de las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas son exo-enzimas, lo que implica exclusivamente la acción de hidrólisis sobre los enlaces (1 $\rightarrow$ 3) y (1 $\rightarrow$ 5)-arabinosil localizados en las cadenas laterales terminales de polisacáridos del tipo encontrado en la goma de mezquite.

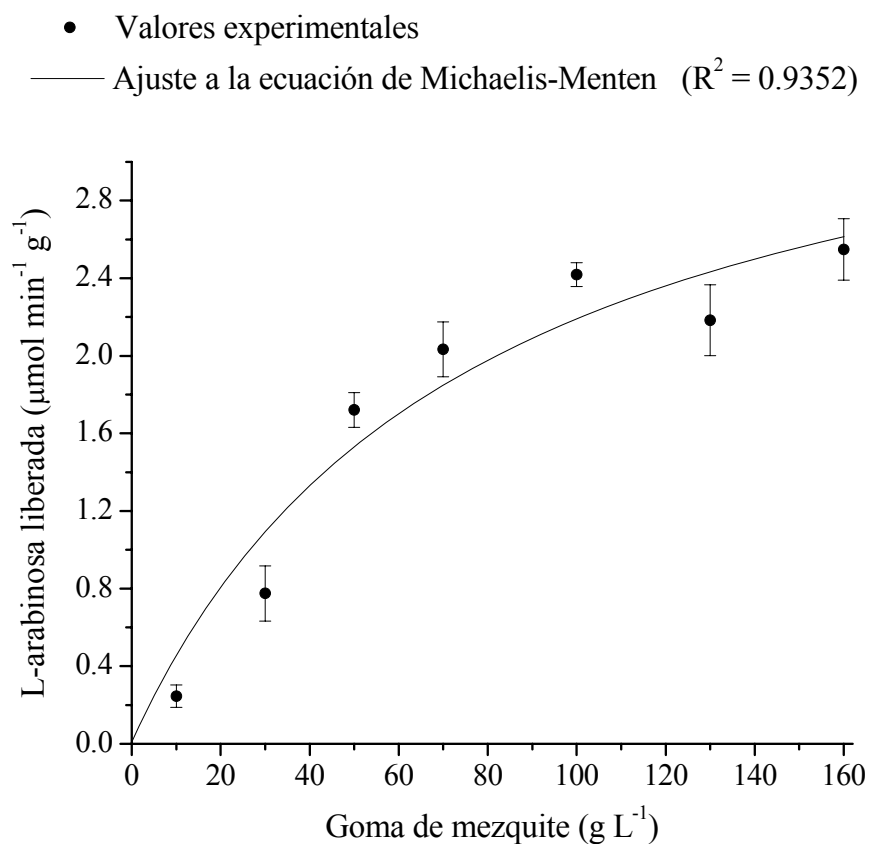


Figura 7.9. Cinética de hidrólisis de la goma de mezquite utilizando la enzima comercial (1 U) a un pH de 5.6 y 30 °C con un amortiguador citrato-fosfato (0.2-0.1 M).

### 7.2.3. Rendimientos de L-arabinosa

La cantidad de L-arabinosa liberada por el extracto crudo y la enzima comercial se presenta en la tabla 7.3. La liberación de L-arabinosa fue 6 veces mayor para el caso del extracto crudo que para la enzima comercial.

Tabla 7.3. Rendimientos obtenidos de L-arabinosa para la hidrólisis enzimática de la goma de mezquite.

Método de hidrólisis	L-arabinosa (%)	Referencia
Hidrólisis ácida	40.4 ± 2.04	Orozco-Villafuerte y col. (2003)
Extracto crudo	17.0 ± 1.08	Este trabajo
Enzima comercial	2.8 ± 0.18	Este trabajo

Tomando en cuenta la discusión planteada en la sección anterior (7.2.2.) y considerando estos rendimientos se podría reforzar la hipótesis de que la enzima comercial actúa principalmente sobre las cadenas laterales, mientras que el extracto crudo, que contiene otras enzimas, tiene mayor facilidad de romper los enlaces (1→3) y (1→5)-arabinosil contenidos en la estructura macromolecular de la goma de mezquite, permitiendo mayor liberación de L-arabinosa. También se podría mencionar la posible existencia de efectos sinérgicos de las distintas enzimas presentes en el extracto crudo, de igual manera en que Rombouts y col. (1988) sospechaban la acción sinérgica de dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y una endo-(1→5)- $\alpha$ -L-arabinanasa en la producción de L-arabinosa.

### 7.3. Caracterización de las fracciones obtenidas mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (CIH) de la goma de mezquite sin hidrolizar y parcialmente hidrolizada

#### 7.3.1. Fraccionamiento de la goma de mezquite por CIH.

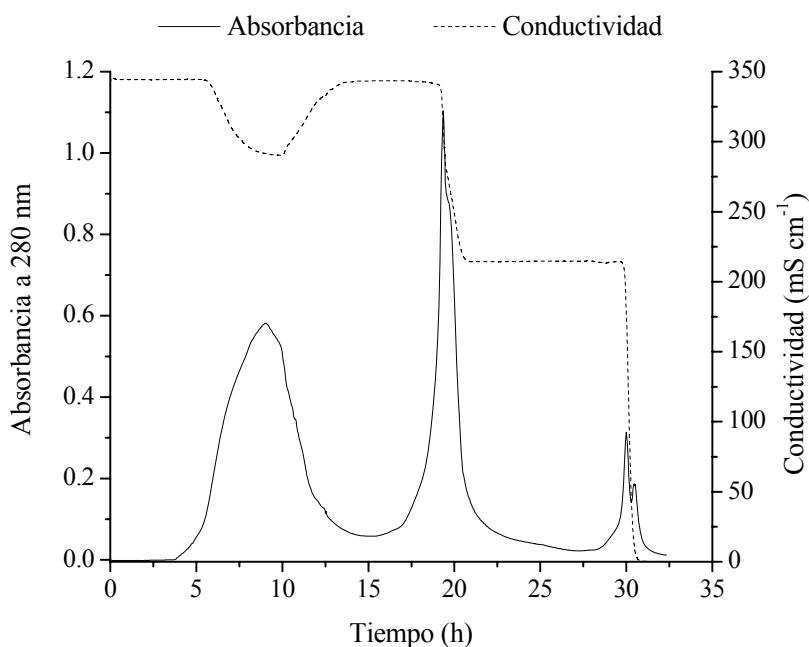


Figura 7.10. Fraccionamiento de la goma de mezquite sin hidrolizar por CIH. Elución de las tres fracciones a través del tiempo. Cada fracción eluyó con una fase móvil, representada por el cambio de conductividad. La fracción 1 eluyó con NaCl (4.2 M), la fracción 2 eluyó con NaCl (2.0 M) y la fracción 3 eluyó con agua.

Se hizo el fraccionamiento por CIH de la goma de mezquite sin hidrolizar y se obtuvieron principalmente tres fracciones (figura 7.10.). Cada fracción eluyó según la fase

móvil utilizada. Con el NaCl 4.2 M eluyó un pico robusto y bien definido (fracción 1), con el NaCl 2.0 M eluyó el pico de mayor absorbancia (fracción 2) y con el agua eluyó el pico de menor tamaño tanto en altura como en ancho de pico (fracción 3).

Estas fracciones presentaron distintos grados de hidrofobicidad, siendo la fracción 1 la más hidrofílica y la fracción 3 la más hidrofóbica. Particularmente la fracción 3 siempre presentó hombros ya sea a la izquierda o a la derecha del pico principal (figura 7.10. y 7.11.). Debido a la baja resolución en la separación de la fracción 3 y a que la cantidad de fracción colectada muestra un rendimiento muy bajo con respecto a las otras dos fracciones (tabla 7.4.) se consideró como un solo pico.

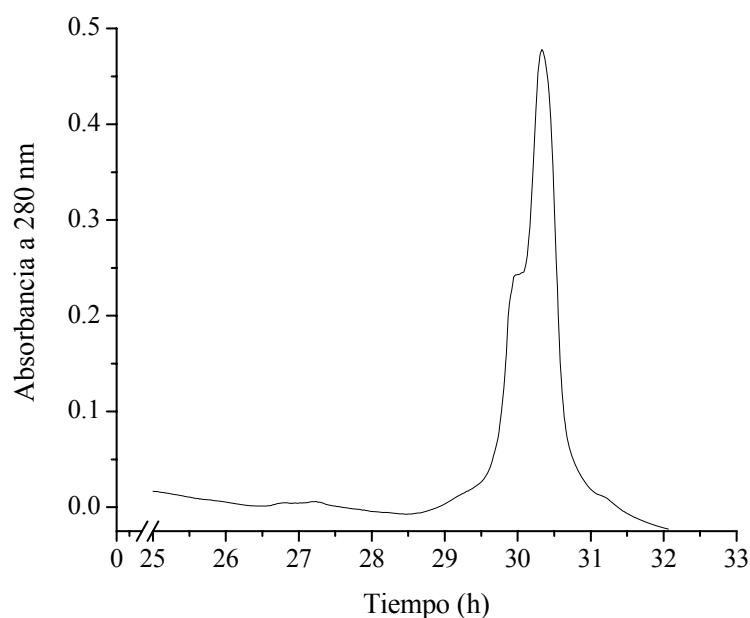


Figura 7.11. Cromatograma de interacción hidrofóbica de la fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar. Se observó la presencia indistintamente de un hombro a la izquierda o derecha del pico.

Orozco y col. (2003) reportan, de la misma manera que en este trabajo, sólo una fracción cuando se utiliza NaCl 4.2 M como fase móvil. Sin embargo cuando Orozco y col.

(2003) eluyen con NaCl 2.0 M y agua reportan la presencia de dos fracciones para cada fase móvil, mientras que en este trabajo cuando se eluye con NaCl 2.0 M sólo se observa una fracción (figura 7.10.) y con agua se podría sugerir la presencia de dos fracciones, pero por las razones antes mencionadas se toma en consideración sólo una fracción (figura 7.11.). Estas diferencias pueden darse debido a que la goma de mezquite aunque es colectada en la misma región puede variar su composición según la zona y temporada de colecta.

### 7.3.2. Fraccionamiento de goma de mezquite hidrolizada enzimáticamente por CIH.

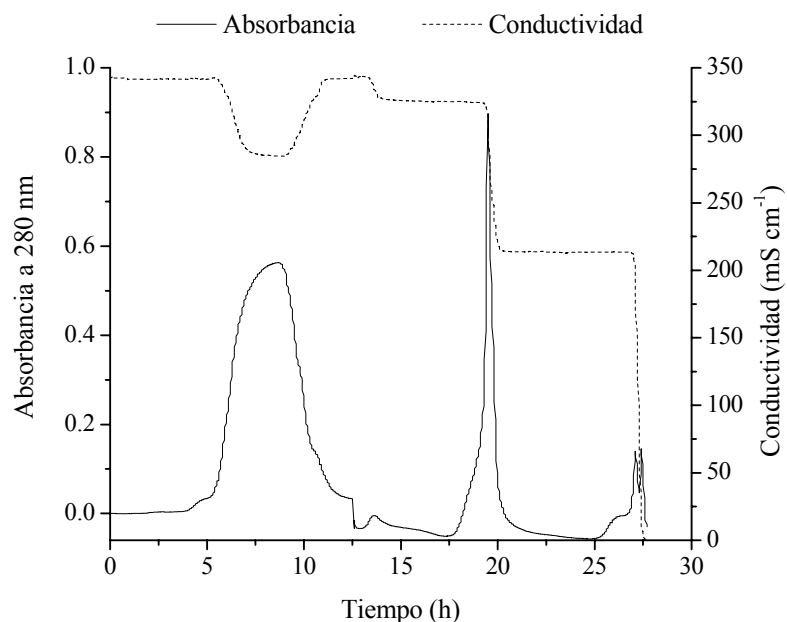


Figura 7.12. Fraccionamiento de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada por CIH. Elución de las tres fracciones a través del tiempo. Cada fracción eluyó con una fase móvil, representada por el cambio de conductividad. La fracción 1 eluyó con NaCl (4.2 M), la fracción 2 eluyó con NaCl (2.0 M) y la fracción 3 eluyó con agua.

De igual manera que en la goma de mezquite sin hidrolizar, se obtuvieron tres fracciones por CIH de la goma de mezquite hidrolizada (figura 7.12.), cada una de estas fracciones eluyó con cada fase móvil utilizada. Al comparar los cromatogramas de las fracciones correspondientes de la goma de mezquite sin hidrolizar con los de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada, no se observan diferencias en los picos cromatográficos, sin embargo, una evaluación de los rendimientos (tabla 7.4.) puede ayudar a elucidar algún cambio dado por la hidrólisis enzimática.

Tabla 7.4. Rendimientos obtenidos por CIH de las fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar y parcialmente hidrolizada.

Muestra	CIH <sub>Entrada</sub> (g)	CIH <sub>Salida</sub> (g)	Rendimiento (%)
GM	10.0	---	---
F1	---	9.0	90.0
F2	---	0.1	1.0
F3	---	0.06	0.6
GM <sub>H</sub>	6.0	---	---
F1 <sub>H</sub>	---	2.8	46.2
F2 <sub>H</sub>	---	0.1	1.9
F3 <sub>H</sub>	---	0.03	0.6

GM = Goma de mezquite, H = 24 h de hidrólisis y F = Fracción

El balance de masa indica que se obtiene de la goma de mezquite sin hidrolizar un 90.0, 1.0 y 0.6 % de masa recuperada después del fraccionamiento por CIH para las fracciones 1, 2 y 3, respectivamente. Para la goma de mezquite parcialmente hidrolizada se recuperaron el 46.0, 1.9 y 0.6 % de masa después del fraccionamiento por CIH para las fracciones 1, 2 y 3, respectivamente (tabla 7.4.). La disminución en masa de la fracción 1 de la goma de mezquite tratada previamente con el extracto enzimático muestra una disminución de casi el 50 %

respecto a la misma fracción 1 de la goma de mezquite sin hidrolizar. Esto permite deducir el efecto de la hidrólisis previa ya que los azúcares liberados por el extracto enzimático, que fueron cuantificados antes de la inyección, posiblemente eluyeron inmediatamente con la fase móvil debido a que no se encontraban ligados a los enlaces con otros azúcares y/o la fracción proteica que eluyen en la fracción 1 y por lo tanto no se cuantificaron con la fracción.

### **7.3.3. Caracterización de la goma de mezquite sin hidrolizar e hidrolizada enzimáticamente.**

El contenido total de azúcares en la goma de mezquite y la fracción 1 no presentó diferencias significativas entre sí y son las muestras con mayor contenido de azúcares (figura 7.13.). Las fracciones 2 y 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar, la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis y las fracciones 1 a 3 con 24 h de hidrólisis no presentan diferencias significativas entre ellas, pero sí difieren de la goma de mezquite y la fracción 1 ( $P < 0.05$ ).

Con respecto al contenido de proteína, se encuentran seis grupos que presentan diferencias significativas entre sí. En el primer grupo, el que presentó el mayor contenido de proteína, se encuentra a la fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar y a la fracción 3 de la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis (figura 7.13.), tales fracciones no presentan diferencias significativas entre sí. El segundo grupo está representado por la fracción 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar y la fracción 2 de la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis. Después, cada una de las siguientes muestras representa un grupo y están ordenados de mayor a menor cantidad de proteína, quedando como sigue: la goma de mezquite sin hidrolizar, la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis, la fracción 1 de la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis y la fracción 3 de la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis ( $P < 0.05$ ).

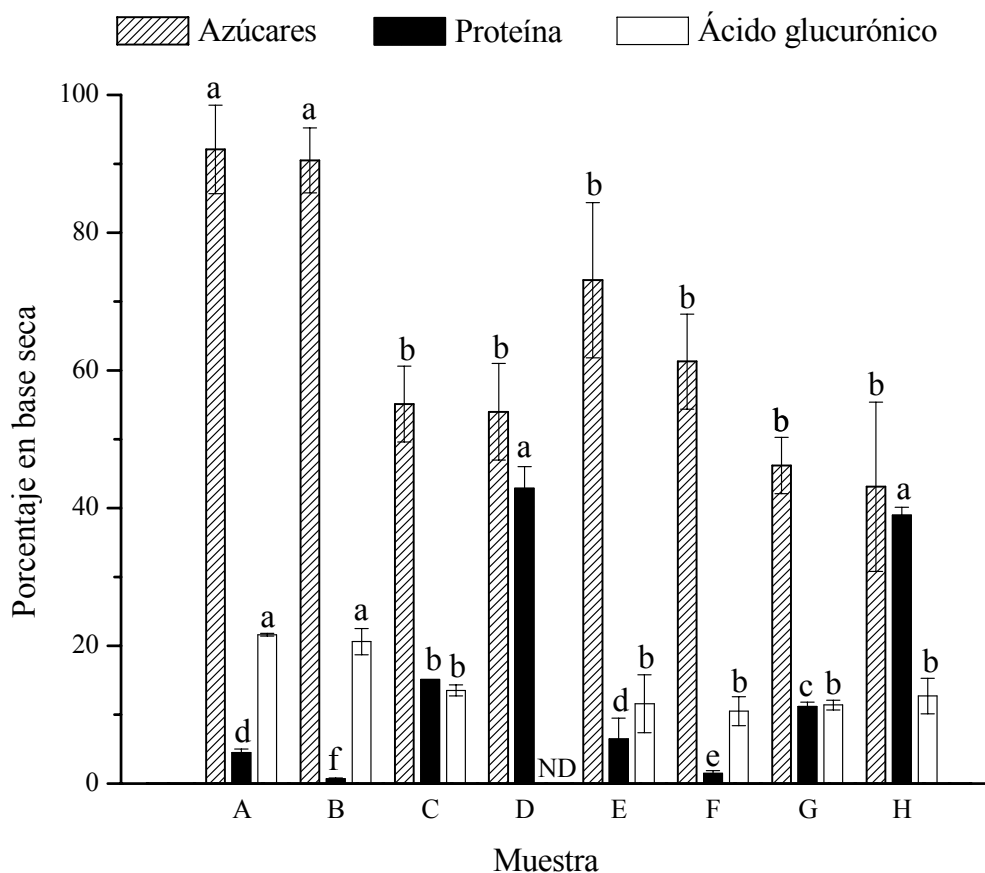


Figura 7.13. Porcentaje de azúcares totales, proteína y ácido glucurónico para la goma de mezquite sin hidrolizar (A), las fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar (fracción 1 = B, fracción 2 = C y fracción 3 = D), la goma de mezquite hidrolizada (E) y sus fracciones de la goma de mezquite hidrolizada (fracción 1 = F, fracción 2 = G y fracción 3 = H). ND = No determinado.

El resultado esperado después de la hidrólisis parcial era que se modificara el contenido de azúcares totales en las distintas fracciones obtenidas, mientras la cantidad de proteína no cambie, sin embargo, los datos indican lo contrario. Una de las causas posibles es que al hidrolizar la molécula de la goma de mezquite puedan quedar expuestas ciertas cadenas de proteína que al interactuar con la fase estacionaria en la CIH permitan un cambio en la adsorción, como sugieren Dioggo y col. (2003), por las interacciones electrostáticas (que a



pesar de no ser el mecanismo principal en la CIH sí puede interferir cuando se utilizan concentraciones salinas altas de fase móvil), de las proteínas ahora expuestas, o bien, como sugieren Berggren y col. (2002) y Lienqueo y col. (2002) por el cambio del “promedio de la hidrofobicidad en la superficie” de la estructura tridimensional de la proteína y de los aminoácidos ahora expuestos, de tal manera que el fraccionamiento en la parte proteica es diferente en cada caso, dando como resultado una gran variación en el contenido proteico de las fracciones obtenidas.

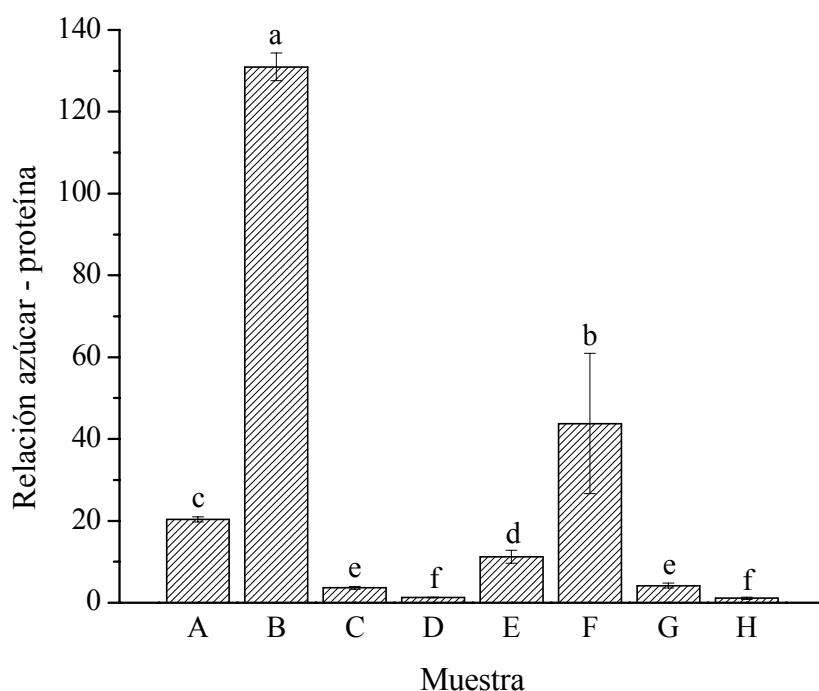


Figura 7.14. Relación del contenido de azúcar entre la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras. Goma de mezquite sin hidrolizar (A), las fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar (fracción 1 = B, fracción 2 = C y fracción 3 = D), la goma de mezquite hidrolizada (E) y sus fracciones de la goma de mezquite hidrolizada (fracción 1 = F, fracción 2 = G y fracción 3 = H).

La importancia de estos resultados recae en el cambio de la relación azúcar-proteína, que podría ayudar a comparar (de manera indirecta) el cambio del balance hidrofílico-lipofílico de la goma de mezquite (figura 7.14.).

Es de interés conocer estos cambios que, aunque en primera instancia parecen despreciables, pueden ser muy significativos en cuanto al comportamiento reológico de la muestra para su aplicación en la elaboración de emulsiones. La fracción que presenta mayormente un carácter hidrofílico es la fracción 1 de la goma de mezquite sin hidrolizar, mientras que las fracciones que presenta mayormente un carácter lipofílico son las muestras de la fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar y parcialmente hidrolizada.

Tabla 7.5. Contenido de cenizas y humedad para la goma de mezquite y sus fracciones, tanto sin hidrolizar como hidrolizadas.

Muestra	Cenizas (%)	Humedad (%)
GM	1.9 ± 0.02	7.2 ± 0.06
F1	2.0 ± 0.19	9.2 ± 0.02
F2	2.4 ± 0.33	7.7 ± 0.05
F3	11.6 ± 0.17	8.3 ± 0.05
GM <sub>(24H)</sub>	2.2 ± 0.09	7.2 ± 0.03
F1 <sub>(24h)</sub>	2.3 ± 0.15	7.2 ± 0.07
F2 <sub>(24h)</sub>	ND	7.7 ± 0.75
F3 <sub>(24h)</sub>	ND	ND

ND = No determinado.

El mayor contenido de ácido glucurónico se encuentra en la goma de mezquite sin hidrolizar y la fracción 1 de la goma de mezquite sin hidrolizar (figura 7.13.), las cuales no presentan diferencias significativas entre sí, pero sí presentan diferencias significativas con las

demás muestras ( $P < 0.05$ ), excepto con la fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar ya que este dato no pudo ser determinado.

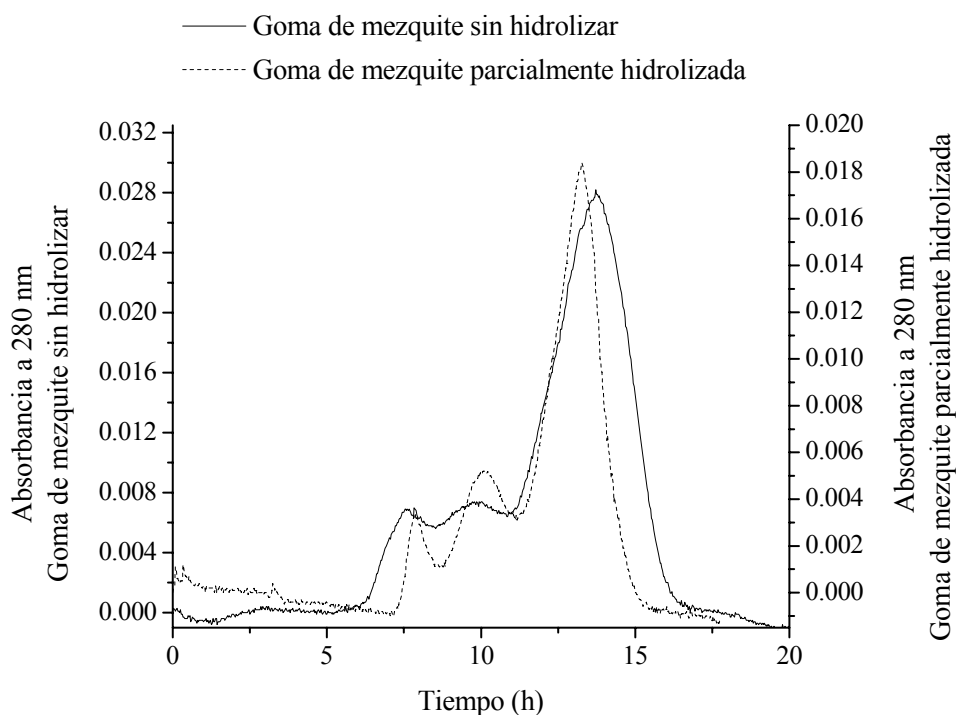


Figura 7.15. Perfil de cromatografía de permeación en gel para la fracción 1 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis.

También fue determinado el contenido de cenizas y de humedad (tabla 7.5.). El contenido de cenizas fue cercano al 2 %, excepto para la fracción 3 que fue del 11.6 %. Respecto al contenido de humedad la fracción 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar es la que presenta al mayor porcentaje, siendo del 9.2 %, le sigue la fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar con el 8.3 %, y la fracción 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar y de la parcialmente hidrolizada presentaron 7.7 % y la goma de mezquite sin hidrolizar junto con la parcialmente hidrolizada y la fracción 1 de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada son las de menor contenido de humedad, 7.2 %. El contenido de cenizas para la goma de mezquite parcialmente hidrolizada y sus fracciones 2 y 3 después de la hidrólisis no se

pudieron determinar, así como el contenido de humedad para la fracción 3 de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada.

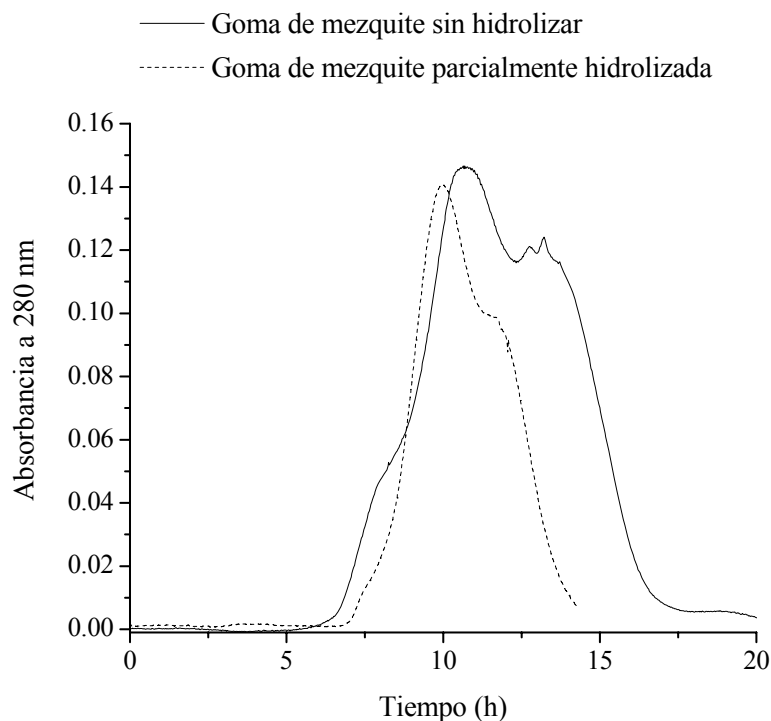


Figura 7.16. Perfil de cromatografía de permeación en gel para la fracción 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis.

#### 7.3.4. Distribución de pesos moleculares por CPG.

Dickinson y col. (1991) mencionan la existencia de una buena correlación del peso molecular promedio de la goma arábica y sus propiedades emulsificantes. Esto concuerda con lo reportado por McClements (1999) donde establece que el tamaño de partícula es un parámetro importante en la formulación de emulsiones, ya que la molécula presenta interacciones del tipo estérica (tamaño de la molécula) y electrostática (carga de la molécula) para permitir la formación de la emulsión y su estabilidad a través del tiempo (McClements,

1999). La distribución de pesos moleculares de las fracciones de la goma de mezquite ya ha sido reportada (Orozco-Villafuerte y col., 2003). La elución de los picos está dada por el tamaño de la molécula, es decir, primero eluyen las moléculas que tienen un peso molecular mayor y posteriormente las moléculas de menor peso molecular. La distribución de pesos moleculares para las fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar y la parcialmente hidrolizada se muestran en las figuras 7.15. – 7.17.

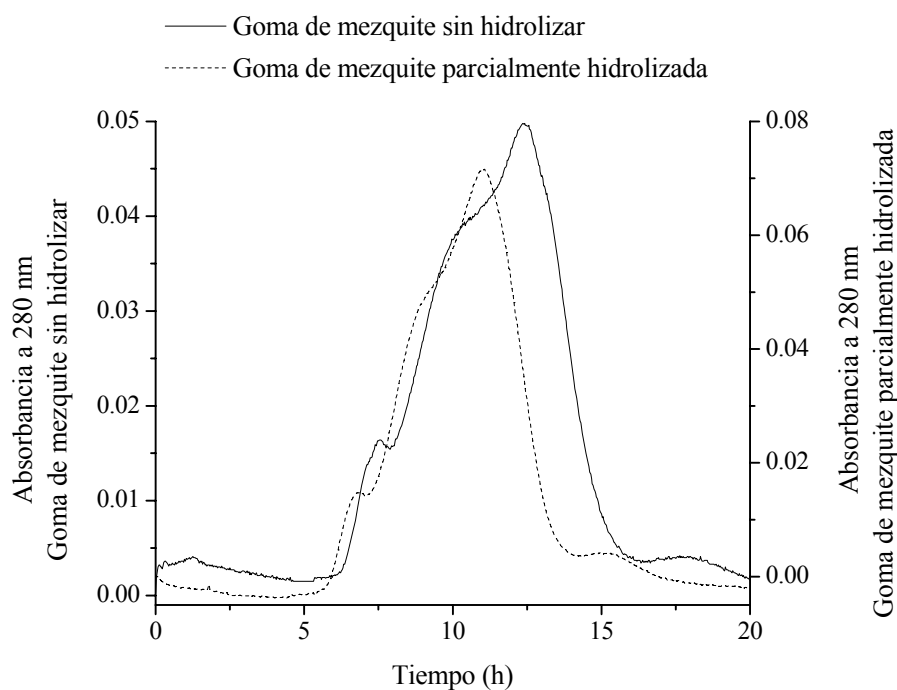


Figura 7.17. Perfil de cromatografía de permeación en gel para la fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis.

La fracción 1 de la goma de mezquite sin hidrolizar y de la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis mostró tres picos cada una (figura 7.15.). Los pesos moleculares para el pico 1 y 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar fueron  $3.5 \times 10^5$  y  $5.8 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup>, respectivamente (tabla 7.6.). Mientras que para la goma de mezquite parcialmente hidrolizada fueron de  $3.1 \times 10^5$  y  $5.3 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup>, respectivamente (tabla 7.7.). Los pesos moleculares para la fracción 3

en ambos casos fueron los más bajos y no se determinaron ya que se encontraban por debajo de los valores de los estándares y del tipo de gel utilizados.

Tabla 7.6. Distribución del peso molecular de las distintas fracciones de la goma de mezquite sin hidrolizar.

	No. de Pico	Tiempo (min)	Volumen (mL)	Peso molecular ( $\text{g mol}^{-1}$ )
Fracción 1				
	1	440	250	580772
	2	565	321	353099
	3	815	464	ND
Fracción 2				
	1	463	263	538880
	2	620	353	252922
	3	770	438	ND
Fracción 3				
	1	437	249	586237
	2	595	339	298457
	3	732	417	48926

ND = No determinado.

La fracción 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar presentó 3 picos (figura 7.16.) de pesos moleculares  $2.5 \times 10^5$ ,  $5.3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  para los picos 1 y 2, respectivamente (tabla 7.7.). El pico 3 de la fracción 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar tampoco se pudo determinar por las causas antes mencionadas. En el caso de la fracción 2 de la goma de

mezquite con 24 h de hidrólisis sólo se observaron 2 picos con pesos moleculares de  $1.1 \times 10^5$  y  $3.1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  (tabla 7.7.).

Tabla 7.7. Distribución del peso molecular de las distintas fracciones de la goma de mezquite parcialmente hidrolizada.

	No. de Pico	Tiempo (min)	Volumen (mL)	Peso molecular ( $\text{g mol}^{-1}$ )
Fracción 1				
	1	465	264	535238
	2	588	335	311207
	3	790	450	ND
Fracción 2				
	1	585	333	316671
	2	693	394	119960
Fracción 3				
	1	393	223	666378
	2	532	303	413204
	3	645	367	207387

ND = No determinado.

La fracción 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar y de la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis mostró tres picos cada una (figura 7.17.). Los pesos moleculares para el pico 1, 2 y 3 de la goma de mezquite sin hidrolizar fueron  $4.8 \times 10^4$ ,  $2.9 \times 10^5$  y  $5.8 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , respectivamente (tabla 7.6.). Mientras que para la goma de mezquite parcialmente hidrolizada fueron de  $2.0 \times 10^5$ ,  $4.1 \times 10^5$  y  $6.6 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , respectivamente (tabla 7.7.).

## 8. Conclusiones

Se estimaron los parámetros de crecimiento para *A. niger* 10 sobre la goma de mezquite utilizando el modelo logístico y se determinó que la fase de latencia presentó una duración de 9.13 h, la máxima concentración de biomasa fue de 3.03 g L<sup>-1</sup> y una tasa específica de crecimiento de 0.07 h<sup>-1</sup>. La producción de biomasa es inversamente proporcional a la complejidad del sustrato utilizado.

Se obtuvo un extracto crudo con una máxima actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de 65.93 U L<sup>-1</sup> después de 84 h de fermentación en medio líquido. La producción de esta enzima se encuentra asociada al crecimiento de *A. niger* 10 sobre la goma de mezquite, con valores del coeficiente asociado al crecimiento de 19.64 U g<sup>-1</sup> y del coeficiente no-asociado al crecimiento de -0.001 U g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, según el modelo de Soto-Cruz y col. (2003). La temperatura óptima para la hidrólisis de la goma de mezquite con el extracto crudo es de 50 °C y tiene una energía de activación de 46.15 KJ mol<sup>-1</sup>.

La utilización de goma de mezquite-glucosa (1:1) produjo 1.6 veces mayor actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa que sólo la utilización de goma de mezquite. Además, la relación carbono-nitrógeno que favorece la producción de la enzima es de 10. La fermentación en medio sólido permite evidenciar su eficacia, en cuanto a la utilización de mayores niveles de fuente de carbono, de producción de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa hasta 10 veces más que en medio líquido, sin embargo, dadas las ventajas en cuanto al escalamiento en procesos en medio líquido, preferimos hacer la producción de la enzima por éste último.

Se detectó la presencia de proteasas en fermentación en medio líquido (1.09 U mL<sup>-1</sup>), que seguramente afecta la producción  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, por lo que se sugiere el uso de inhibidores de proteasas en procesos futuros de éste tipo.



Se obtuvieron los parámetros cinéticos aparentes para el extracto crudo,  $K_m = 4.87 \text{ g L}^{-1}$  y  $V_{\max} = 0.15 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , y para la enzima comercial,  $K_m = 76.45 \text{ g L}^{-1}$  y  $V_{\max} = 3.85 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ . La afinidad por la goma de mezquite es 16 veces mayor para el extracto crudo que para la enzima comercial. El rendimiento de L-arabinosa liberada por el extracto crudo fue de 17.0 %, mientras que para la enzima comercial fue de 2.8 %, por lo que la liberación de L-arabinosa es 6 veces mayor con el extracto crudo que con la enzima comercial.

Del fraccionamiento por cromatografía de interacción hidrofóbica de la goma de mezquite sin hidrolizar y parcialmente hidrolizada (24 h de hidrólisis), se obtuvieron tres fracciones en ambos casos. Su caracterización indica que el contenido total de azúcar, proteína y ácido glucurónico difiere entre las fracciones de goma de mezquite sin hidrolizar, y las fracciones de la goma de mezquite con hidrólisis. Las fracciones más hidrofílicas presentaron congruentemente el mayor contenido de azúcares, mientras las más hidrofóbica presentaron el mayor contenido de proteína. De esta manera se corrobora una modificación del balance hidrofílico-lipofílico de las fracciones, lo cual puede traducirse en que la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis, la fracción 1 de la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis y las fracciones 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis puedan representar una aplicación como agentes estabilizantes con alta actividad superficial.

## 9. Perspectivas

Algunos estudios inmediatos que se pueden derivar de esta tesis se describen a continuación.

En cuanto a la producción de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa se detecta la presencia de enzimas proteolíticas que pueden hidrolizar a la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, por lo que es posible que se pierda constantemente la actividad enzimática. Una alternativa es probar el efecto de inhibidores de actividad proteolítica en fermentación en medio líquido. Otra opción sería cuantificar la actividad proteolítica en fermentación en medio sólido, ya que ha sido reportada la ausencia de proteólisis en este tipo de procesos.

En segunda instancia sería necesario aumentar los títulos de actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, haciendo una optimización de la producción de la enzima probando diferentes microorganismos como son distintas especies de *Aspergillus* como son *A. awamori*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. terreus*, o bien con bacterias, como especies de *Bacillus* o *Clostridium*. También se pueden probar distintos sustratos de origen natural como la pulpa de la remolacha, pulpa de manzana y/o el orujo de uva.

Determinar la presencia de otras actividades enzimáticas presentes en el extracto crudo para comprender de una mejor manera la presencia o no, de efectos sinérgicos en el proceso de hidrólisis.

Hacer un escalamiento a nivel planta piloto de la producción de la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa e implementar procesos de purificación de la misma, ya que su utilidad como enzima pura puede ser importante en procesos donde son mezcladas distintas enzimas purificadas, como en el caso de materiales lignocelulósicos para la producción de L-arabinosa y xilosa, donde mezclan la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa con enzimas xilanolíticas.

Por último probar, mediante la elaboración de emulsiones simples y su evaluación en cuanto a sus propiedades reológicas, la goma de mezquite con 24 h de hidrólisis, la fracción 1 de la goma de mezquite con 24 h de hidrolisis y las fracciones 2 de la goma de mezquite sin hidrolizar y con 24 h de hidrólisis, esperando obtener emulsiones cinéticamente estables.

## 10. Referencias

- Anderson, D. M. W. y Faquhar, J. G. K. 1982. Gum exudates from the genus *Prosopis*. *The International Tree Crops Journal*. 2, 15-24.
- Anderson, D. M. W. y Weiping, W. 1989. The characterization of proteinaceous *Prosopis* (mesquite) gums which are not permitted food additives. *Food Hydrocolloids*. 3, 235-242.
- Angulo, J. L. 1999. Caracterización fisicoquímica de polímeros. LIMUSA. México. pp. 85-90.
- Arias-Ortíz, C., Arriaga-Arellano, E., Barrera-Saldaña, H. A., Bolivar-Zapata, F. G., Bosch-Guha, P., de la Torre-Martínez, M. M., Espinoza-Fernández, J., Galindo-Fentanes, E., Gálvez-Mariscal, A., Gracia-Gasca, A., Herrera-Estrella, L. R., Loyol-Robles, A., Ortega-Lomelín, R., Paredes-López, O., Ramírez-Reivich, T., Revah-Moiseev, S., Serratos-Hernández, J. A., Soberón-Mainero, J., Soberón-Mainero, X., Torres-Pacheco, I., Uribe-de la Mora, J. y Viniegra-Gonzalez, G. 2003. Recomendaciones para el Desarrollo y Consolidación de la Biotecnología en México. Academia Mexicana de Ciencias, A.C. Mexico, D. F. 154 pp.
- Badui, D. S. 1988. Diccionario de tecnología de los alimentos. 1ª edición. Addison Wesley Longman de México. pp. 54.
- Badui, D. S. 1993. Química de los alimentos. 3ª edición. Pearson Educación. México. 648 pp.
- Ballesteros, J. y Fernández, E. 2006. Biotecnología y posthumanismo. Aranzadi, España. 504 pp.
- Beldman, G., Searle-van Leeuwen, M. J. F., de Ruiter, G. A., Siliha, H. A. y Voragen, A. G. J. 1993. Degradation of arabinans by arabinanases from *Aspergillus aculeatus* y *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Polymers*. 20, 159-168.
- Belitz, H. D. y Grosch, W. 1985. Química de los alimentos. 2ª edición. Acribia. Zaragoza. pp. 251-252.

- Berggren, K., Wolf, A., Asenjo, A. A., Andrews, B. A. y Tjerneld, F. 2002. The surface exposed amino acid residues of monomeric proteins determine the partitioning in aqueous two-phase systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1596, 253-268.
- Beristain, C. I. y Vernon-Carter, E. J. 1994. Utilization of mesquite (*Prosopis juliflora*) gum as emulsion stabilizing agent for spray-dried encapsulated orange peel oil. *Drying Technology*. 12, 727-733.
- Beristain, C. I. y Vernon-Carter, E. J. 1995. Studies of the interaction of Arabic (*Acacia senegal*) and mesquite (*Prosopis juliflora*) gum as emulsion stabilizing agents for spray-dried encapsulated orange peel-oil. *Drying Technology*. 13, 455-461.
- Beristain C. I., Azuara E., García H. S. y Vernon-Carter E. J. 1996. Kinetic model for water/oil absorption of mesquite gum (*Prosopis juliflora*) and gum arabic (*Acacia senegal*), *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 379-386.
- Beristain, C. I., García, H. S. y Vernon-Carter, E. J. 2001. Spray-dried encapsulation of cardomom (*Elletaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 34, 398-401.
- Beristain, C. I., Azuara, E., García, H. S. y Vernon-Carter, E. J. 2002. Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil mesquite gum (*Prosopis juliflora*) as wall material. *Journal of Food Science*. 67, 206-211.
- Braverman, J. B. S. 1980. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Manual moderno. México. pp 161-165.
- Brock T. D., Smith, D. W. y Madigan, M. T. 1987. Microbiología. 4ª ed. Prentice Hall Hispanoamericana, México. 118-123.
- Bu'Lock, J. y Kristiansen, B. 1987. Basic Biotechnology. Academic Press. London. 561 pp.
- Bull, A.T., Holt, G. y, Lilly, M.D. 1982. Biotechnology. international trends and perspectives, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris.
- Bunedía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chávez-Ávila, V.M. y Vernon-Carter, E.J. 2007. Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd. M.C. Johnston). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 43, 260-266.
- Cannel, E. y Moo Young, M. 1980. Solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 15, 2-7.

- Crueger, W. y Crueger, A. 1993. *Biología Manual de Microbiología Industrial*. Acribia, Zaragoza. 413 pp.
- Danisco, A/S. 2005. Intermediates. L-arabinose CT99. Disponible en [http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/products%20and%20services/pharma%20and%20healthcare/pharma/intermediates/intermediates\\_en.htm](http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/products%20and%20services/pharma%20and%20healthcare/pharma/intermediates/intermediates_en.htm), Consultado el día 21 de octubre de 2007.
- Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C. y Viniegra-González, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26, 271-275.
- Dickinson, E., Galazka, V. B. y Anderson, D. M. W. 1991. Emulsifying behaviour of gum arabic. 2. Effect of the gum molecular weight on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*. 14, 385-392.
- Dickinson, E. y Stainsby, G. 1988. Emulsion Stability. En: *Advances in Food Emulsions and Foams*. Dickinson, E. y Stainsby, G., Eds., Elsevier Applied Science Publishers, London. 1-44 pp.
- Dickinson, E. y Galazka, V. B. 1992. Emulsion stabilization by protein-polysaccharide complexes. En: *Gums and stabilizers for the Food Industry 6*. Oxford University Press. 351-362 pp.
- Dioggo, M. M., Prazeres, D. M. F., Pinto, N. G. y Queiroz, J. A. 2003. Hydrophobic interaction chromatography of homo-oligonucleotides on derivatized Sepharose CL-6B using and relating two different models for describing the effect of salt and temperature on retention. *Journal of Chromatography A*. 1006, 137-148.
- Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350-356
- Ertola, R., Yantorno, O. y Mignone, C. 1994. *Microbiología industrial*. Departamento de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. Organización de los Estados Americanos. 31-42 pp. Disponible en: [http://www.science.oas.org/Simbio/mbio\\_ind/mbio\\_ind.htm](http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/mbio_ind.htm) Consultado en noviembre de 2005.

- Favela-Torres, E., Córdova-López, J., García-Rivero, M. y Gutiérrez-Rojas, M. 1998. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*. 33, 103-107.
- Felker, P. y Bandurski, R. S. 1979. Use and potential uses of leguminous trees for minimal energy input agriculture. *Economic Botany*. 33, 172-184.
- Felker, P. 1993. Review of applied aspects of *Prosopis*. En: *Prosopis species in the arid and semi-arid zones of India*, J.C. Temari, N.M. Pasecznik y P.C.C. Harris, eds., pp. 11-14. *Prosopis Society of India*, Jodhpur, Rajasthan, India.
- Gandolfi, C y Peralta, R. M. 2000. Production of extracellular protease by *Aspergillus tamari*. *Journal of Basic Microbiology*. 2, 75-81.
- García, S. J. M., Martínez, P.A., Montero, F., Oñaederra, M. y Vivanco, F. 1996. Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. Síntesis. Madrid, España. pp. 291-384.
- García-Carreño, F. L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education*. 3,145-150.
- García-Carreño, F. L. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends in Food Science and Technology*. 7, 197-204.
- García-Carreño, F. L., Dimes, N. y Haard, N. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*. 214, 65-69.
- Gielkens, M. M. C., Visser, J. y de Graaff, L. H. 1997. Arabinoxylan degradation by fungi: characterization of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. *Current genetics*. 31, 22-29.
- Glicksman M. 1969. Gum technology in the food industry. Academic Press, New York. Pp. 97-110.
- Greenwod, C. y Morey, P. 1979. Gummosis in honey mesquite. *Botanical Gazette*. 140, 32-38.
- Gunata, Z., Brillouet, J.M., Voirin, S., Baumes, R. y Cordonnier, R. 1990. Purification and some properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38, 772-776.

- Hames, B. D. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. En: *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. Hames, B. D. y Rickwood, D. Eds. IRL Press, London, p 1-91.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El Reino de los hongos. UNAM-Fondo de Cultura Económica, México. 552 pp.
- Henzler, H. J., Schedel, M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Engineering*. 7, 123-131.
- Hesseltine, C. W. 1972. Biotechnology report: Solid state fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. 14, 517-532.
- Hill, F. A. 1965. Botánica económica “Plantas útiles y productos vegetales”. Omega, Barcelona. pp. 180-182.
- Kaneko, S., Shimasaki, T. y Kusakabe, I. 1993. Purification and some properties of intracellular  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5–16. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 57, 1161-1165.
- Karhumaa, K., Wiedemann, B., Hahn-Hägerdal, B., Boles, E. y Gorwa-Grauslund, M. F. 2006. Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microbial Cell Factories*. 5, 18.
- Kormelink, F. J. M., Searle-van Leewan, M. J. F., Wood, T. M. y Voragen, A. G. J. 1991. Purification and characterization of a (1,4)- $\beta$ -arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35, 753-758.
- Kuster-van Someren, M. A., Kester, H. C. M., Samson, R. A., Visser, J. 1990. Variation in pectinolytic enzymes of the black *Aspergilli*: A biochemical and genetic approach. En *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. J. I. Pitt y R. A. Samson Eds. Plenum Press, New York, pp 321-334.
- Lehninger, A. L. 1979. Bioquímica. 2a ed. Omega, Barcelona. 203-205.
- Lienqueo M. E., Mahn, A. y Asenjo, J. A. 2002. Mathematical correlations for predicting protein retention times in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography*. 978, 71-79.



- Liu, J. Z., Weng, L. P., Zhang, Q. L., Xu, H. y Ji, L. N. 2003. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 14, 137-41.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin fenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 1999. BROCK Biología de los microorganismos. 8<sup>va</sup> ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. 1064 pp.
- McClements, D. J. 1999. Food emulsion. principles, practice ad techniques. C. R. C. Press. Boca Raton, F. L.
- Mirón, J., González, M. P., Pastrana, L. and Murado, M. A. 2002. Diauxic production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture: A dynamic model. *Enzyme and Microbial Technology*. 31, 615-620.
- Moore, J. C. 1964. Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Science*. A2: 835-843.
- Naciones Unidas. 2007. Convenio sobre la Diversidad Biológica. Disponible en: <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-un-es.pdf>.
- Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E. y Vernon-Carter, E. J. 2003. Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydrate Polymers*. 54, 327-333.
- Park, N. H., Yoshida, S., Takakashi, A., Kawabata, Y., Sun, H. J. y Kusakabe, I. 2001. A new method for the preparation of crystalline L-arabinose from arabinoxylan by enzymatic hydrolysis and selective fermentation with yeast. *Biotechnology Letters*. 23, 411-416.
- Pedersen, J.K. 1980. Pectins. En: *Handbook of Water-Soluble Gums and Resins*, (R.L. Davidson, ed.), pp. 15.1-15.21. McGraw Hill Book Company, New York.
- Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E. J. M. Duran-Domínguez, C. y Trejo-Ramírez, S. 1999. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation. I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Research International*, 32, 367-374.

- Pedroza-Islas, R., Álvarez-Ramírez, J. y Vernon-Carter, E. J. 2000. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation-II: disolution and floatability kinetics as selection criteria. *Food Research International*. 33, 119-124.
- Poz Ireland. 2005. Nucleoside analogues. Disponible en: [http://www.pozireland.org/nucleoside\\_analogues.htm](http://www.pozireland.org/nucleoside_analogues.htm), consultado el 5 de diciembre de 2007.
- Pringle, J. R. 1975. Methods for avoiding proteolytic artefacts in studies of enzymes and other proteins from yeast. *Methods in Cell Biology*. 12, 1846-1859.
- Quintero, R. 1985. Prospectiva de la biotecnología en México. En: *Prospectiva de la biotecnología en México*. R. Quintero ed. Fundación Javier Barros Sierra, A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, pp. 461-478
- Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 1, 178-192.
- Randall, R. C., Phillips, G. O. y Williams, P. A. 1989. Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids*. 3, 65-75.
- Righelato, R. C. 1975. Growth kinetics of mycelial fungi. En: *The filamentous fungi*, vol. 1. Smith, J. E. y Berry, D. R. Eds. Edward Arnold, London. 79-103 pp.
- Rombouts, F. M., Voragen, A. G. J., Searl-van, L. M. F., Geraeds, C. C. J. M., Schols, H. A. y Plink, W. 1988. The arabinanases of *Aspergillus niger* – purification and characterization of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases and an endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase. *Carbohydrate Polymers*. 9, 25-47
- Rosfarizan, M. y Ariff, A. B. 2000. Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *Journal of Industrial Microbiology*. 25, 20-24.
- Ruiz, O. M., Nieto, R. D. y Larios, R. I. 1950. Tratado elemental de botánica. 3ª ed. Porrúa, México. p. 29.
- Saha, B. C. 2000.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18, 403-423.
- Scriban, R. 1985. Biotecnología. Manual Moderno, México. pp. 98, 163, 168-1 70.

- SFF. 1980. Instituto Nacional de Ecología. Disponible en: <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/72/localiza.html>.
- Signoret, P. J. 1970. Datos sobre algunas características ecológicas del mezquite (*Prosopis laevigata*) y su aprovechamiento en el valle del mezquite. En: *Mezquites y Huizaches*. IMRNR-AC México. pp. 73-146.
- Solomon, R. 1975. Growth of *Aspergillus* in liquid fermentors. En *Filamentous fungi vol.1, Industrial mycology*. Smith, J. E. y Berry, D. Eds. Edward Arnold, London.
- Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E. y Saucedo-Castaneda, G. 2002. Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnology Progress*. 18, 193-200.
- Susumu, H. 1999. Nutritional and physiological functions and uses of L-arabinose. *Journal of Applied Glycoscience*. 46, 159-165.
- Tagawa, K. y Kaji, A. 1988.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Methods in Enzymology*. 160, 707-712.
- Ulloa, M. y Hanlin, R. T. 1978. Atlas de micología básica. Concepto, México. 158 pp.
- van der Veen, P., Flipphi, M. J. A., Voragen, A. G. J. y Visser, J. 1991. Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. *Archives of Microbiology*. 157, 23-28.
- van der Veen, P., Flipphi, M.J.A., Voragen, A.G.J. y Visser, J. 1993. Induction of extracellular arabinases on monomeric substrates in *Aspergillus niger*. *Archives of Microbiology*. 159, 66-71.
- Vernon-Carter, E. J., Gómez, S. A., Beristain, C. I., Mosqueira, G., Pedrosa-Islas, R. y Moreno-Terrazas, R. C. 1996. Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin – in – water emulsions stabilized by mesquite or arabic gum and their blends. *Journal of Texture Studies*, 27, 625-641.
- Vernon-Carter, E. J., Beristain, C. I. y Pedroza-Islas, R. 1998. Stability of *Capsium annum* oleoresin in water emulsions containing *Prosopis* and *Acacia* gums. *Journal of Texture Studies*. 29, 553-567.
- Vernon-Carter, E.J., Beristain, C.I. and Pedroza-Islas, R. 2000. Mesquite gum (*Prosopis* gum). En: *Novel Macromolecules in Food Systems, Developments in Food Science 41*, (G.

- Doxastakis y V. Kiosseoglou, eds.), pp. 217-238. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Villanueva, D. J. 1983. Distribución actual y características ecológicas del mezquite (*Prosopis laevigata* H. & B. Johnst) en el estado de San Luis Potosí. Boletín divulgativo No. 74. 2ª ed. SARH-INIFAP, División Forestal. México. 36 pp.
- Viniegra-González, G. 1997. Strategies for the selection of molds strains geared to produce enzymes on solid substrates. En: *Advances in Bioprocess Engineering II*. E. Galindo y O. T. Ramírez, eds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 123-135.
- Whistler, R. L. 1993. Exudate gums. En: *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*. 3ª ed. Whistler, R. L. y BeMiller, J. N. Eds. Academic Press, San Diego. pp. 309-316.
- White, E. V. 1947. Isolation of L-arabinose. *Journal of the American Chemical Society*. 69, 715.

## 11. Anexos

### Anexo A. Medio mínimo

El medio mínimo fue preparado conforme a lo reportado por van der Veen y col. (1993), modificando la fuente de carbono. La composición del medio consistía de 2.54 g de  $\text{NaNO}_3$ , 1.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g de  $\text{KCl}$ , 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 1.0 L de agua desionizada, ajustando el pH a 5.6. La fuente de carbono utilizada fue goma de mezquite  $10 \text{ g L}^{-1}$ .

### Anexo B. Conteo de esporas

Con una pipeta bajo condiciones asépticas se tomó aproximadamente 0.5 mL de la suspensión de esporas y se colocó en la cámara de Neubauer que es un portaobjetos esmerilado con un patrón de cuadrículas que cuando es colocado su cubreobjetos, tienen un volumen predeterminado. La cámara tiene 25 cuadros principales y cada uno tiene la capacidad de 0.1 mL. Dentro de estos cuadros tenemos otros 16 cuadros que facilitarán el conteo de las esporas, las cuales son dispersadas por capilaridad (Mádigan y col., 1999).

Para determinar las esporas por mL cosechadas, se contaron las esporas presentes en 10 de los 25 cuadros principales y el promedio de éstos se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = (\bar{X}) \cdot (25) \cdot (10^4) \cdot (FD) \quad (5)$$

donde:  $\bar{X}$  es la media aritmética del número de esporas, 25 es el número de cuadros totales de la cámara de Neubauer,  $10^4$  es el factor de volumen de la cámara de Neubauer y  $FD$  es el factor de dilución utilizado en la cosecha de esporas.

El conteo de esporas se llevó a cabo en el microscopio óptico (Olympus U-PMTVC 2D03325, Japón). Primeramente se realizó la iluminación de Kohler. La cámara de Neubauer fue colocada sobre la platina del microscopio óptico. Se localizó la región cuadrículada con el objetivo de 10x y posteriormente se contaron las esporas con en el objetivo de 40x. Los mililitros que se deben de tomar de la suspensión de esporas cosechadas en el matraz estéril se determinan dividiendo el número de esporas que se desea inocular entre la concentración de esporas obtenida en la cámara de Neubauer.

### Anexo C. Cinética de liberación de *p*-nitrofenol

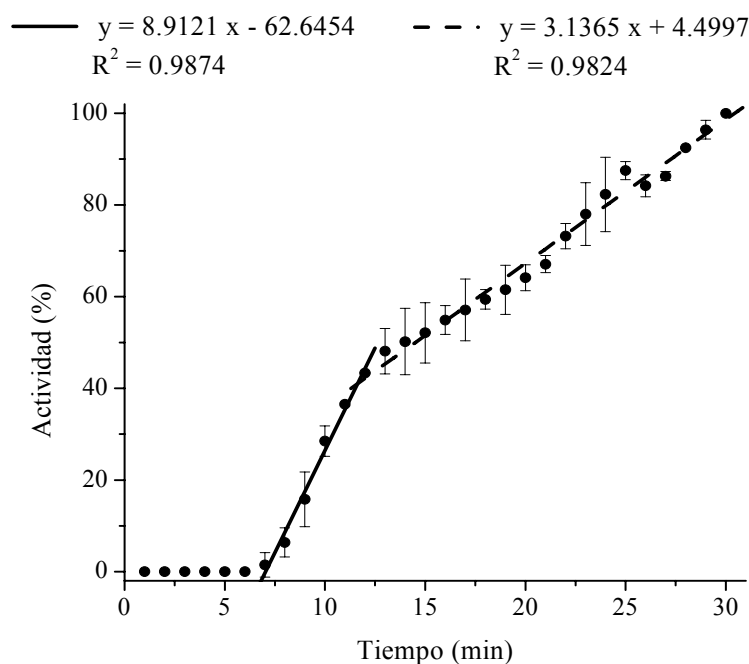


Figura 11.1. Cinética de liberación de *p*-nitrofenol. Temperatura = 30 °C.

Se realizó espectrofotométricamente (Shimadzu UV) en tiempo real (figura 11.1.). Se mezclaron 600  $\mu\text{L}$  de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosido 4 mM y 600  $\mu\text{L}$  de extracto

enzimático. La absorbancia se midió cada minuto durante 30 min a una longitud de onda de 400 nm y una temperatura de 30 °C. El *p*-nitrofenol liberado se estimó utilizando una curva estándar de *p*-nitrofenol (anexo D).

## Anexo D. Curva estándar de *p*-nitrofenol

Se preparó una solución stock de *p*-nitrofenol 2  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  en amortiguador citrato-fosfato pH 5.6. A partir de esta solución stock, se hicieron diluciones utilizando el mismo amortiguador conforme la tabla 11.1.

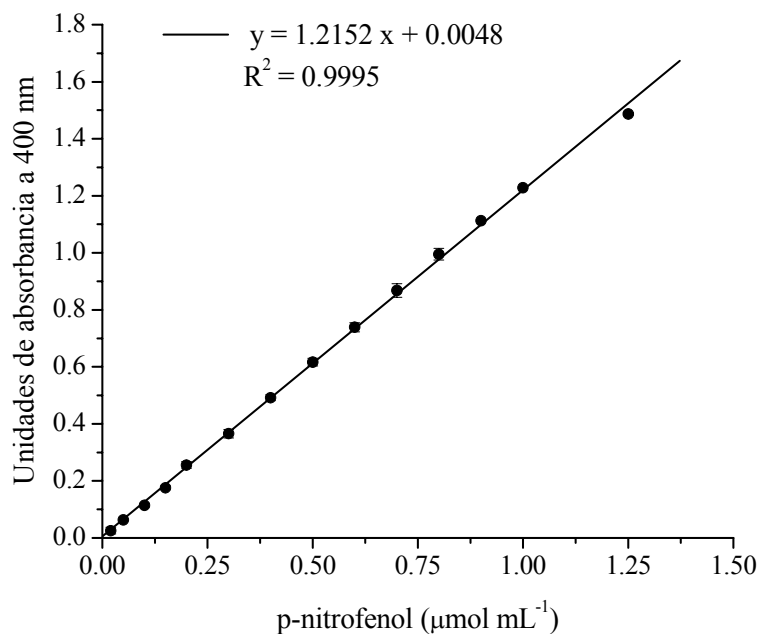


Figura 11.2. Curva estándar de *p*-nitrofenol.

Se hizo una gráfica de concentración de *p*-nitrofenol vs absorbancia a 400 nm (figura 11.2.). Con los valores de absorbancia se hizo un ajuste lineal. Se despejó la incógnita de las

abscisas quedando la ecuación en función de las ordenadas. Se substituyó el valor de absorbancia y se obtuvo la cantidad de *p*-nitrofenol liberado.

Tabla 11.1. Diluciones de *p*-nitrofenol ( $2 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) utilizadas para hacer la curva estándar.

Tubo	Amortiguador (mL)	<i>p</i> -nitrofenol $2 \mu\text{mol mL}^{-1}$ (mL)	<i>p</i> -nitrofenol ( $\mu\text{mol/mL}$ )
1	2.00	0.00	0.00
2	1.98	0.02	0.02
3	1.95	0.05	0.05
4	1.90	0.10	0.10
5	1.85	0.15	0.15
6	1.80	0.20	0.20
7	1.70	0.30	0.30
8	1.60	0.40	0.40
9	1.50	0.50	0.50
10	1.40	0.60	0.60
11	1.30	0.70	0.70
12	1.20	0.80	0.80
13	1.10	0.90	0.90
14	1.00	1.00	1.00
15	0.75	1.25	1.25
16	0.50	1.50	1.50
17	0.00	2.00	2.00



## Anexo E. Curva estándar de Albúmina Sérica Bovina

Se preparó una solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA)  $4 \text{ g L}^{-1}$ . A partir de esta solución stock, se hicieron diluciones utilizando agua conforme la tabla 11.2.

Se hizo una gráfica de concentración de BSA vs absorbancia a 750 nm (figura 11.3.). Con los valores de absorbancia se hizo un ajuste de segundo orden. Se despejó la incógnita de

las abscisas mediante la ecuación  $y = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4 \cdot a \cdot c}}{2 \cdot a}$  y con la aplicación “Solver” dentro

de la hoja de cálculo “Microsoft Excel”, se compararon los datos obtenidos y no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el uso de estos métodos.

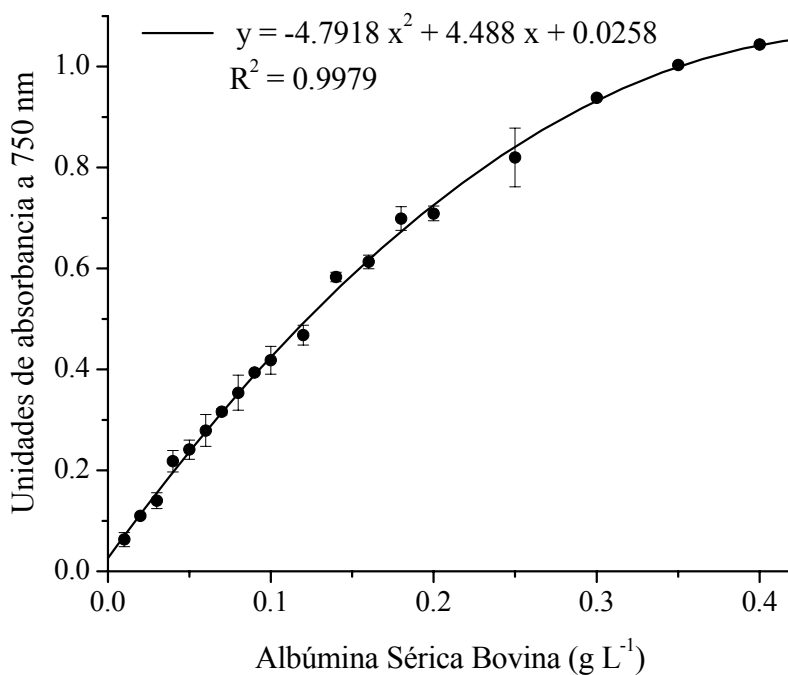


Figura 11.3. Curva estándar de albúmina sérica bovina.

Tabla 11.2. Diluciones de BSA ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizadas para hacer la curva estándar.

Tubo	BSA $0.4 \text{ g L}^{-1}$ (mL)	Agua (mL)	BSA ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	0.000	1.000	0.000
2	0.025	0.975	0.010
3	0.050	0.950	0.020
4	0.075	0.925	0.030
5	0.100	0.900	0.040
6	0.125	0.875	0.050
7	0.150	0.850	0.060
8	0.175	0.825	0.070
9	0.200	0.800	0.080
10	0.225	0.775	0.090
11	0.250	0.750	0.100
12	0.300	0.700	0.120
13	0.350	0.650	0.140
14	0.400	0.600	0.160
15	0.450	0.550	0.180
16	0.500	0.500	0.200
17	0.625	0.375	0.250
18	0.750	0.250	0.300
19	0.875	0.125	0.350
20	1.000	0.000	0.400

## Anexo F. Medio de cultivo Pontecorvo

El medio Pontecorvo fue preparado conforme a la tabla 11.3.

Tabla 11.3. Composición del medio de cultivo Pontecorvo.

Compuesto	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
Fuente de Carbono*	10.0
NaNO <sub>3</sub>	2.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.52
KCl	0.52
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.52
ZnSO <sub>4</sub>	1 x 10 <sup>-3</sup>
FeCl <sub>3</sub>	8.5 x 10 <sup>-4</sup>
Extracto de Levadura	5.0
Metales Traza**	1.0 mL

\*La cantidad de fuente de carbono en cada tratamiento se agregó conforme la tabla 11.4.

Tabla 11.4. Diseño experimental de las fuentes de carbono probadas.

Tratamiento	Goma de mezquite (g L <sup>-1</sup> )	Arabinosa (g L <sup>-1</sup> )	Glucosa (g L <sup>-1</sup> )
A	10	0	0
B	5	5	0
C	0	10	0
D	5	0	5
E	0	0	10

\*\*La solución stock de metales traza se preparó conforme a la tabla 11.5.

Tabla 11.5. Composición de la solución stock de metales traza.

Compuesto	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	100
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
CuSO <sub>4</sub>	250

El pH final se ajustó a 5.6 con NaOH 1 N.

## Anexo G. Medio de cultivo con diferentes relaciones carbono-nitrógeno

Para hacer medios de cultivo con diferentes relaciones carbono-nitrógeno (C/N) fue necesario calcular la relación C/N de la goma de mezquite. Partiendo de la composición de la goma de mezquite (Orozco-Villafuerte y col., 2003) se puede conocer los gramos de cada monosacárido contenidos en 5 g de goma de mezquite:

1.76 g Arabinosa	$\left  \frac{60 \text{ g C}}{150 \text{ g Arabinosa}} \right $	= 0.7054 g C
1.89 g Galactosa	$\left  \frac{72 \text{ g C}}{180 \text{ g Galactosa}} \right $	= 0.7560 g C
0.06 g Ramnosa	$\left  \frac{72 \text{ g C}}{164 \text{ g Ramnosa}} \right $	= 0.0249 g C
0.71 g Ácido Glucurónico	$\left  \frac{72 \text{ g C}}{194 \text{ g Ácido. Glucurónico}} \right $	= 0.2624 g C

Sumando los gramos de carbono aportados por cada azúcar se obtiene en total 1.75 g de carbono y dividiendo este valor entre el contenido de proteína reportado (0.002 g de nitrógeno) se determina que la relación C/N para la goma de mezquite fue de 874.

El extracto de levadura reportó que el contenido de nitrógeno que aporta es de 0.5 g de nitrógeno por cada 5 g de extracto de levadura, de tal forma que se hicieron los balances para determinar la relación C/N utilizada en el medio Pontecorvo (anexo F) siendo esta de 7.47. Para determinar el efecto de la fuente de nitrógeno se fijó la cantidad del extracto de levadura en 1.23 g y el ajuste de la relación C/N se hizo con  $\text{NaNO}_3$ .

El diseño experimental para la optimización de la relación C/N en la producción  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa utilizando 10 g de fuente de carbono, goma de mezquite-glucosa (1:1), se muestra en la tabla 11.6.

Tabla 11.6. Cantidad de NaNO<sub>3</sub> agregada al medio de cultivo Pontecorvo (Anexo F).

Tratamiento	NaNO <sub>3</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Relación C/N
1	22.00	1
2	3.79	5
3	1.52	10
4	0.76	15
5	0.38	20

En todos los tratamientos se agregaron 1.23 g de extracto de levadura.

## Anexo H. Soporte para la fermentación en medio sólido

Como soporte inerte se utilizó espuma de poliuretano. Primeramente se lavó tres veces con agua caliente y se dejó secar a 60 °C durante 24 h. Posteriormente se molió y se tamizó con malla del número 20.

## Anexo I. Medio de cultivo de la fermentación en medio sólido

Se preparó una solución stock diez veces más concentrada del medio Pontecorvo descrito anteriormente (anexo F) utilizando goma de mezquite y glucosa (1:1) como fuente de carbono y una relación C/N igual a 10, quedando de la siguiente manera: 50 g de glucosa, 50 g de goma de mezquite, 15.2 g de NaNO<sub>3</sub>, 1.23 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.2 g de KCl, 5.2 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10.0 mg de ZnSO<sub>4</sub>, 8.5 mg FeCl<sub>3</sub>, 12.3 g de extracto de levadura y 10 mL de metales traza en 1.0 L de agua destilada-desionizada. Se prepararon 50 mL y se hicieron tres diluciones (Tabla 11.7).

Tabla 11.7. Diluciones para obtener distintas concentraciones de medio de cultivo.

Tratamiento	Pontecorvo concentrado (mL)	Agua (mL)	Concentración final con base a la fuente de carbono (g L <sup>-1</sup> )
1	10.0	0.0	100
2	7.5	2.5	75
3	5.0	5.0	50
4	2.5	7.5	25

### Anexo J. Curva estándar de Tirosina

Se preparó una solución stock de tirosina 40 mg L<sup>-1</sup> en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7.0. Se hicieron las diluciones en el mismo amortiguador (Tabla 11.8.). La cantidad de tirosina fue estimada por el método de Lowry (1951). Se hizo una gráfica de concentración de tirosina vs absorbancia a 750 nm (figura 11.4.).

Con los valores de absorbancia se hizo un ajuste de segundo orden. Se despejó la incógnita de las abscisas mediante la ecuación  $y = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4 \cdot a \cdot c}}{2 \cdot a}$  y con la aplicación “Solver” dentro de la hoja de cálculo “Microsoft Excel”, se compararon los datos obtenidos y no se encontraron diferencias significativas (P < 0.05) en el uso de estos.

Tabla 11.8. Diluciones de la curva estándar de tirosina.

Tubo	Tirosina 40 mg L <sup>-1</sup> (mL)	Amortiguador (mL)	Tirosina (μg mL <sup>-1</sup> )
1	0.0	1.0	0
2	0.1	0.9	4
3	0.2	0.8	8
4	0.3	0.7	12
5	0.4	0.6	16
6	0.5	0.5	20
7	0.6	0.4	24
8	0.7	0.3	28
9	0.8	0.2	32
10	0.9	0.1	36
11	1.0	0.0	40



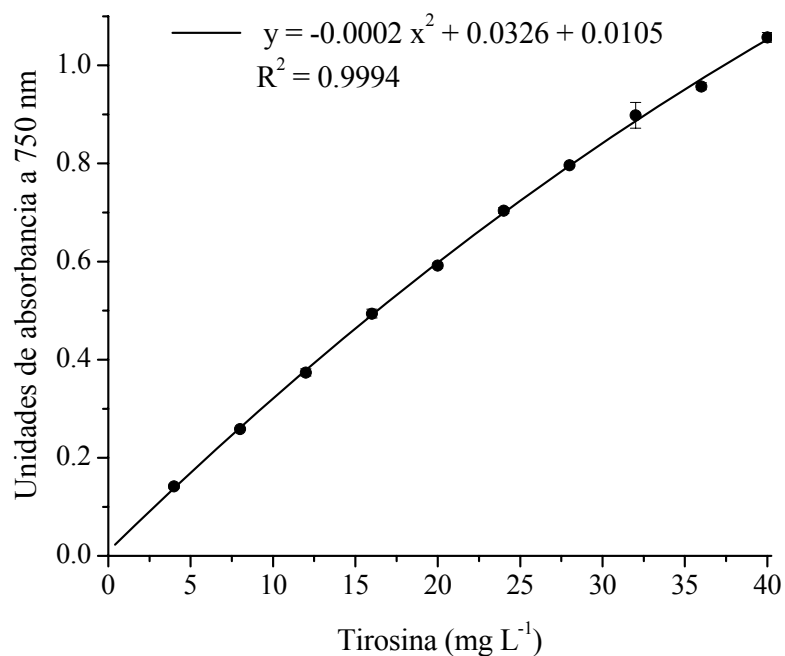


Figura 11.4. Curva estándar de tirosina.

## Anexo K. Curva estándar de L-arabinosa

Se preparó una solución stock de L-arabinosa 10 g L<sup>-1</sup> en agua destilada. A partir de esa solución stock se hicieron diluciones utilizando agua destilada con forme a la tabla 11.9.

Se cuantificó L-arabinosa por HPL y se hizo una gráfica de concentración de L-arabinosa vs área (figura 11.5.). Con los valores de área se hizo un ajuste lineal. Se despejó la incógnita de las abscisas quedando la ecuación en función de las ordenadas. Se sustituyó el valor de absorbancia y se obtuvo la cantidad de L-arabinosa.

Tabla 11.9. Diluciones de L-arabinosa ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizadas en la curva estándar.

Tubo	L-arabinosa $10 \text{ g/L}$ (mL)	Agua (mL)	Concentración (g/L)
1	0.05	9.95	0.05
2	0.10	9.90	0.10
3	0.50	9.50	0.50
4	1.00	9.00	1.00
5	2.50	7.50	2.50
6	10.00	0.00	10.00

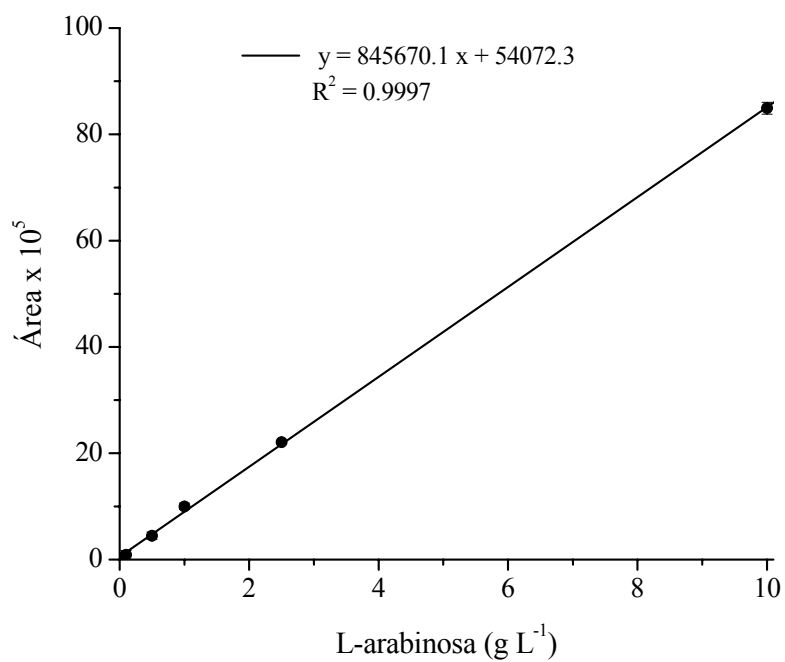


Figura 11.5. Curva estándar de L-arabinosa.

## Anexo L. Curva estándar de Sacarosa

Se preparó una solución stock de sacarosa  $100 \text{ mg L}^{-1}$  en agua destilada. A partir de esta solución stock se hicieron diluciones utilizando agua conforme la tabla 11.10.

Tabla 11.10. Diluciones de sacarosa ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizadas para hacer la curva estándar.

Tubo	Sacarosa $100 \text{ mg L}^{-1}$ (mL)	Agua (mL)	Sacarosa ( $\text{mg L}^{-1}$ )
1	0.0	2.0	0.0
2	0.2	1.8	10
3	0.4	1.6	20
4	0.6	1.4	30
5	0.8	1.2	40
6	1.0	1.0	50
7	1.2	0.8	60
8	1.4	0.6	70
9	1.6	0.4	80
10	1.8	0.2	90
11	2.0	0.0	100

Se hizo una gráfica de concentración de sacarosa vs absorbancia (figura 11.6.). Con los valores de absorbancia se hizo un ajuste lineal. Se despejó la incógnita de las abscisas

quedando la ecuación en función de las ordenadas. Se sustituyó el valor de absorbancia y se obtuvo la cantidad de sacarosa.

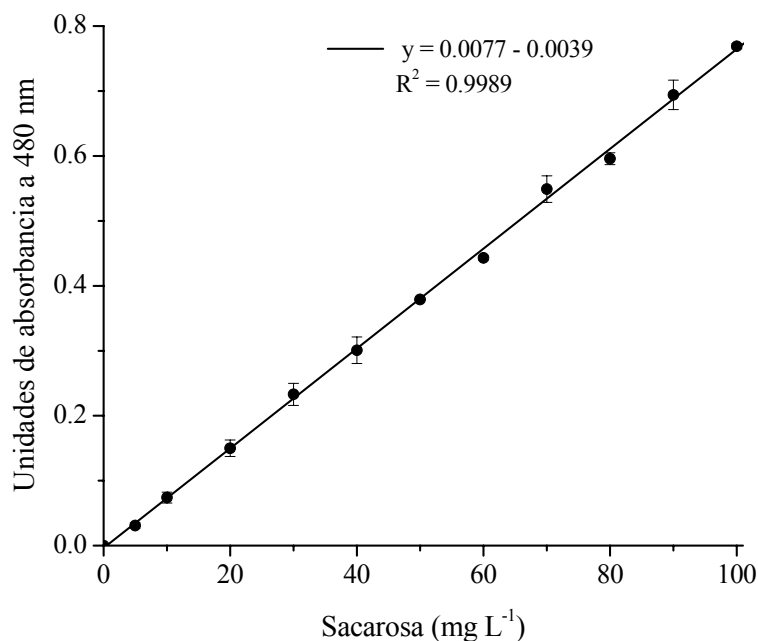


Figura 11.6. Curva estándar de sacarosa.

## Anexo M. Contenido de Proteína por el método de Kjeldahl

El contenido de proteína total por este método se llevó a cabo colocando 0.5 g de muestra en un matraz microkjeldahl con 12 mL de ácido sulfúrico concentrado, 2 g de una mezcla de sulfato de potasio pentahidratado y sulfato cúprico (10:1 p/p como solución catalizadora). La muestra se digirió por 5 a 6 h. Posteriormente se destiló y tituló con una solución valorada de ácido clorhídrico. El nitrógeno total se calculó por la ecuación:

$$\text{Nitrógeno total} = \frac{(B - A) \cdot N \cdot 0.04}{\text{Peso de la muestra}} \cdot (6.25) \cdot (100\%) \quad (6)$$

donde  $A$  es el blanco (mL de HCl gastados),  $B$  es la muestra (mL de HCl gastados),  $N$  es la normalidad del HCl, 0.04 son los miliequivalentes del HCl y 6.25 es el factor de conversión a proteína en gomas de *Prosopis* (Anderson y Farquhar, 1982).

El método de Kjeldahl determina el nitrógeno total, tanto proteico (nitrógeno amino y amido) como nitrógeno no proteico (urea, etc.). El método consiste en la digestión de la muestra con  $H_2SO_4$  y la formación de  $NH_4OH$ , que es recibido en ácido para finalmente titularlo con álcali de una concentración conocida- El método de Kjeldahl es el más común y por lo tanto permite comparar fácilmente resultados con otros laboratorios (Badui, 1993).

## Anexo N. Curva estándar de Ácido Glucurónico

Se preparó una solución stock de ácido glucurónico  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  en agua destilada. A partir de esta solución stock se hicieron diluciones utilizando agua conforme la tabla 11.10.

Tabla 11.11. Diluciones de ácido glucurónico ( $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizadas para hacer la curva estándar.

Tubo	ácido glucurónico $0.2 \text{ g L}^{-1}$ (mL)	Agua (mL)	ácido glucurónico ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	0	1.0	0
2	0.2	0.8	10
3	0.4	0.6	20
4	0.6	0.4	30
5	0.8	0.2	40
6	1.0	0.0	50

Se hizo una gráfica de concentración de ácido glucurónico vs absorbancia (figura 11.7.). Con los valores de absorbancia se hizo un ajuste lineal. Se despejó la incógnita de las abscisas quedando la ecuación en función de las ordenadas. Se sustituyó el valor de absorbancia y se obtuvo la cantidad de sacarosa.

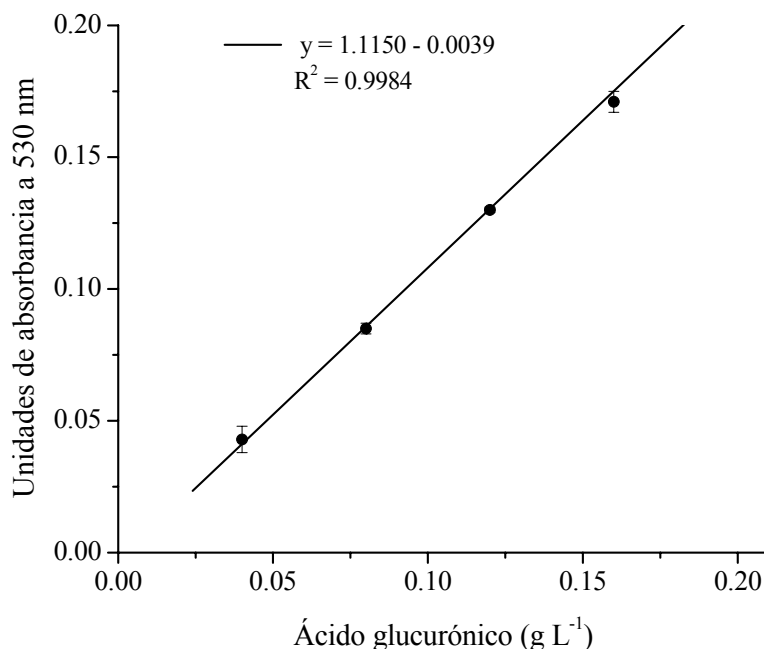


Figura 11.7. Curva estándar de ácido glucurónico.

## Anexo Ñ. Curva estándar de Cromatografía de Permeación en Gel

Para analizar los cromatogramas y calcular los pesos moleculares se hizo una curva de calibración que relaciona el peso molecular con el volumen de elución. Los estándares utilizados, su peso molecular correspondiente y su volumen de elución se muestran en la tabla 11.12.

Tabla 11.12. Estándares utilizados en la curva estándar de cromatografía de permeación en gel.

Estándar	mL	PM	Kav
Quimiotripsina	432.06	25000	0.8815
Albumina	405.15	67000	0.7730
Aldolasa	375.13	158000	0.6519
Catalasa	361.02	232000	0.5950
Ferritina	222.24	440000	0.3530
Tiroglobulina	219.68	669000	0.0250

Con los valores del peso molecular se hizo un ajuste lineal (figura 11.8.). Se corrió una muestra de colorante azul de dextrano y se determinó su tiempo de elución en 375 min en una cama de 461 mL. Con estos datos se hizo la corrección del Kav y con los valores de la regresión se determinó la distribución del peso molecular de cada una de las fracciones.

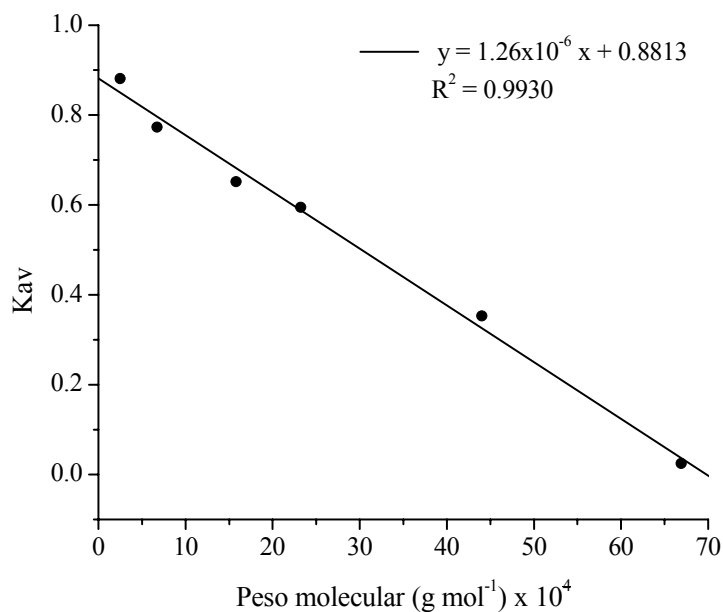


Figura 11.8. Curva estándar de distribución de pesos moleculares.

## 12. Glosario

*Actividad de agua:* Medida de la cantidad de agua disponible (agua libre) en un producto cualquiera capaz de propiciar el crecimiento microbiano o las reacciones químicas y enzimáticas.

*Agente turgente:* líquido o solvente que se hincha, que aumenta su densidad.

*Amortiguador:* Es aquella solución que resiste un cambio de pH aunque se le añada pequeña cantidades de un ácido o una base fuerte.

*Anfifílico:* Molécula con un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico. Es decir una molécula que tiene un final que atrae el agua y un final que repele el agua.

*Azúcar hemicelulósico:* nombre genérico de un grupo muy amplio de heteropolisacáridos que se localizan, junto con la celulosa y la lignina, en la pared celular vegetal, forma parte de la fibra cruda de los alimentos y es insoluble en agua. De estructura química muy compleja, poco definida, está formada por polímeros que pueden contener moléculas de D-xilosa, L-arabinosa, L-ramnosa, D-glucosa, D-manosa, D-galactosa y de los ácidos D-glucorónico y D-galacturónico, generalmente unidas por enlaces glucosídicos  $\beta(1,4)$ .

*Azúcar reductor:* azúcar con un grupo cetona o aldehído libre, con capacidad reductora.

*Biocatalizador:* es un catalizador de las reacciones bioquímicas de los seres vivos. Se consideran biocatalizadores las enzimas, las hormonas y las vitaminas. Un biocatalizador reduce la energía de activación de una reacción química, haciendo que ésta sea más rápida o más lenta.

*Biodegradable:* dícese de las sustancias que pueden ser degradadas por microorganismos.

*Biomasa:* es la cantidad másica de microorganismo y puede estar dada o no por unidad de volumen.

*Cenizas:* residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica.

*Cepa:* en microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.



*Cinética enzimática:* estudia las variaciones de velocidad de la reacción catalítica. En las reacciones enzimáticas existe un límite en cuanto a la cantidad de sustrato que el enzima es capaz de transformar en el tiempo.

*Coloide:* partícula sólida o semisólida en suspensión y dispersa en un líquido, como agua, con un tamaño que varía de 1nm a 1 $\mu$ m, generalmente con grupos ionizables en la superficie que producen una carga eléctrica que la estabiliza a través de fuerzas de repulsión. Las proteínas, los polisacáridos y otras moléculas forman coloides.

*Dializar:* proceso para separar las sustancias coloides y cristalinas de una solución por la diferencia de su velocidad de difusión a través de una membrana semipermeable.

*Crecimiento diáuxico:* Es el desarrollo de microorganismos sobre dos fuentes de energía presentes al mismo tiempo.

*Emulsificante:* Sustancias que hacen posible la formación o mantenimiento de una mezcla uniforme de dos o más fases inmiscibles.

*Enzima constitutiva:* Es aquella que su concentración en la célula es constante y no está influenciada por la concentración de un sustrato.

*Enzima:* Son proteínas o asociaciones de proteínas y otras moléculas orgánicas o inorgánicas que funcionan como catalizadores capaces de aumentar la velocidad de reacciones químicas específicas.

*Especificidad:* Capacidad de un enzima de discriminar entre dos sustratos competitivos.

*Esporas:* Célula reproductora asexual que forman numerosos hongos y plantas y algunos protozoos. Las esporas son resistentes al calor, desecamiento y otras condiciones adversas y se mantienen en estado de reposo hasta que encuentran un medio favorable al desarrollo o germinación.

*Estructura cuaternaria:* Pone de manifiesto cómo se disponen en el espacio las cadenas individuales polipeptídicas de una proteína que posee más de una cadena.

*Estructura primaria:* Se refiere al esqueleto covalente de la cadena polipeptídica, y establece de modo específico la secuencia de sus restos aminoácidos.

*Estructura terciaria:* Se refiere al modo como la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar la estructura estrechamente plegada y compacta de las proteínas globulares.

*Estructura tridimensional:* Factor determinante en la actividad biológica de las proteínas.

Tiene un carácter jerarquizado, es decir, implica niveles de complejidad creciente que dan lugar a 4 tipos de estructuras: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

*Extracto enzimático:* Es el producto filtrado de una fermentación con cierta actividad enzimática.

*Fase de latencia:* Fase de adaptación al medio, existe aumento de la masa celular pero no hay aumento en el número de células.

*Fase estacionaria:* No hay aumento neto de microorganismos, lo que no significa que no se dividan algunos, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros.

*Fase logarítmica o exponencial:* Fase donde se produce un incremento exponencial del número de microorganismos.

*Fermentación:* Transformación de la materia orgánica por acción de microorganismos como parte natural de su metabolismo.

*Fiálides:* Célula conidiógena que desde un extremo origina por brotación y sin aumentar su longitud, los fialoconidios o fialosporas.

*Glicosilación:* Proceso químico en el que se adiciona un carbohidrato a otra molécula.

*Hidrocoloide:* Polisacáridos y sus derivados de origen vegetal o microbiano que se pueden dispersar en agua fría o caliente para producir geles, dispersiones o soluciones viscosas a bajas concentraciones.

*Hidrofílico:* Sustancia o grupo químico polar capaz de absorber y retener agua, generalmente por medio de enlaces de hidrógeno.

*Hidrofóbico:* Sustancia o grupo químico apolar que no se une al agua y que por el contrario, la rechaza

*Hidrolisis:* Reacción química en la que el agua actúa como reactivo y produce ruptura de enlaces.

*Hifas:* Células sin clorofila que forman el talo de los hongos.

*K<sub>m</sub> (constante de Michaelis-Menten):* Corresponde a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de su máximo. En

condiciones definidas de medio, pH, temperatura, etc., la  $K_m$  tiene un valor fijo para cada enzima y sirve para caracterizarla.

*Liofilizar*: Proceso que consiste en la deshidratación de una sustancia por sublimación al vacío. Consta de tres fases: sobrecongelación, desecación primaria y desecación secundaria.

*Metabolito*: Sustancia de bajo peso molecular que interviene en el metabolismo como objeto de transformación, generalmente mediante acción enzimática.

*Métulas*: Son aquellas que sostienen a las hifas productoras de esporas.

*Mutarrotación*: Variación de la actividad óptica de soluciones acuosas recientes de azúcares reductores que se debe a la tendencia al equilibrio entre las formas lineal y cíclica (en sus dos configuraciones  $\alpha$  y  $\beta$ ) lo cual provoca dicha variación hasta lograr un valor estable a una temperatura constante.

*Nucleótidos análogos*: Drogas que combaten el VIH interfiriendo la habilidad del virus para producir una enzima clave llamada “reversa transcriptasa”. Actúa a nivel ADN.

*Pectina*: Heteropolisacárido estructural, que le confiere rigidez a las paredes celulares de muchos frutos en los que actúa como agente cementante.

*Propiedades reológicas*: Propiedades mecánicas que permiten modelar el comportamiento de los materiales. Por ejemplo: viscosidad aparente, módulos de almacenamiento y pérdida, coeficientes de esfuerzos normales, viscosidad compleja y funciones complejas de viscoelasticidad no lineal.

*Reacciones catabólicas*: Implican la disgregación y oxidación de las biomoléculas, con su consecuente destrucción, obteniéndose energía en forma de ATP en el proceso.

*Relación carbono-nitrógeno*: Indica la fracción de carbono orgánico frente a la de nitrógeno. Esta relación es de suma importancia ya que estos elementos los utilizan los microorganismos para su desarrollo.

*Represión catabólica*: Se refiere a la inhibición en la síntesis de enzimas, generalmente inducibles, por intermediarios producidos en el rápido catabolismo de la fuente de carbono.

*Sacárido*: Denominación genérica de los hidratos de carbono y sus derivados.

*Sacarificación*: Hidrólisis de oligo y polisacáridos.

*SDS-PAGE*: Técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Sodio Dodecil Sulfato bajo condiciones reductoras. es un método rápido, reproducible y ampliamente utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas.

*Sinergismo*: Potenciación mutua de la acción biológica, por lo general de dos sustancias, de manera que la acción de la mezcla es superior a la mera adición de los efectos de cada una de ellas.

*Velocidad máxima*: Se obtiene cuando la velocidad de reacción se hace independiente de la concentración de sustrato. Este valor depende de la cantidad de enzima que se tenga.

*Xilano*: Polisacárido más abundante después de la celulosa.

**L-ARABINOSE PRODUCTION BY HYDROLYSIS OF MESQUITE GUM BY A  
CRUDE EXTRACT WITH  $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASE ACTIVITY FROM  
*Aspergillus niger***

**PRODUCCIÓN DE L-ARABINOSA A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS DE LA GOMA  
DE MEZQUITE POR UN EXTRACTO CRUDO CON ACTIVIDAD  $\alpha$ -L-  
ARABINOFURANOSIDASA DE *Aspergillus niger***

J. M. Loeza-Corte<sup>1</sup>, J. R. Verde-Calvo<sup>1</sup>, F. Cruz-Sosa<sup>1</sup>,  
E. J. Vernon-Carter<sup>2</sup> and S. Huerta-Ochoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Planta Piloto de Fermentaciones, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina, C.P. 09340, México D.F., México.*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Bioprosesos, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina. C.P. 09340, México D.F., México.*

Received 25<sup>th</sup>, April 2007; Accepted 11<sup>th</sup>, October 2007

**Abstract**

A crude enzymatic extract from *Aspergillus niger* 10 with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity (EC 3.2.1.55) was obtained and its effect on the hydrolysis of mesquite gum was determined and compared to that of a commercial  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *A. niger*. The growth parameters of *A. niger* 10 obtained were  $X_{\max} = 3.03 \text{ g L}^{-1}$  and  $\mu_{\max} = 0.07 \text{ h}^{-1}$ . The maximum enzymatic activity obtained was  $65.93 \text{ U L}^{-1}$ . Optimum temperature and activation energy for the crude extract were  $50^\circ\text{C}$  and  $46.15 \text{ KJ mol}^{-1}$  and for the commercial enzyme  $40^\circ\text{C}$  and  $52.76 \text{ KJ mol}^{-1}$ , respectively. The apparent kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{\max}$  for the crude extract were  $4.87 \text{ g L}^{-1}$  and  $0.15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , and for the commercial enzyme  $76.45 \text{ g L}^{-1}$  and  $3.85 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , respectively. Yields of L-arabinose recovery for the crude extract and the commercial enzyme were 17.04 % and 2.78 %, respectively, based on the reported average content of L-arabinose in mesquite gum.

**Keywords:**  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, *Aspergillus niger*, mesquite gum, L-arabinose, enzymatic hydrolysis.

**Resumen**

Se obtuvo un extracto enzimático crudo a partir de *Aspergillus niger* 10 con actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) y fue comparado con una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa comercial sobre la hidrólisis enzimática de la goma de mezquite. Los parámetros de crecimiento obtenidos para *A. niger* 10 fueron:  $X_{\max} = 3.03 \text{ g L}^{-1}$  y  $\mu_{\max} = 0.07 \text{ h}^{-1}$ . La máxima actividad enzimática obtenida fue  $65.93 \text{ U L}^{-1}$ . La temperatura óptima y energía de activación para el extracto crudo fueron de  $50^\circ\text{C}$  y  $46.15 \text{ KJ mol}^{-1}$ , mientras que para la enzima comercial fueron de  $40^\circ\text{C}$  y  $52.76 \text{ KJ mol}^{-1}$ . Los parámetros cinéticos de la hidrólisis  $K_{m-app}$  y  $V_{\max-app}$  con el extracto crudo fueron de  $4.87 \text{ g L}^{-1}$  y  $0.15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , y para la enzima comercial fueron de  $76.45 \text{ g L}^{-1}$  y  $3.85 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. Los rendimientos de L-arabinosa con el extracto crudo y la enzima comercial fueron de 17.04 % y 2.78 %, respectivamente, basados en lo reportado para el contenido promedio de L-arabinosa en la goma de mezquite.

**Palabras clave:**  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, *Aspergillus niger*, goma de mezquite, L-arabinosa, hidrólisis enzimática.

**1. Introduction**

Mesquite gum is an exudate produced by the trunk and branches of *Prosopis* spp trees, which are extensively distributed in the arid and semi-arid lands of Mexico (Vernon-Carter *et al.*, 2000). The genus is used for a variety of purposes and has a long tradition of use where it grows (Felker, 1993). Mesquite is of great economic importance to the inhabitants in this region as it is a source of food,

forage, fuel, construction material, and even medicine. Furthermore, this species has great ecological value because it helps to control erosion and to improve soil fertility. However, many inhabitants where this resource grows live in conditions of extreme poverty, and in order to obtain a livelihood they deforest mesquite trees for forage, wood and charcoal, which on turn has caused an irreversible loss of genetic diversity (Buendía-González *et al.*, 2007). Thus, an ongoing effort is

\* Corresponding author: E-mail: sho@xanum.uam.mx  
Phone (+52) 5558044999, fax: (+52) 5558044712

seeking for new technological alternatives that include the non-destructive exploitation of this resource in hope that it will provide the inhabitants of these regions with economical benefits, thus avoiding its deforestation (Vernon-Carter *et al.*, 2000). One of the most important aspects of *P. laevigata*, which provides it with an added value, is that it produces a gum that has similar chemical composition (Orozco-Villafuerte *et al.*, 2003) and physicochemical properties as those exhibited by gum Arabic. In general terms, it may be stated that mesquite gum is the neutral salt of a complex acidic branched polysaccharide formed by a core of  $\beta$ -D-galactose residues (43.3 %), comprising a (1-3)-linked backbone with (1-6)-linked branches (Vernon-Carter *et al.*, 2000), bearing L-arabinose (40.4 %), L-rhamnose (1.3 %),  $\beta$ -D-glucuronate (16.2 %) (Anderson and Weiping, 1989; Vernon-Carter *et al.*, 2000; Orozco-Villafuerte *et al.*, 2003), and 4-O-methyl- $\beta$ -D-glucuronate (Anderson and Weiping, 1989; Vernon-Carter *et al.*, 2000) as single sugar or oligosaccharide side chains. Mesquite gum also contains a small amount of protein (0.7-5.8 %), which may be central to the overall primary structure branches (Vernon-Carter *et al.*, 2000).

Purified L-arabinose has potential and current industrial applications. The sweet taste of L-arabinose is similar to that of sucrose, but approximately half the sweetness. Naturally occurring arabinose is the L-form, and it is not metabolized in animals; thus it is a non-caloric sugar. Furthermore, it strongly inhibits uncompetitively intestinal sucrase and consequently inhibits the absorption of sucrose from the small intestine. The addition of 2-3% L-arabinose to sucrose causes about a 60 % reduction of the digestion of sucrose in the small intestine (Susumu, 1999). L-arabinose is widely used in the development of antiviral agents such as nucleoside analogues, and is a raw material in the manufacture of L-ribose, which is used in for pharmaceutical applications such as synthetic oligonucleotides (Danisco, 2007). Simultaneous co-utilization of L-arabinose and D-xylose with recombinant strains of *S. cerevisiae* improved bioethanol production from lignocellulosic biomass (Karhumaa *et al.*, 2006).

L-arabinose has been obtained by mild acid hydrolysis of mesquite gum with 75.0 % (White, 1947) and 40.4 % yields (Orozco-Villafuerte *et al.*, 2003) based on the maximum theoretical yield obtainable, estimated from the approximate chemical composition of the gum used in the experiments.

$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase and other arabinases have been used to produce L-arabinose through enzymatic hydrolysis of complex polysaccharides. Apple juice ultrafiltration retentate arabinan was hydrolyzed by a commercial preparation of Pectinase 29 with a yield of 70.0 % (Rombouts *et al.*, 1988). Deproteinized sugar beet pulp was hydrolyzed with a blend of commercial pure  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase

and *endo*-arabinase obtaining yields as high as 88.8 % (Spagnuolo *et al.*, 1999). Arabinoxylan from corn fiber was hydrolyzed with a commercial preparation of  $\beta$ -xyylanase,  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase with 75.8 % yield (Park *et al.*, 2001).

Enzymatic hydrolysis, as compared to acid hydrolysis, has the advantages of high specificity on the substrate, requires mild reaction conditions, and suffers no loss of saccharide due to side reactions. After the hydrolysis of complex polysaccharide, the resultant sugar mixture can be separated by chromatography (Park *et al.*, 2001).

Thus, complex polysaccharide substrates like mesquite gum could be used to induce  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity to prepare hydrolysates such as L-arabinose. Therefore, the aim of this work was to obtain an enzymatic crude extract with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity to release L-arabinose from mesquite gum, and compare these results with those obtained with a commercial enzyme.

## 2. Materials and methods.

### 2.1. Materials

Tear drops were collected from mesquite trees (*Prosopis laevigata*) located around the locality of Río Verde in the Mexican State of San Luis Potosí, during October 1999 – May 2000. The gum was purified by dispersing it in water, filtered through Whatman No. 1 filter paper, dialyzed in double distilled and deionized water using a cellulose membrane of 10,000 Da, with water rechanges every 4 h, during 24 h, and dried in a LABCONCO® LYPHLOCK 6 (Cole Parmer, Chicago, ILL) freeze-drier (Orozco-Villafuerte *et al.*, 2003). A commercial  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) from *Aspergillus niger* was purchased from Megazyme International Ireland Ltd. (Bray Co., Wicklow, Ireland) with a 99.989 % of purity. Prior to usage the commercial enzyme was dialyzed in double distilled and deionized water using a cellulose membrane of 10,000 Da, with water rechanges every 4 h, during 24 h to eliminate the ammonium sulfate and sodium azide contained in the commercial preparation. Manufacturer reports 40°C as the optimum temperature for activity with this enzyme. Potato dextrose agar (PDA) was obtained from BD DIXON (BD Company, Sparks, MD). The chemicals NaNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaOH and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were supplied by J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). Tween 80, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, *p*-nitrophenol and L-arabinose were purchased from Sigma (St. Luis, MO).

### 2.2. Crude enzymatic extract

A crude  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase extract was obtained by filtration of the fermentation broth from

a strain of *A. niger* 10. The strain was kept at the Fermentations Pilot Plant, from the Biotechnology Department of the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). The microorganism was grown in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 30 mL of PDA medium during 5 days at 30 °C. After this time the spores produced were harvested with a tween 80 solution (0.01 %). Then a suspension of ca.  $2 \times 10^7$  spores, counted by Neubauer chamber, was inoculated into the slightly modified minimum medium proposed by van der Veen et al. (1993) that contained 10.0 g mesquite gum, 2.54 g NaNO<sub>3</sub>, 1.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g KCl, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 1.0 L deionized water. pH was adjusted to 5.6 with 1N NaOH, temperature was maintained at 30 °C and the broth was continually stirred at 150 rpm during 152 h. Samples were withdrawn at different time intervals, filtered, and activity of the crude extracts and pH were determined. Biomass of *A. niger* 10 growth was obtained after broth filtration by dry weight and modeled with the integrated form of the logistic model (Díaz-Godínez et al., 2001; Mirón et al., 2002; Liu et al., 2003):

$$X(t) = \frac{X_{\max}}{1 + \left( \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \right) \cdot e^{(-\mu_{\max} \cdot t)} \right)} \quad (1)$$

where  $X$  is the biomass concentration at any time =  $t$ ,  $t$  is the fermentation time,  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate,  $X_{\max}$  is the maximum biomass concentration, and  $X_0$  is the biomass concentration at  $t = 0$ .

The Soto-Cruz model (Soto-Cruz et al., 2002) was used for estimating the activity of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase:

$$P(X) = P_0 + \alpha \cdot (X - X_0) + \frac{\beta \cdot X_{\max}}{\mu_{\max}} \cdot \ln \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right) \quad (2)$$

where  $P_0$  is the enzyme activity at  $t = 0$ ,  $\alpha$  is the growth-associated coefficient for the enzyme and  $\beta$  is the non-growth-associated coefficient for enzyme. Estimation of the kinetic parameters in both equations was done using a non-linear least square fitting program called "Solver" contained in Microsoft Excel.

### 2.3. Enzymatic activity

The enzymatic activity of the commercial and crude extract of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase was determined by reacting of 150  $\mu$ L of the commercial and crude enzyme extract with 150  $\mu$ L of 4 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside dissolved in citrate-phosphate (0.2 M and 0.1 M, respectively) buffer, pH 5.6 at 30 °C for 10 min. The reaction was stopped by addition of 900  $\mu$ L of 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Activity of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase was determined

spectrophotometrically (Shimadzu UV-160A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) by measuring the absorbance of released *p*-nitrophenol at 400 nm (Tagawa and Kaji, 1988). One activity unit was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu$ mol of *p*-nitrophenol per minute under the assay conditions. Protein contents for the crude enzyme extract and the commercial enzyme were determined according to the Lowry method (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as standard. Temperature for achieving optimal activity of the enzymes (commercial and crude extract) was established by performing the activity assay at 20, 30, 40, 50, 60 and 70 °C.

### 2.4. Activation energy

The activation energy required to initiate the hydrolysis reaction by the crude enzymatic extract and the commercial enzyme preparations was determined using an Arrhenius type expression:

$$A = A_0 \cdot e^{-Ea/RT} \quad (3)$$

where  $A$  is the enzymatic activity,  $A_0$  is the Arrhenius factor,  $Ea$  is the activation energy,  $R$  is the gas constant (8.314 KJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), and  $T$  is the absolute temperature. A plot of  $\ln(A)$  versus  $1/T$  generates a straight line of slope  $-Ea/R$ .

### 2.5. Enzymatic hydrolysis of mesquite gum

A volume of 150  $\mu$ L of the crude extract (obtained after 84 h of fermentation and previously dried in a freeze-drier) or commercial enzyme preparations (both with 1 U of enzymatic activity) were mixed with 150  $\mu$ L of mesquite gum aqueous solutions in citrate-phosphate buffer (0.2-0.1 M) at pH 5.6 with different gum concentrations (5, 10, 40, 70, 100, 130, 160 and 200 g L<sup>-1</sup>). The hydrolysis kinetics was carried out at 30 °C. Samples were withdrawn every hour for evaluating the kinetics of the commercial or crude extract of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. L-arabinose concentrations could not be detected when mesquite gum concentration was less than 5 g L<sup>-1</sup> in the case of the crude extract or 10 g L<sup>-1</sup> in the case of the commercial enzyme. Enzymatic activity was determined as described above. The enzymatic reaction followed the Michaelis-Menten model:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (4)$$

where  $v$  is the reaction rate,  $V_{\max}$  is the maximum rate of L-arabinose released,  $K_m$  is the Michaelis-Menten constant and  $S$  is the mesquite gum concentration. The fit of  $K_m$  and  $V_{\max}$  parameters was done using the non-linear least square fitting program "Solver".

The yield of L-arabinose was determined by hydrolyzing 300  $\mu$ L of a 16 % (w/v) mesquite gum solution with 300  $\mu$ L of crude extract or commercial enzyme with 8 U of enzymatic activity in citrate-

phosphate buffer (0.2-0.1 M) at pH 5.6 and 30 °C during 96 h. The reaction was stopped by adding 1.8 mL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M. Quantification of L-arabinose was done as explained below.

### 2.6 Quantification of L-arabinose

The amount of L-arabinose produced was determined with an Agilent series 1100 high pressure liquid chromatograph (Palo Alto, CA), operated in the normal phase mode, fitted with a Rezex RHM monosaccharides column (300 x 7.8 mm, 8 µm; Phenomenex, Inc., Torrance, CA), and a refractive index detector (G1362A). Water was used as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup> at 35 °C. Peaks were integrated with the Agilent Chem Station software.

### 2.7 Statistical analysis

All experiments were done in triplicate and statistical analysis was carried out using the Duncan's test with a significance level set at 5 % with the statistical software package NCSS (2001, Kaysville, Utah).

## 3. Results and Discussion.

The experimental data of the growth kinetics for *A. niger* 10 fitted well ( $R^2 = 0.9412$ ) the logistic model (Fig. 1), with values of  $\mu_{max}$  of 0.07 h<sup>-1</sup> and  $X_{max}$  of 3.03 g L<sup>-1</sup>. The lag phase was estimated as 9.13 h from the fitted data. Comparison of our  $\mu_{max}$  and  $X_{max}$  values obtained with *A. niger* 10 with those obtained with other strains of *A. niger* and other saccharides as substrates are given in Table 1. As can be seen,  $X_{max}$  is highly dependent on the complexity of the saccharide used as substrate. The simpler saccharide, glucose, had a higher  $X_{max}$  (Favela-Torres *et al.*, 1998). Pectin is a linear polysaccharide with a molecular weight ranging between 50 x 10<sup>3</sup> to 180 x 10<sup>3</sup> Da (Pedersen, 1980), so that it is not surprising that *A. niger*  $X_{max}$  for this polysaccharide (Díaz-Godínez *et al.*, 2001) was better than that calculated for mesquite gum, which has a highly branched structure and an average molecular weight greater than 2 x 10<sup>6</sup> Da (Vernon-Carter *et al.*, 2000). The behavior of  $\mu_{max}$  seems to be rather more complex than that of  $X_{max}$ . The estimated value for  $\mu_{max}$  using mesquite gum as substrate was considerably lower than for pectin, but was practically the same as that for glucose. These results are difficult to explain in terms of the molecular

structure of the substrates, and they seem to rather be a function of the microorganism employed which was *A. niger* 10 in the case of glucose and mesquite gum but was *A. niger* C28B25 in the case of pectin.

Fig. 1 shows the fit of the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase crude extract activity data to the Soto-Cruz model ( $R^2 = 0.9738$ ). Maximum activity was 65.93 U L<sup>-1</sup> after 84 h of fermentation, which was used to carry out the hydrolysis of mesquite gum. The values for parameters  $\alpha$  and  $\beta$  were 19.64 U g<sup>-1</sup> and -0.01 U g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectively. While the value of parameter  $\beta$  was near zero, the relatively high value of parameter  $\alpha$  suggests that the activity of the crude extract was closely associated to the kinetic growth parameters of the mold.

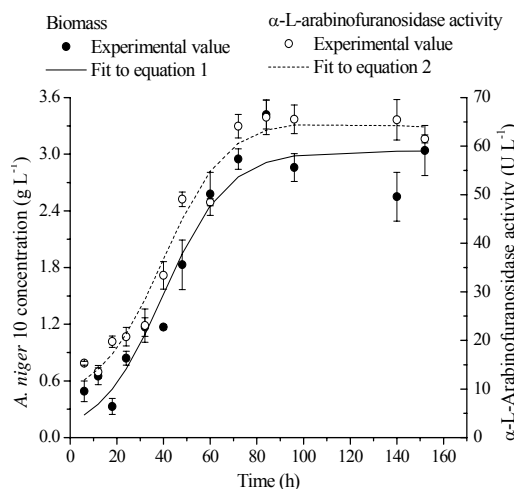


Fig. 1. Growth kinetics of *A. niger* 10 using mesquite gum like carbon source and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase volumetric activity obtained from *A. niger* 10 with different fermentation times. Initial pH = 5.6 and temperature of 30 °C.

The specific activity obtained at 84 h of fermentation with the crude extract was 0.33 U mg<sup>-1</sup> of protein, while that the commercial enzyme reported in the data sheet (40 U mg<sup>-1</sup> of protein) was 121 times higher.

The effect of temperature on the crude extract enzymatic activity is shown in Fig. 2. The highest activity occurred at 50 °C. This temperature falls in between the 46 °C reported by van der Veen *et al.* (1991) and the 60 °C reported by Kaneko *et al.* (1993) and by Gunata *et al.* (1990) as being optimum for  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *A. niger* strains.

Table 1. Comparison of  $\mu_{max}$  and  $X_{max}$  for *Aspergillus niger* using as substrate different saccharides

Substrate	$X_{max}$ (g L <sup>-1</sup> )	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Microorganism	Reference
Mesquite gum (10 g L <sup>-1</sup> )	3.03	0.07	<i>A. niger</i> 10	This work
Glucose (100 g L <sup>-1</sup> )	12.00	0.08	<i>A. niger</i> 10	Favela-Torres <i>et al.</i> (1998)
Pectin (15 g L <sup>-1</sup> )	4.38	0.22	<i>A. niger</i> C28B25	Díaz-Godínez <i>et al.</i> (2001)
Pectin + sucrose (15 + 40 g L <sup>-1</sup> )	11.00	0.19	<i>A. niger</i> C28B25	Díaz-Godínez <i>et al.</i> (2001)



Table 2. Comparison of  $K_m$  values for  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase on different substrates

Substrate	$K_m$ (g L <sup>-1</sup> )	Enzyme	Reference
Mesquite gum	76.45	Commercial $\alpha$ -L-arabinofuranosidase	This work
1,5-L-arabinan	20.40	Purified $\alpha$ -L-arabinofuranosidase	Tagawa and Kaji (1988)
Mesquite gum	4.87	Enzymatic crude extract (apparent $K_m$ value)	This work
<i>p</i> -nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside	1.36	Purified $\alpha$ -L-arabinofuranosidase	Tagawa and Kaji (1988)
L-arabinan	0.26	Purified $\alpha$ -L-arabinofuranosidase	Tagawa and Kaji (1988)

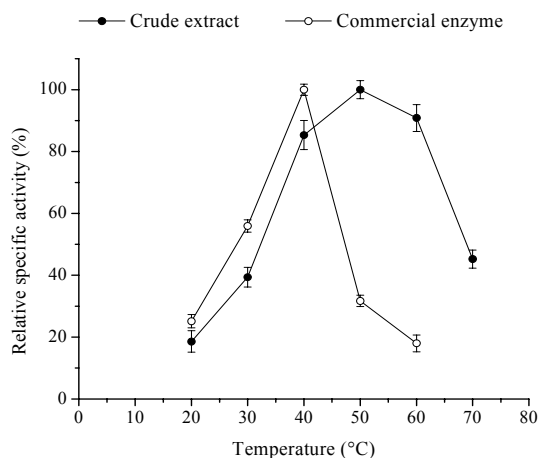


Fig. 2. Effect of temperature on  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity, at pH 5.6 with citrate-phosphate buffer (0.2-0.1 M). The y-axis represents the relative specific activity, i.e., the ratio of the maximum specific activity expressed as percentage.

The activation energy required for the mesquite gum hydrolysis was 46.15 KJ mol<sup>-1</sup> with the crude extract estimated using a temperature interval between 20-50°C, and of 52.76 KJ mol<sup>-1</sup> for the crude extract using a temperature range of 20-40°C. These results indicate that the hydrolysis reaction is probably more susceptible to temperature changes with the crude enzymatic extract than with the commercial enzyme possibly due to the synergistic enzyme action of diverse enzymes (e.g. glucosidase and rhamnosidase, induced possibly by the presences galactose and rhamnose residues in whole mesquite gum) contained in the crude extract.

The hydrolysis kinetics produced by the crude enzymatic extract and the commercial enzyme are shown in Fig. 3. These curves were modeled with the Michaelis-Menten equation (Eq. 4) with the following values calculated for the apparent  $K_m$  and apparent  $V_{max}$  for the crude enzymatic extract (4.87 g L<sup>-1</sup> and 0.15  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>, respectively) and  $K_m$  and  $V_{max}$  for the commercial enzyme (76.45 g L<sup>-1</sup> and 3.85  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>, respectively) (Table 2). The value of  $K_m$  is an indicator of the affinity of the enzyme for the substrate. Our results show that the crude extract had sixteen-fold times greater affinity for mesquite gum than the commercial enzyme.

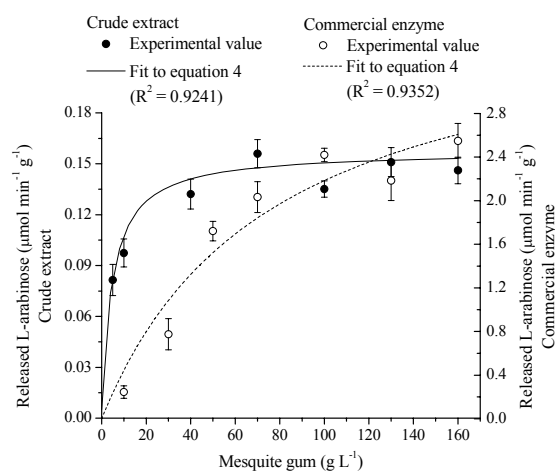


Fig. 3. Mesquite gum hydrolysis kinetics using the crude enzymatic extract and the commercial enzyme at pH 5.6 with citrate-phosphate buffer (0.2-0.1 M) and 30 °C.

These results affected  $V_{max}$  values, which were twenty five-fold times greater for the commercial enzyme than for the enzymatic crude extract. Tagawa and Kaji (1988) reported that L-arabinan hydrolysis by a purified  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase proceeded in two kinetic processes; a rapid process responsible for up to 30 % of the hydrolysis attributable to the cleavage of one unit L-arabinofuranose side chains which were attached along a main chain; and a slow process responsible for the cleavage of the main chain composed of  $\alpha$ -L-1 $\rightarrow$ 5-linked arabinofuranose units. Saha (2000) mentioned that most  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases are exoenzymes, which act upon the (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 5)-arabinosyl bonds located on the side chains of the polysaccharides. Thus, it is probable that in the case of mesquite gum, the commercial enzyme acted mainly on these side chains, whereas the crude extract, which may contain other enzymes, appeared to have greater ability for cleaving the (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 5)-arabinosyl bonds contained within the macromolecular structure of mesquite gum, leading to greater release of L-arabinose. Rombouts *et al.* (1988) suspected that two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases and an endo-1 $\rightarrow$ 5- $\alpha$ -L-arabinanase had considerable synergistic effects on the production of L-arabinose.

The amount of L-arabinose released by the crude enzymatic extract was 17.04  $\pm$  1.08 %, and

whereas for the commercial enzyme was  $2.78 \pm 0.18$  %, based on the reported average value content of 40.4 % of the L-arabinose in whole mesquite gum (Orozco-Villafuerte et al., 2003).

## Conclusions

The obtention of L-arabinose from mesquite gum was more effective using an enzymatic crude extract with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity than a purified enzyme preparation. These results are important in the economy of the process, as the production of crude extracts is lower than the purified enzymes. Procedures for increasing the growth kinetics of *A. niger* will probably result in higher  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity, and thus in higher L-arabinose yields. Higher L-arabinose yields represent the stepping stone for further potential products developments using this compound as an intermediate.

## References

- Anderson, D.M.W. and Weiping, W. (1989). The characterization of proteinaceous *Prosopis* (mesquite gums) which are not permitted food additives. *Food Hydrocolloids* 3, 235-242.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chávez-Ávila, V.M. and Vernon-Carter, E.J. (2007). Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd. M.C. Johnston). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43, 260-266.
- Danisco, A/S. (2007). Intermediates. L-arabinose CT99. Available at [http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/products%20and%20services/pharma%20and%20healthcare/pharma/intermediates/intermediates\\_en.htm](http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/products%20and%20services/pharma%20and%20healthcare/pharma/intermediates/intermediates_en.htm).
- Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C. and Viniegra-González, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 271-275.
- Favela-Torres, E., Córdova-López, J., García-Rivero, M. and Gutiérrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry* 33, 103-107.
- Felker, P. (1993). Review of applied aspects of *Prosopis*. In: *Prosopis species in the arid and semi-arid zones of India*, (J.C. Temari, N.M. Pasecznik and P.C.C. Harris, eds.), Pp. 11-14. *Prosopis* Society of India, Jodhpur, Rajasthan, India.
- Gunata, Z., Brillouet, J.M., Voirin, S., Baumes, R. and Cordonnier, R. (1990). Purification and some properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38, 772-776.
- Kaneko, S., Shimasaki, T. and Kusakabe, I. (1993). Purification and some properties of intracellular  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57, 1161-1165.
- Karhumaa, K., Wiedemann, B., Hahn-Hägerdal, B., Boles, E. and Gorwa-Grauslund, M.F. (2006). Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microbial Cell Factories* 5, 18.
- Liu, J.Z., Weng, L.P., Zhang, Q.L., Xu, H. and Ji, L.N. (2003). A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal* 14, 137-41.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Mirón, J., González, M.P., Pastrana, L. and Murado, M.A. (2002). Diauxic production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture: A dynamic model. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 615-620.
- Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E. and Vernon-Carter, E.J. (2003). Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydrate Polymers* 54, 327-333.
- Park, N.H., Yoshida, S., Takakashi, A., Kawabata, Y., Sun, H.J. and Kusakabe, I. (2001). A new method for the preparation of crystalline L-arabinose from arabinoxylan by enzymatic hydrolysis and selective fermentation with yeast. *Biotechnology Letters* 23, 411-416.
- Pedersen, J.K. (1980). Pectins. In: *Handbook of Water-Soluble Gums and Resins*, (R.L. Davidson, ed.), Pp. 15.1-15.21. McGraw Hill Book Company, New York.
- Rombouts, F.M., Voragen, A.G.J., Searl-van, L.M.F., Geraeds, C.C.J.M., Schols, H.A. and Plink, W. (1988). The arabinanases of *Aspergillus niger* - purification and characterization of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases and an endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase. *Carbohydrate Polymers* 9, 25-47.
- Saha, B.C. (2000).  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 403-423.

- Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E. and Saucedo-Castaneda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnology Progress* 18, 193-200.
- Spagnuolo, M., Crecchio, C. and Pizzigallo, M.D.R. (1999). Fractionation of sugar beet pulp into pectin, cellulose and arabinose by arabinases combined with ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering* 64, 685-691.
- Susumu, H. (1999). Nutritional and physiological functions and uses of L-arabinose. *Journal of Applied Glycoscience* 46, 159-165.
- Tagawa, K. and Kaji, A. (1988).  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Methods in Enzymology* 160, 707-712.
- van der Veen, P., Flipphi, M.J.A., Voragen, A.G.J. and Visser, J. (1993). Induction of extracellular arabinases on monomeric substrates in *Aspergillus niger*. *Archives of Microbiology* 159, 66-71.
- van der Veen, P., Flipphi, M.J.A., Voragen, A.G.J. and Visser, J. (1991). Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. *Archives of Microbiology* 157, 23-28.
- Vernon-Carter, E.J., Beristain, C.I. and Pedroza-Islas, R. (2000). Mesquite gum (*Prosopis* gum). In: *Novel Macromolecules in Food Systems, Developments in Food Science 41*, (G. Doxastakis and V. Kiosseoglou, eds.), Pp. 217-238. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- White, E. V. (1947). Isolation of L-arabinose. *Journal of the American Chemical Society* 69, 715-715.

Iztapalapa, D. F. a 21 de diciembre de 2007.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis


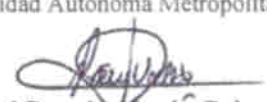
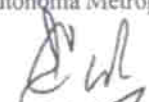

MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA GOMA DE  
MEZQUITE PARA LA OBTENCIÓN DE L-ARABINOSA

Que presentó  
Juan Manuel Loeza Corte

Comité tutorial:

- Director: Dr. Sergio Huerta Ochoa  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Asesor: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter  
Universidad Autónoma Metropolitana

Comité de evaluación:

- Presidente:   
Dr. Francisco Cruz Sosa  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Secretario:   
Dr. José Ramón Verdé Calvo  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Vocal:   
Dr. Carlos Regalado González  
Universidad Autónoma de Querétaro
- Vocal:   
Dr. Juan Orozco Villafuerte  
Universidad Autónoma del Estado de México