

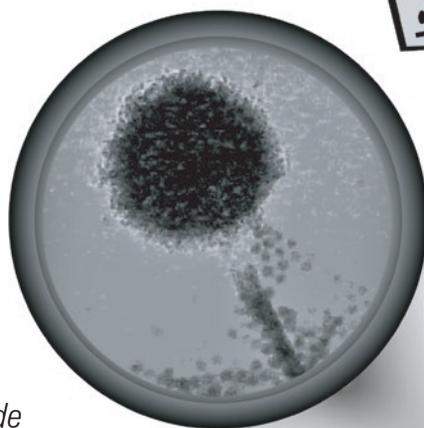
# La Metodología de Superficies de Respuesta para Describir la Producción de Endopoligalacturonasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 sobre Cáscara de Limón

M. en C. Ma. Aurora Martínez Trujillo\*  
Dr. Guillermo Aguilar Osorio\*\*

**Palabras clave:** endopoligalacturonasas, *Aspergillus flavipes* FP-500, residuos agroindustriales.

## Resumen

La *Aspergillus flavipes* FP-500, cepa silvestre mexicana seleccionada por su gran capacidad para producir endopoligalacturonasas, fue capaz de utilizar diversos residuos agroindustriales como sustrato, generando la mejor producción de esta enzima cuando se utilizó cáscara de limón como fuente de carbono. Mediante la aplicación de un diseño factorial 24 con puntos centrales, se evaluó el efecto de cuatro parámetros del proceso sobre la producción de endopoligalacturonasas: temperatura de incubación, concentración de la fuente de carbono, pH inicial del medio y velocidad de agitación, resultando estos dos últimos los más significativos para la misma. El desarrollo del Diseño Compuesto Central permitió trazar una superficie de respuesta, cuyo análisis canónico determinó que es posible obtener una producción máxima mayor a 20 U/ml de endopoligalacturonasa, cuando el pH es de 5 y la agitación de 150 rpm.



## Acerca de los autores...

\* Laboratorio de Catálisis Enzimática, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec;  
e-mail: auro\_mt@prodigy.net.mx

\*\* Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química UNAM,  
e-mail: gao@servidor.unam.mx

## Abstract

*The Aspergillus flavipes FP-500, a mexican wild strain selected by its great capacity to produce endopolygalacturonase, was able to use several agro industrial residues as the unique substrate. It showed a higher production of this enzyme when lemon peel was used as carbon source. Using a 24 factorial design with central points, the effect of four process parameters was probed on edopolygalacturonase production: incubation temperature, carbon source concentration, initial medium pH and shake speed, resulting the last two the most significant for this. With a central composite design, it was possible to obtain a response surface curve, in which the canonical analysis determined that it is possible to obtain a maximum production higher than 20 U/ml of endopolygalacturonase activity when initial pH was 5 and shake speed was 150 rpm.*

## Introducción

La pectina es el polisacárido más complejo de los que constituyen la pared celular de las plantas. Se conforma por una cadena lineal de unidades de ácido galacturónico unidas entre sí mediante enlaces  $\alpha(1-4)$ , los cuales pueden estar acetilados en el C-2 o en el C-3, o metilados en el C-6 (homogalacturonano).

En ocasiones, esta cadena lineal puede verse interrumpida por unidades de ramnosa (ramnogalacturonano), las cuales a su vez pueden tener ramificaciones formadas por cadenas de diferentes tamaños de residuos de L-arabinosa, L- y D-galactosa, así como algunas unidades de D-xilosa, L-arabinosa y L-rhamnosa. El grado y

tipo de ramificación varía dependiendo del origen de la pectina (De Vries y Visser, 2001).

Debido a su complejidad estructural, las pectinas sólo pueden ser degradadas por microorganismos capaces de producir la maquinaria enzimática adecuada. Así, las pectinasas son un grupo de enzimas que actúan de manera sinérgica y secuencial para degradar a la pectina. Se dividen en dos grupos: las despolimerizantes, conocidas también como poligalacturonasas, y las saponificantes, o esterases. Las endopoligalacturonasas pertenecen al primer grupo, y su función principal es atacar a la estructura de manera aleatoria, liberando oligosacáridos de distintos tamaños, lo que provoca una considerable disminución de la viscosidad de la pectina en solución.

Esta característica hace a este tipo de enzimas muy atractivas para su uso a nivel industrial (Sathyanarayana y Panda, 2003). Las pectinasas son sintetizadas principalmente por plantas y microorganismos. Diversas cepas del género *Aspergillus* han sido estudiadas con el objetivo de utilizarlas para su producción a escala industrial, siendo *A. niger* la especie más empleada para este fin.

Como sucede en general con los productos de fermentación, diversos parámetros tiene influencia sobre los niveles de producción y sobre la fisiología del microorganismo (Stratilova y col., 1995). El manejo de un diseño factorial 2k es el primer paso dentro de un proceso de optimización. Permite hacer una exploración de los parámetros del sistema que tienen una mayor influencia sobre la variable de respuesta. El uso posterior de la

metodología de superficie de respuesta permite describir su comportamiento en un rango de valores de estas variables (Montgomery, 2001). Esta es una metodología muy utilizada a nivel industrial para la optimización de procesos de producción (Sathyanarayana y Panda, 2003).

El objetivo de este trabajo fue identificar los factores del proceso que tienen mayor influencia sobre la producción de endopoligalacturonasas por *A. flavipes* FP-500, y a partir de eso, desarrollar la Metodología de Superficie de Respuesta para describir dicha producción sobre los parámetros del proceso.

## **Metodología**

### *Microorganismo*

Para el estudio referido, se empleó la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500, que se conservó en cajas Petri con agar papa dextrosa a 4°C.

### *Condiciones de fermentación*

Para todos los experimentos se cosecharon esporas del hongo a partir de cajas Petri con cinco días de crecimiento, inoculando  $1 \times 10^6$  esp/ml de medio de cultivo. Para identificar la fuente de carbono que generaba una mayor producción de endopoligalacturonasas, el hongo se hizo crecer en frascos de 30 ml con 10 ml de medio basal (2 g/L de  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ , y 5 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ , y fuente de carbono al 1% (p/v). Las fuentes de carbono utilizadas fueron cáscaras de limón, de manzana, de tamarindo, y de uva o pectina.

Luego de identificar la fuente de carbono que inducía la mayor producción de endopoligalacturonasas, se desarrolló a nivel matraz un diseño factorial 24, probando los parámetros X1 = Temperatura de incubación (35 y 40 °C); X2 = pH inicial del medio (3.5 y 5.0); X3 = Concentración de la fuente de carbono (1 y 2%); y X4 = Velocidad de Agitación (100 y 200 rpm), con dos niveles [inferior (-1) y superior (+1), respectivamente], a fin de establecer los parámetros más significativos para la producción de la enzima.

### *Metodología de superficie de respuesta*

A partir de los resultados obtenidos, se desarrolló la metodología de superficie de respuesta. Para esto, primero se elaboró la metodología de paso ascendente, con base en el modelo matemático que se obtuvo en el primer diseño experimental (24 con puntos centrales). Posteriormente se utilizó un Diseño Compuesto Central, que permitió trazar la superficie de respuesta correspondiente con base en un modelo matemático cuadrático, con cuyo análisis canónico fue posible determinar las condiciones de operación bajo las cuales se alcanza la máxima producción dentro del rango explorado.

## *Análisis de las muestras para cuantificación de la actividad enzimática*

Al sobrenadante de cada muestra generada durante la etapa experimental, se le cuantificó la actividad de endopoligalacturonasas, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente (Trejo-Aguilar, *et al.*, 1996). La unidad de actividad endopectinolítica se definió como la cantidad de enzima que reduce la viscosidad de 10 ml de pectina a un 50% en 10 min. con un pH de 4.2.

## *Resultados y discusión*

### *Identificación de la mejor fuente de carbono para la producción de endopoligalacturonasas*

Diversos estudios referentes a la síntesis de pectinasas por cepas de *Aspergillus*, han demostrado que este grupo de enzimas es inducido por pectina libre y pectina asociada a otros sustratos (Teixeira, *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que la cantidad y tipo de enzimas expresadas por estos hongos depende de la naturaleza y tipo de la fuente de carbono utilizada (Sathyanarayana y Panda, 2003). De esta manera, residuos agroindustriales ricos en pectina pueden ser utilizados como sustratos para producir pectinasas por estos hongos (de Vries y Visser, 2001). *A. flavipes* FP-500 produjo endopoligalacturonasas en todas las fuentes de carbono probadas. La Tabla 1 muestra la producción alcanzada en cada caso. Como es posible observar, la mejor producción (~7.5 UI/ml) se obtuvo cuando se utilizó como sustrato la cáscara de limón. Debido a lo anterior, la metodología de superficie de respuesta se desarrolló utilizando esta fuente de carbono.

<b>Sustrato</b>	<b>Endopoligalacturonasas (U/ml)</b>
Cáscara de limón	7.85
Cáscara de manzana	1.83
Cáscara de uva	1.77
Cáscara de tamarindo	0.73
Pectina	0.15

**Tabla 1.** Producción comparativa de endopoligalacturonasas en los residuos agroindustriales utilizados.

### *Determinación de los parámetros significativos mediante un diseño factorial 24 con puntos centrales*

Los diseños factoriales 2k son adecuados para estimar las respuestas medias para el modelo lineal, además de ser el procedimiento recomendado para calcular el error experimental y ofrecer un mecanismo para evaluar si el modelo lineal de superficie de respuesta es apropiado y determinar el grado de curvatura de la

región experimental (Kuehl, 2001). En este caso, el diseño factorial 24 con puntos centrales, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2, determinó que los factores más significativos en la producción de endopoligalacturonas eran X2 = pH inicial y X4 = agitación, de acuerdo con el Análisis de Varianza correspondiente. Mediante el uso de la regresión lineal se obtuvo el siguiente modelo matemático:

$$y=6.85-2.29X_2+1.97X_4+1X_3+2.69X_1X_4\dots\dots\dots(1)$$

Este modelo muestra que conforme se incrementa el valor del pH inicial (X2), la producción de endopoligalacturonas disminuye; mientras que la velocidad de agitación (X4) tiene un efecto positivo sobre la respuesta.

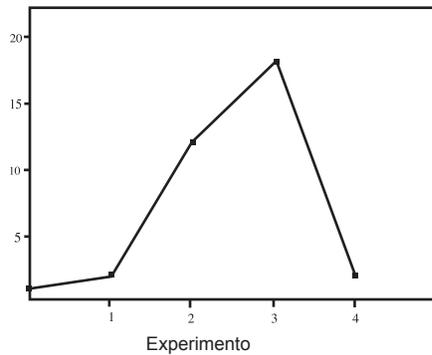
Experimento	Temperatura de incubación X1	pH inicial X2	Fuente de carbono X3	Velocidad de agitación X4	Endopoligalacturonas (U/ml)
1	-1	-1	-1	-1	14.55 ± 1.238
2	1	-1	-1	-1	5.67 ± 0.303
3	-1	1	-1	-1	4.34 ± 0.043
4	1	1	-1	-1	3.46 ± 1.5421
5	-1	-1	1	-1	1.82 ± 0.037
6	1	-1	1	-1	5.13 ± 0.236
7	-1	1	1	-1	1.79 ± 0.232
8	1	1	1	-1	2.30 ± 0.134
9	-1	-1	-1	1	4.09 ± 0.671
10	1	-1	-1	1	5.43 ± 0.164
11	-1	1	-1	1	10.21 ± 1.324
12	1	1	-1	1	2.46 ± 0.301
13	-1	-1	1	1	16.89 ± 0.205
14	1	-1	1	1	19.33 ± 2.337
15	-1	1	1	1	6.21 ± 0.6
16	1	1	1	1	5.72 ± 0.9
17	0	0	0	0	1.55 ± 0.1
18	0	0	0	0	1.22 ± 0.01
19	0	0	0	0	0.92 ± 0.1
20	0	0	0	0	1.30 ± 0.05

**Tabla 2.** Resultados obtenidos del diseño factorial 24 con puntos centrales.

### *Desarrollo de la metodología de paso ascendente*

La metodología de paso ascendente permitió acercarse rápidamente a la región donde la superficie mostraba curvaturas. Para su desarrollo, se partió del modelo

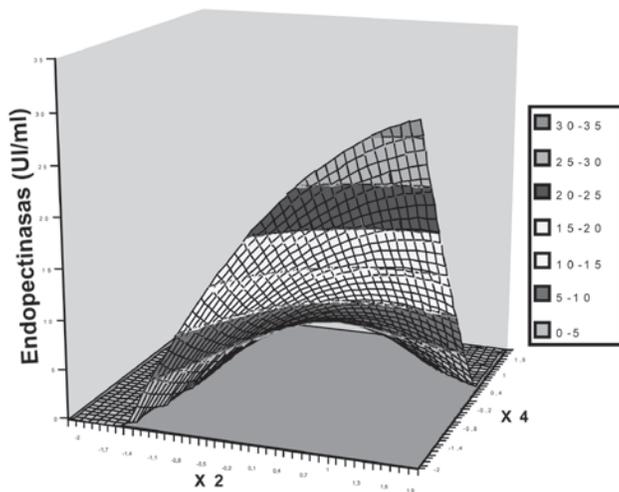
matemático obtenido en la etapa experimental anterior (Ecuación 1). Con este experimento, se obtuvo el punto de partida del diseño compuesto central, correspondiente al experimento número 3, donde el valor del pH inicial (X2) era igual a 2.67 y la velocidad de agitación (X4) era de 250 rpm. En este experimento fue donde se obtuvo la respuesta máxima (~18 U/ml), como se puede apreciar en la Gráfica 1.



**Gráfica 1.** Resultados de la metodología de paso ascendente.

### *Diseño compuesto central*

El punto máximo de la etapa anterior fue el centro del diseño compuesto central, que daría la pauta para trazar la superficie de respuesta (Gráfica 2) con base en los parámetros más significativos sobre la producción. El modelo cuadrático ( $r^2=0.8564$ ) obtenido con este último experimento, determinó una alta significancia del pH, así como de la interacción de éste con la agitación del sistema. Además, este nuevo modelo mostró un efecto positivo del pH sobre la respuesta dentro de esa región de exploración. De esta manera, el análisis canónico del modelo señaló que existe un máximo de producción (~ 30 - 35 UI/ml) cuando el pH del medio (X2) es igual a 5, y la agitación del sistema (X4) es de 150 rpm.



**Figura 2.** Superficie de respuesta obtenida del Diseño Compuesto Central.

Un experimento preliminar en el que se utilizaron estos valores, generó un extracto enzimático con  $22 \pm 2$  UI/ml de endopoligalacturonasas. Se probó la estabilidad de este extracto al fue sometido a distintas temperaturas (30-70°C) y pH (3-7) durante 30 min, luego de los cuales se probó su actividad mediante la técnica antes descrita. Con ello fue posible observar que existe cierta estabilidad en un rango de temperaturas de entre 25 y 50°C, y que el pH en el que mantiene estable su actividad fue tres.

## Conclusiones

El diseño factorial 24 con puntos centrales determinó que los parámetros más significativos en la producción de endopoligalacturonasas por *A. flavipes* FP-500 al crecer sobre cáscara de limón fueron el pH inicial del medio y la velocidad de agitación. Mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta fue posible obtener un modelo matemático que describió de manera adecuada la producción de endopoligalacturonasas en cierto rango de pH y velocidad de agitación del medio. Lo anterior además permitió incrementar considerablemente la producción de esta enzima, lo cual ofrece ventajas si se desea producir un extracto enzimático con adecuada actividad para ser explotada a nivel industrial.

## Agradecimientos

Deseamos agradecer a las alumnas Maribel Hernández Moctezuma y Beatriz Espinosa Ahedo, quienes participaron entusiastamente en este proyecto durante la realización de sus Residencias Profesionales. Asimismo, agradecemos el apoyo económico de la DGAPA de la Universidad Nacional Autónoma de México, Proyecto IN207603.

## Referencias...

1. De Vries R. y Visser, J. 2001. "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65:4, 497-522.
2. Kuehl, R.O. 2001. *Diseño de experimentos*. Ed. Thomson Learning, 2a edición.
3. Montgomery, D.C. 2001. *Design y Analysis of Experiments*. Ed. John Wiley and Sons, 5ª edición.
4. Sathyanarayana, N.G. y Panda, T. 2003. "Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review". *Process Biochemistry*, 38:987-996.
5. Stratilova, E., Breierova, E. y Vadkertiova, R. 1995: "Factors influencing the production of multiple forms of polygalacturonase from the yeast *Candida biodinni* and *Aspergillus niger*". *Folia Microb*, 40: 565.
6. Teixeira, M.F.S., Lima-Filho J.L. y Durán, N. 2000. "Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586". *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:286-290.
7. Trejo-Aguilar, B., Visser, J. and Aguilar-Osorio, G. 1996. "Pectinase secretion by *Aspergillus* FP-180 and *Aspergillus niger* N402 growing under stress induced by the pH of culture medium". *Proceedings of pectin and pectinases symposium*, Ed. Jap Visser, 915-920.