

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD PECTINOLITICA A PARTIR DE *Mangifera indica*

Miguel Feoli*, Zuly Gómez* y Amalia Muñoz*

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A.A. 14490.

RESUMEN

Mediante el método de agar en placa y de la medida del cambio de viscosidad de un sustrato líquido con pectina N F y con pectina obtenida de *Mangifera indica* respectivamente, usadas como única fuente de carbono, demostraron tener actividad pectinolítica los siguientes microorganismos : *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus lincheniformis*, *Cándida krussei*, *Cándida sorboxilosa*, *Cándida insectorum*, *Aureobasidium pullulans* variedad *pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Microsporum sp.*.

Palabras Claves: *Mangifera indica*, Actividad pectinolítica, Mango, microorganismos pectinolíticos.

SUMMARY

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS WITH PECTINOLITIC ACTIVITY FOUND IN *Mangifera Indica* (MANGO FRUIT).

Using the agar plate method and the changes in the viscosity of a liquid substrate based on pectin N.F. compared to the activity on the same liquid prepared with pectin from *Mangifera indica* used as the unique carbon source, the pectinolytic activity of following microorganism was observed: *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus lincheniformis*, *Candida krussei*, *Candida sorboxilosa*, *Candida insectorum*, *Aureobasidium pullulans* variedad *pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Microsporum sp.*.

Key word: *Mangifera indica*, pectinolytic activity, Mango fruit, pectinolytic microorganisms.

INTRODUCCION

El mango (*Mangifera indica*) es considerado como uno de los mejores y más apreciados frutos del mercado

Recibio para su publicación: 8 de agosto de 1997

Aprobada su publicación: 4 de septiembre de 1997

nacional e internacional, debido a su excelente sabor, atractiva fragancia, bello color, delicioso gusto y alto valor nutricional (1).

A partir de procesos industriales se generan desechos tales como semillas y cortezas, las semillas pueden ser aprovechadas para la obtención de concentrados y de forraje para ganado y en el caso de las cortezas, para la extracción de pectinas de muy buena calidad (2, 3, 4).

Las pectinas se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en cortezas como en pulpas de frutas. Comercialmente la pectina se extrae a partir de limones y se obtiene como subproducto de la industria de frutas cítricas y del bagazo de manzana (5).

Químicamente las pectinas son polisacáridos constituidos por cadenas largas de unidades de ácido D-galacturónico unidos entre si por enlaces α -1-4, cadenas que forman el ácido poligalacturónico o ácido pectínico en los cuales de un 80 a un 95 % de los grupos carboxilo (-COOH) están esterificados con alcohol metílico y los hidroxilos secundarios pueden estar acetilados (6, 7, 8).

Los ácidos poligalacturónicos prácticamente libres de grupos metilo, con un grado de esterificación hasta del 5 % se conocen como ácidos pectínicos, dentro de estos se encuentran una gran variedad dependiendo del grado de neutralización y contenido de metoxilo:

- A los ácidos pectínicos de bajo contenido de metoxilo hasta un 7 %, se les llama pectinas de bajo metoxilo.

A los ácidos pectínicos de contenido de metoxilo superior a un 7 %, se les llama pectinas de alto metoxilo.

Las enzimas que atacan a las sustancias pectínicas son:

Poligalacturonasa (PG), polimetilgalacturonasa (PMG), pectinesterasa (PE), pectintranseliminasa (PTE), Ácido poligalacturónico transeliminasa (APTE).

Las pectinonas se utilizan principalmente para clarificar los jugos de frutas y el mosto de uvas, para la maceración de vegetales, de frutas y para la extracción del aceite de oliva. Por el tratamiento con pectinonas (1-2 horas a 54°C ó 6-8 horas a 18°C), aumenta considerablemente el rendimiento del jugo de las fruta durante el prensado; por lo tanto, el tratamiento con pectinonas reduce la

viscosidad del zumo y permite la obtención de un producto más concentrado y estable.

Los métodos más usados para medir o detectar la actividad pectinolítica son el Método en Agar Placa y el Método del Cambio de Viscosidad del Sustrato (9, 10, 11).

Teniendo en cuenta que el empleo de las pectinas resulta muy costoso, se propone en el presente trabajo:

- Aislamiento y caracterizar microbiológicamente los microorganismos presentes en el mango (*Mangifera indica*)
- Evaluar la actividad pectinolítica de las cepas obtenidas.

PARTE EXPERIMENTAL

Para la ejecución del presente trabajo se establecen 3 etapas en el desarrollo experimental, así:

Primera parte: Aislamiento de los microorganismos presentes en las muestras de mango.

Se escogen frutos de mango provenientes de desechos industriales los cuales habían sido sometidos a un tratamiento previo de lavado, siendo descartados por no cumplir con los requerimientos en cuanto a madurez industrial, aspecto físico, etc. Las muestras fueron tomadas asépticamente y colocadas en recipientes previamente esterilizados; las muestras constaban parte de pulpa y parte de corteza.

Se mezclan en una licuadora hasta completa homogeneización 11 g de la muestra con 99 ml de solución salina peptonada (NaCl al 1.8% - Peptona al 0.2%). Dilución 10^{-1} . Se realizan diluciones sucesivas en solución salina peptonada perfectamente homogenizadas hasta obtener la sexta dilución (11, 12, 13). Dicho proceso se lleva a cabo por duplicado. En sendas cajas de Petri estériles, con agar Sabouraud y con agar Nutritivo, se siembran por duplicado, alícuotas de 0.1 ml de las diluciones: $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ y 10^{-6} . Inmediatamente se esparce el inóculo con asas de vidrio estériles (11, 14, 15). Se incuba por períodos de 48 horas a 22°C y de 24 h a 37 °C respectivamente.

Para la obtención de cultivos puros se selecciona la siembra de la dilución donde macroscópicamente se diferencian los diversos microorganismos.

Segunda parte: Detección de actividad pectinolítica.

Método I (método en agar-placa)

Con las bacterias y levaduras, aisladas se hacen relictos por duplicado de cada una de ellas en los siguientes medios de cultivo: Medio mínimo; Agar-agar al 1%;

pectina NF al 2%, Medio mínimo modificado; Medio mínimo-Extracto de levadura; Medio mínimo-Extracto de levadura modificado (11, 14).

Las cepas puras de los hongos se siembran por duplicado en los siguientes medios de cultivo:

Medio Czapek; Agar - agar al 1% - Pectina NF al 2%; Medio Czapek modificado (11, 14). Los medios que no contienen pectina se esterilizan a 121°C, se vierten en cajas de Petri previamente esterilizadas, se dejan solidificar y se realiza el control de esterilidad.

Los medios de cultivo que llevan en su preparación pectina, tanto comercial NF, como de mango, se preparan y se esterilizan sin la pectina, dejando aparte una porción de agua esterilizada previamente, para luego disolver en ella la pectina, sin exceder 60°C de temperatura. Una vez disuelta la pectina se esteriliza por filtración y se mezcla asepticamente con la otra parte del medio; rápidamente se vierten en las cajas de Petri, se deja solidificar y se hace el control de esterilidad durante 24 horas (11).

La siembra de las bacterias y las levaduras se realiza en forma de estría y los hongos por picadura. Los cultivos bacterianos se incuban por períodos de 24 a 48 horas a 37°C y los hongos a 30°C de 5 a 7 días.

Se seleccionan las cepas que presentan crecimiento en medio con pectina, teniendo en cuenta la presencia de halos de transparencia o aclaramiento en el medio circundante a la colonia del microorganismo (9, 11).

Método II (Medida del cambio de viscosidad del sustrato en medio líquido). Este ensayo se realiza con los microorganismos que presentan actividad pectinolítica por el método I.

Se inoculan por duplicado cada una de las bacterias y de las levaduras, en tubos tapa rosca que contienen 10 ml de solución salina peptonada estéril, se incuban a 37°C y 22°C respectivamente durante 24 horas. Se realizarán diluciones adecuadas del cultivo anterior, hasta obtener 10 ml. de una dilución de absorbancia igual a 1, la cual se lee en un espectrofotómetro (spectronic 20, Bausch & Lomb), a una longitud de onda de 600 nm a temperatura ambiente, 18°C (11).

En recipientes independientes adecuados se colocan 200 ml de los siguientes medios de cultivo: Medio mínimo al 1% (sin agar-agar) con Pectina NF al 2% para las bacterias y en Medio mínimo - Extracto de levadura al 1% (sin agar-agar) con Pectina NF al 2% para las levaduras. Se inoculan 10 ml de la dilución de Absorbancia igual a 1. Se colocaron los recipientes en incubación con agitación constante, durante un período de

una semana a una temperatura 37°C. Los blancos del medio sin inóculo se mantienen bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación (10,11).

La preparación de la suspensión de esporas y la siembra de los hongos se realiza en botellas de Roux, gracias a que presentan gran superficie, lo que permite un abundante crecimiento y esporulación. En el medio agar Czapek se reemplazó la sacarosa por Pectina NF al 2%. La incubación se hace a una temperatura de 22°C por un período de 6-7 días. Las esporas se recogen con perlas de vidrio estériles en 5 ml de una solución estéril de Asparagina al 0.1% - Glicerol al 3%, se llevan a tubos tapa rosca estériles y se incuban a 22°C durante una semana.

Luego se adicionan 20 ml. de una solución estéril de Laurilsulfato de sodio y 100 ml de agua destilada esterilizada. La suspensión obtenida se pasa a través de un filtro estéril de lana de vidrio - algodón. La concentración final se determinó por conteo en Cámara de Neubauer, hasta recuento de 10^7 esporas/ml. Se incuba a 22°C durante 5 días (11).

En cada recipiente se colocan 200 ml. de medio Czapek al 1%. El medio se preparó sin agar - agar y se reemplazó la sacarosa por Pectina NF al 2%. Luego se procedió a inocular, por triplicado 10 ml. de la suspensión de esporas de concentración 10^7 esporas /ml de cada hongo. Se Incuba a 22°C durante una semana con agitación constante.

Empleando un viscosímetro Brookfield (Synchro-electric, model RTV; Stoughton MA, USA), se determina la viscosidad de la suspensión de pectina antes de inocular los microorganismos, utilizando los blancos correspondientes. Luego se mide el cambio en la viscosidad a los cinco días de incubación; dicha medición se realiza con el vástago No. 3 a una velocidad de 50 rpm.

Tercera parte: Caracterización de los microorganismos que presentan actividad pectinolítica.

- **Caracterización de Bacterias y Levaduras:** Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas del crecimiento microbiano , se realizaron pruebas fisiológicas a las cepas aisladas y con la participación del Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes, CIMIC, se estableció la identidad de los microorganismos. (11, 16, 17).

- **Caracterización de los hongos:** Se evalúan las características macroscópicas y microscópicas, se confrontan los microcultivos con claves morfológicas y Atlas de Micología. La caracterización molecular previa se realizó en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, mediante la extracción de proteínas totales y posterior separación de ellas por electroforesis en gel de poliacrilamida (11, 18, 19, 20) tanto a cepas de identidad conocida como a las cepas aisladas del mango para su posterior comparación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Primera parte

Una vez aisladas y purificadas las colonias, al realizar la evaluación macroscópica y microscópica, se obtuvo como resultado los microorganismos indicados en la Tabla No.1. Confirmando así que el mango es un buen hospedero para una gran cantidad de microorganismos debido probablemente a su alto contenido de nutrientes.

Tabla 1. Microorganismos Aislados del mango

TIPO DE M.O	CANT.	MICROORGANISMOS	% PARC.	% TOTAL
Bacterias	4	Bacilos Gram (+)	7.65	
	6	Bacilos Gram (-)	11.32	
	3	Bacilos esporulados Gram (+)	5.66	
	3	Cocos Gram (+)	5.66	
	3	Cocos Gram (-)	5.66	
	4	Cocos Bacilos Gram (+)	7.55	
Levadura	5	Cocos Bacilos Gram (-)	9.44	52.84
	7	Levaduras	13.20	13.20
Hongos	18	Hongos	33.96	33.96
TOTAL	53	.		100.00

Segunda parte

Método I. Al realizar el cultivo con los diferentes microorganismos aislados en los medios mínimos específico para bacterias, hongos, o levaduras se presentó el crecimiento de la totalidad de estos, mientras que en los medios modificados en donde se reemplazó la glucosa por la pectina NF se presenta selectividad dado que crecen solo 2 bacterias, 4 levaduras, 8 hongos, presentando algunos halos de transparencia y otros una mínima clasificación del medio circundante, lo que constituye un

primer indicio de la secreción de enzimas pecticas en el medio de cultivo.

Método II. Los valores que se presentan en la Tabla No.2 ilustran los cambios en la viscosidad de los medios de cultivo como resultado del crecimiento de los microorganismos.

Con éste método se confirman los resultados encontrados con el método de agar placa, es decir, que los microorganismos que fueron capaces de crecer en la superficie de los medios de cultivo modificados (10) y provocar la aparición de zonas translúcidas son los mismos microorganismos que degradan la pectina disminuyendo la viscosidad del medio líquido en el cual se inoculan, encontrándose porcentajes altos de disminución de la viscosidad, como se observa en la Tabla No.2. En el caso de la levadura 7, presentó un 97.22 % de disminución en el valor de la viscosidad, seguido por la levadura 5 con 88.89 % y la bacteria 1 con 63.53 %.

Cabe anotar que la bacteria 3 y la levadura 4 actúan como blancos negativos, puesto que no presentaron en el método I ni en el Método II acción pectinolítica, lo cual confirma la validez de los ensayos realizados (8).

Igualmente para todos los hongos el resultado de la hidrólisis enzimática obtenida en el Método I fue confirmada a través del método viscosimétrico (Método II), donde se encuentran porcentajes altos en la disminución de la viscosidad siendo indicativo de actividad pectinolítica. Es de resaltar que los hongos identificados como 9 y 10 respectivamente no presentaron actividad pectinolítica en los Método I y II, confirmándose así la validez de los ensayos realizados ya que estos no presentan crecimiento en placa, ni cambios significativos en la viscosidad del medio líquido que contenía pectina como sustrato.

Los porcentajes de disminución de la viscosidad se calculan mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{V_b - V_m}{V_m} \times 100 = \% \text{ de disminución de la viscosidad}$$

donde: Vb es la viscosidad del blanco; Vm es la viscosidad de la muestra final del ensayo

En general, si estos microorganismos se encuentran en un sustrato específico son capaces de producir la ruptura de la pectina o degradación de la misma, debido a que pueden secretar enzimas pecticas de algún tipo ya sea endógenas o exógenas, las cuales producen cambios en la viscosidad del medio. La capacidad de las cepas aisladas en el presente trabajo puede ser aprovechada en la industria alimenticia para obtener zumos de frutos

Tabla 2. Variación de la viscosidad del medio

TIPO DE M.O	M.O No.	VISC. PROM.	PH	% DISMIN. VISCOSIDAD
BACTERIAS	1	131.3	4.0	63.53
	2	206.0	4.0	42.78
	3	356.6	4.3	0.94
LEVADURA	4	333.3	4.0	7.42
	5	40.0	3.5	88.89
	6	210	4.2	41.67
	7	10.0	4.0	97.22
	8	256.7	3.9	28.69
HONGOS	1	146.6	3.0	59.82
	2	163.3	4.0	54.64
	3	5.0	2.5	98.61
	4	25.0	3.5	93.05
	5	170.0	5.5	52.78
	6	95.0	5.5	73.62
	7	5.0	3.0	98.33
	8	53.0	3.5	85.28
	9	340.0	4.0	5.55

clarificados, en la industria vinícola para la clarificación del mosto y en otros usos afines.

Al hacer comparación entre los dos métodos, agar en placa y viscosimétrico en la detección de actividad pectinolítica, se puede establecer que con ambos se obtienen resultados positivos; sin embargo, el Método I presenta alguna dificultad en la visualización de las zonas translúcidas en la superficie del medio, esto quizás por la opalescencia característica de la pectina en el mismo. El Método viscosimétrico es un indicativo más sensible y selectivo de la acción pectinolítica de algunos microorganismos, siendo un factor primordial para que las reacciones se puedan lograr, la agitación durante el procedimiento. En el presente estudio con base en la experiencia obtenida en el desarrollo de la detección de actividad pectinolítica, la determinación que se pudo hacer es a un nivel cualitativo siendo un punto de partida para avanzar en la investigación, y extracción de enzimas pectinolíticas pasando a un plano cuantitativo (11).

Tercera parte:

Los microorganismos que presentaron actividad pectinolítica con base en el análisis microscópico, macroscópico, características tintoriales, comportamiento bioquímico, fueron:

Bacterias: Cepa 1 (Cocos): *Enterobacter agglomerans*; Cepa 2 (Bacilo esporulado): *Bacillus lincheniformis*

mis Levaduras: Cepa 4: *Candida krussei*; Cepa 6: *Candida sorboxilosa*; Cepa 7: *Aureobasidium pullulans* variedad *pullulans**; Cepa 8: *Candida insectorum*

* La especie identificada, finalmente resultó ser un hongo micelial.

Mediante la comparación de las estructuras obtenidas en los microcultivos con los Atlas Micológicos y por los resultados obtenidos en la separación electroforética de proteínas de los hongos aislados y de cepas patrón realizado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, se caracterizaron los siguientes géneros de hongos:

Cepa 1: *Aspergillus sp*; Cepa 2: *Penicillium sp*; Cepa 3: *Microsporum sp*; Cepa 4: *Mucor sp*; Cepa 5: *Penicillium sp*; Cepa 6: *Microsporum sp*; Cepa 7: *Aspergillus niger*; Cepa 8: *Penicillium s.p.*

Agradecimientos:

Al Programa Multinacional de Biotecnología y de Alimentos de la OEA-COLCIENCIAS, por el apoyo técnico y la financiación otorgada para la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. M .A. Marin, P. Cano, *Journal of Food Science* **57** (3), 690 - 692 (1962).
2. M. Ferro, Tesis Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.(1968).
3. G. Rodríguez, *Applied And Environmental Microbiology*. **35** (1), 210-213 (1995).
4. M. Rosental, G. Anaya, Tesis Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, (1976).
5. C. Batisse, B. Fils-Lycaon, M. Buret, *Journal Food Science*. **59** (2), 389 - 393 (1994).
6. L.E. Gaviria, I. Bernal, Análisis de Alimentos. Guías de Laboratorio. Universidad Nacional de Colombia. Vol. I y II (1983).
7. Tokuo, Sakamoto, Hallaert, Vandamme. Advances in Applied Microbiology, **39**, 213 - 235 (1993).
8. P. Martínez, Tesis de Magister Scientiae. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (1988) .
9. D.H. Hubbell , V.M. Morales, M. Umali-García, *Applied and Environmental Microbiology*, **35**(1) , 210-213, (1988).
10. R. Tuttobello, P.J. Mill, *The Biochemical Journal*, **79**, 51 - 64, (1961) .
11. Z. Gómez, A. Muñoz, Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, (1996).
12. Banwart, Basic food microbiology. Avipublishing company Inc. Westport, Connecticut, 84 -89 y 412 -459, (1981) .
13. G. Luna, Manual Operativo de Análisis de Alimentos. Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santafé de Bogotá, (1991).
14. D. T. Brock, M. T. Madigan, Laboratory Manual. Biology of microorganism. Six th Edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 205 - 208, (1991).
15. DIFCO. Manual de Bacteriología, Recopilación de Técnicas, (1978).
16. B. M. Mitruka, Methods of detection and identification of bacteria CRC press inc.. Third printing, Boca Ratón, Florida, (1979).
17. N. Krieg, J.G. Holt Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore/London. Vol. I y II, (1984).
18. Greenberg and Glick, Plant Molecular Biology and Biotechnology. CRC press Boca Ratón, Florida, (1993)
19. Hamesa nd Rickwood, Gel Electrophoresis of proteins a practical approach IRL press, Printing in England. Secon Reprinting, (1993).
20. BIO-RAD, Protean II X i 2 - D Multi - Cell, Instruction Manual. Catalog Numbers 165 - 1955, Richmond, USA. (1992).