

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CBS



**“COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LAS
ENZIMAS EXOPECTINASAS DE *Aspergillus niger*
OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN SÓLIDA Y
SUMERGIDA”**

TESIS

**Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
P R E S E N T A**

M. en B. Gerardo Díaz Godínez



**COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA**

Abril, 2001

225700

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio PFP-20-93”

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades de Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que lleva por título “Comparación de la Producción de las Enzimas Exopectinasas de *Aspergillus niger* obtenidas por Fermentación Sólida y Sumergida” que presentó:

M. en B. Gerardo Díaz Godínez

El día 26 de abril del año 2001

Comité tutorial:

Tutor: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra Gonzalez

Asesor : Dr. Christopher Augur

Sinodal: Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Sinodal: Dr. Octavio Loera Corral

I. DEDICATORIAS.

- A mi esposa Diana que con su amor, apoyo y comprensión me ha dado fuerzas y ánimo para seguir superándome.

- A mis hijos Gerardo y Diana que son el motivo e inspiración de mi superación profesional.

- A mis padres Daniel y Sonia por el apoyo y cariño que siempre me han brindado, y que además han sido un ejemplo de superación personal.

- A mi hermano Rubén, porque su desempeño profesional ha sido un ejemplo para mí.

- A mis hermanos Lilia, Mario y Montserrat por su cariño y apoyo que me han dado en mi vida personal.

- A mis primos Leonel y Marco Antonio por su apoyo y amistad.

- A los investigadores que fueron parte importante y determinante en mi formación profesional: Dr. Jorge Soriano Santos, Dr. Gustavo Viniegra González, Dr. Christopher Augur y Dra. María del Carmen Sánchez Hernández.

II. AGRADECIMIENTOS.

- Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación.

- Al Dr. Jorge Soriano Santos porque él me inició en el camino de la investigación, y me brindó asesoría, consejos y apoyo a lo largo de mi servicio social, de mi maestría y de mi doctorado.

- Al Dr. Gustavo Viniegra González por su asesoría y apoyo, las cuales fueron de gran importancia para que este trabajo se concluyera satisfactoriamente.

- A la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández por su apoyo incondicional que siempre he recibido, además por la confianza profesional que depositó en mí desde el momento en que empecé a colaborar con ella.

- A los miembros del jurado evaluador de esta tesis: Dr. Gustavo Viniegra González, Dr. Jorge Soriano Santos, Dr. Christopher Augur, Dra. María del Carmen Sánchez Hernández y Dr. Octavio Loera Corral.

- A la Dra. Ana María Rosales Torres y a la Lic. Violeta Luna por todo el apoyo que me dieron en los trámites administrativos.

III. ABREVIATURAS USADAS.

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
AEP	Actividad específica exopectinasa
AVP	Actividad volumétrica exopectinasa
Aw	Actividad de agua
°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitro-salicílico
E	Enzima
ECE	Extracto crudo enzimático
EG	Etilenglicol
EP	Exopectinasas
FML	Fermentación sumergida o fermentación en medio líquido
FMS	Fermentación en medio sólido
g	Gramos
h	Horas
Kg	Kilogramos
KDa	10 ³ daltones
K _{La}	Constante de transferencia del oxígeno en el agua
K _m	Constante de Michaelis-Menten
L	Litros
m	Metros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
McS	Medio con sacarosa
MsS	Medio sin sacarosa
nm	Nanometros

PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
pK	-log de la constante de disociación
P.M.	Peso molecular
PR _O	Productividad observada
PR _T	Productividad teórica
PUF	Espuma de poliuretano
PVP	Polivinilpirrolidona
P/S	Relación pectina-sacarosa
q _p	Tasa específica de formación de producto
q _s	Tasa de utilización de sustrato
R ²	Coefficiente de correlación
R _f	Movilidad relativa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SmF	Submerged fermentation
SSF	Solid-state fermentation
UI	Unidades enzimáticas internacionales
V	Voltios
X	Biomasa
X _{max}	Biomasa máxima
Y _{E/X}	Rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa
Y _{X/S}	Rendimiento de la biomasa con respecto del sustrato
μ	Velocidad específica de crecimiento
μm	micras
μL	Microlitros

IV. RESUMEN.

Se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* C28B25 para producir exopectinasas (EP) por fermentación sólida (FMS) sobre espuma de poliuretano (PUF) y por fermentación sumergida (FML). Se evaluaron dos medios de cultivo (con y sin sacarosa) y dos actividades de agua ($A_w = 0.995$ y 0.96 ajustada con etilenglicol); el pH y temperatura inicial de todas las fermentaciones fueron de 4.5 y 35 °C respectivamente. Se obtuvieron las curvas de crecimiento, de actividad de EP y de proteasas, del perfil de pH y de azúcares residuales. Se realizaron isoelectroenfoces y zimogramas de los extractos con mayor actividad EP. Se corroboró que la FMS no presenta represión catabólica en la síntesis de EP. Se observó que la sacarosa, incrementa la biomasa máxima y la productividad de las EP en la FMS, así como, disminuye la producción de proteasas en ambos sistemas de fermentación. En ausencia de sacarosa y elevada A_w , no se presentaron diferencias significativas de biomasa entre la FMS y la FML, pero la producción de EP fue favorecida en la FML. Se concluye que la FMS es más productiva de exopectinasas que la FML, solo en presencia de elevados niveles de azúcares, pues la alta productividad de las EP en FMS se debe a una mayor producción de biomasa y no a un mayor rendimiento de enzima por unidad de biomasa. La depresión de la A_w tiene un efecto inhibitorio del crecimiento del hongo, pero no de la síntesis de EP. No se encontraron diferencias zimográficas de las pectinasas, asociadas a la composición del medio de cultivo, a la A_w o al sistema de producción (i.e. FMS ó FML). En los isoelectroenfoces se observaron al menos dos picos de actividad EP, el más pequeño con $pI = 3.1$ y el segundo a $pI = 5.7$. La FMS sobre PUF es un sistema para el estudio de la producción de enzimas.

V. ABSTRACT.

Exopectinases (EPs) production by *Aspergillus niger* (C28B25) was studied on both solid-state (SSF), which was carried out on polyurethane foam (PUF), and submerged fermentation (SmF). Two different synthetic media (with and without sucrose) and two different water activities (A_w ; 0.995 and = 0.96, which were adjusted by using ethylene glycol) on each fermentation were evaluated. In all fermentations the initial conditions of pH and temperature were 4.5 and 35°C respectively. Rate of growth, kinetics of the EPs production, as well as proteases excretion profiles, pH's and substrate consumption were determined. Isoelectrofocusing and zymograms were obtained from extracts with maximal EPs activity. It was concluded that SSF did not show carbon catabolite repression (CCR) in the presence of high levels of sugar. SSF in presence of sucrose showed higher productivities, resulted in higher maximal biomass and lower levels of proteases than SmF. No differences of maximal biomass were observed between SSF and SmF with sucrose and high A_w . However, EPs production was higher in FML. It may be concluded that SSF was more productive of EPs only in presence of high levels of sucrose and high A_w . SSF did not show CCR. At high sucrose levels, biomass production and the productivity of EPs were higher than those obtained in SmF. The high levels of EPs in SSF did not depend on the yield of enzyme per biomass unit, depended on high levels of biomass produced without CCR. The depression of A_w had a negative effect on growth but not on EPs production. There were no observed differences concerning EPs in the zymograms from any of the extracts tested. The isoelectrofocusing showed variability in the extracts obtained by both fermentation systems with $A_w = 0.96$.

ÍNDICE GENERAL.

<u>I. DEDICATORIAS.</u>	3
<u>II. AGRADECIMIENTOS.</u>	4
<u>III. ABREVIATURAS USADAS.</u>	5
<u>IV. RESUMEN.</u>	7
<u>V. ABSTRACT.</u>	8
<u>1. INTRODUCCIÓN.</u>	14
<u>2. GENERALIDADES.</u>	17
<u>2.1. GÉNERO <i>ASPERGILLUS</i>.</u>	17
<u>2.2. SUSTANCIAS PÉCTICAS.</u>	20
<u>2.2.1. Propiedades y aplicaciones de las pectinas.</u>	21
<u>2.3. ENZIMAS PECTINASAS.</u>	23
<u>2.3.1. Pectinesterasas.</u>	25
<u>2.3.2. Pectinasas hidrolíticas.</u>	26
<u>2.3.3. Pectato y pectin liasas.</u>	27
<u>2.4. UTILIDAD DE LAS PECTINASAS.</u>	28
<u>2.5. PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.</u>	31
<u>2.6. FERMENTACIÓN.</u>	33
<u>2.7. BIOSÍNTESIS DE PECTINASAS.</u>	36
<u>2.8. ENZIMAS PROTEASAS.</u>	39
<u>2.8.1. Detección de actividad proteolítica.</u>	42
<u>2.8.2. Inhibición de proteasas.</u>	43
<u>2.9. ESPUMA DE POLIURETANO.</u>	44
<u>2.9.1. Química de las espumas de uretano.</u>	45
<u>2.9.2. Propiedades y aplicaciones de las espumas.</u>	46
<u>3. ANTECEDENTES.</u>	47
<u>4. HIPÓTESIS.</u>	56
<u>5. JUSTIFICACIÓN.</u>	57
<u>6. OBJETIVOS.</u>	60
<u>6.1. OBJETIVO GENERAL.</u>	60
<u>6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.</u>	60

7. METODOLOGÍA.....	61
7.1. MICROORGANISMO.....	61
7.2. CONDICIONES DE CULTIVO.....	61
7.2.1. Medios de cultivo.....	61
7.2.2. Fermentación sumergida.....	62
7.2.3. Fermentación sólida.....	63
7.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS ENZIMÁTICOS Y DE LA BIOMASA.....	63
7.4. CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA EXCRETADA.....	64
7.5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXOPECTINASA.....	64
7.6. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS EXTRACELULARES.....	65
7.7. AZÚCARES RESIDUALES.....	65
7.8. ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.....	65
7.9. ISOELECTROENFOQUE.....	67
7.10. ZIMOGRAMAS PARA LA DETECCIÓN <i>IN SITU</i> DE LA ACTIVIDAD DE PECTINASAS.....	67
7.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	68
8. RESULTADOS.....	69
8.1. EVALUACIÓN DE DEPRESORES DE ACTIVIDAD DE AGUA.....	69
8.2. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE EXOPECTINASAS.....	71
8.2.1. Fermentaciones preliminares.....	71
8.2.2. Biomasa.....	72
8.2.3. Consumo de sustrato.....	76
8.2.4. Actividad exopectinasa.....	79
8.2.5. Proteína excretada.....	82
8.2.6. Actividad específica de las exopectinasas.....	82
8.2.7. Rendimientos y productividad de las exopectinasas.....	86
8.2.8. Perfil de proteasas.....	94
8.2.9. Perfiles de pH.....	96
8.2.10. Isoelectroenfoco.....	98
8.2.11. Zimografía.....	101
9. DISCUSIÓN.....	106
10. CONCLUSIONES.....	115
11. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	117
12. BIBLIOGRAFÍA.....	118
13. ANEXO 1. Copia de la publicación derivada de la tesis.....	132

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Diagrama de la estructura de un <i>Aspergillus</i> .	19
Figura 2. Estructura de las sustancias pécticas.	21
Figura 3. Diagrama de la acción de las pectinesterasas.	25
Figura 4. Diagrama de la acción de las poligalacturonasas.	26
Figura 5. Diagrama de acción de las pectato y pectin liasas.	27
Figura 6. Evaluación del efecto de la concentración de tres compuestos sobre la A_w en el medio para FMS sobre PUF. Polivinilpirrolidona (◆), Polietilenglicol (■), Etilenglicol (▲).	70
Figura 7. Evaluación del efecto de la concentración de etilenglicol sobre la A_w en el medio de la FML.	70
Figura 8. Curvas de crecimiento de <i>A. niger</i> por FMS sobre PUF a dos diferentes A_w . 0.98 (◇), 0.96 (□).	72
Figura 9. Curvas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> C28B25 con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.	73
Figura 10. Curvas de consumo de sustrato por <i>Aspergillus niger</i> con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.	77
Figura 11. Actividad exopectinasa de <i>Aspergillus niger</i> C28B25 obtenida con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.	81
Figura 12. Perfiles de proteína excretada de <i>Aspergillus niger</i> C28B25 obtenida con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.	83
Figura 13. Actividad específica exopectinasa excretada de <i>Aspergillus niger</i> C28B25 obtenida con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.	85

- Figura 14.** Esquema de un pellet, en el cual se muestra el radio total (R), el radio con deficiencia de oxígeno (r), y el radio crítico o con suficiente oxígeno (Rc)..... 88
- Figura 15.** Gradientes hipotéticos de concentración para el oxígeno (●) y para la sacarosa (■), dentro de un pellet (a) y a través de una capa de micelio crecido sobre PUF (b)..... 90
- Figura 16.** Perfil de proteasas extracelulares por *Aspergillus niger* C28B25 en Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican Aw= 0.995 y los símbolos vacíos indican Aw= 0.96. 95
- Figura 17.** Perfiles de pH de los ECE obtenidos por *Aspergillus niger* C28B25 en Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican Aw= 0.995 y los símbolos vacíos indican Aw= 0.96. 97
- Figura 18.** Cromatogramas de los isoelectroenfocos de los ECE obtenidos por FMS, McS Aw = 0.995 (a); FMS, McS Aw = 0.96 (b); FML, MsS Aw = 0.995 (c) y FML, MsS Aw = 0.96 (d). AVP (■), perfil de pH (●)..... 100
- Figura 19.** Zimogramas obtenidos por FMS (a) y FML (b). Con el medio McS (I y II) y con el medio MsS (III, IV, V y VI). A una Aw = 0.995 (I, III y V) y Aw = 0.96 (II, IV y VI). 103
- Figura 20.** Zimograma de los ECE obtenidos por FMS con el medio McS (I y II) y por FML con el medio MsS (III y IV). Los números impares fueron obtenidos a una Aw de 0.995 y los números pares a una Aw de 0.96..... 104
- Figura 21.** Zimograma de los mismos ECE de la Figura 18 después de un periodo de almacenamiento en refrigeración. El orden de los ECE es el mismo que en la Figura anterior. 104
- Figura 22.** Perfil zimográfico de los ECE obtenidos por FMS sobre PUF con pectinas de diferente grado de metoxilación como inductor. 0% (I), 8% (II), 31% (III), 68% (IV), 93% (V) y pectato extraído de la pulpa de café (VII). 105

ÍNDICE DE TABLAS.

<u>Tabla 1.</u> Algunas enzimas pectinasas, su fuente y algunas propiedades fisicoquímicas.	24
<u>Tabla 2.</u> Crecimiento y producción de enzimas pécticas de tres cepas diferentes en medio líquido, agitado durante 5 días a 30°C.	49
<u>Tabla 3.</u> Productividad máxima de las pectinasas producidas por <i>A. niger</i> CH4 en FMS y FML.	53
<u>Tabla 4.</u> Valores de K_m aparentes de las pectinasas producidas por <i>A. niger</i> CH4 en FML y FMS.	53
<u>Tabla 5.</u> Composición de los medios utilizados en la FMS y en la FML.....	62
<u>Tabla 6.</u> Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>A. niger</i> y los valores máximos de actividad exopectinasa.	75
<u>Tabla 7.</u> Parámetros cinéticos de la producción de exopectinasas.	91

1. INTRODUCCIÓN.

Las pectinasas son un conjunto de enzimas capaces de hidrolizar a la pectina que es un polisacárido formado principalmente por unidades de ácido D-galacturónico, que pueden estar o no metilados. Las pectinasas se usan en la industria alimentaria para obtener y clarificar jugos de fruta y vino, por lo que tienen mercado potencial, dando como resultado un desarrollo de sistemas para su producción a escala industrial. El método usual de producción de las pectinasas es por fermentación sumergida (FML), en el que se utilizan medios de cultivo sintéticos y basados en sustratos naturales, con una alta concentración de pectina, por ejemplo, la pulpa de remolacha, cáscara de limón, pulpa de henequén, desechos de manzana, etc. (Trejo-Hernández *y col.*, 1991).

En estudios recientes se ha reportado la producción de enzimas pécticas, utilizando la fermentación en medio sólido (FMS) sobre diferentes sustratos como el bagazo de caña de azúcar (Acuña-Argüelles *y col.*, 1995; Hakil *y col.*, 1999), el salvado de trigo (Ghildyal *y col.*, 1981; Qadeer *y col.*, 1985; Budiartman y Lonsane, 1987; Castilho *y col.*, 2000) y la pulpa de café (Minjares, 1992; Antier *y col.*, 1993), donde se han reportado mayores; títulos de actividad, productividades, especificidad de las enzimas por su sustrato, termorresistencia y tolerancia a los cambios bruscos de pH en comparación con los obtenidos por FML (Acuña-Argüelles *y col.*, 1995). Otro punto muy importante a favor de la FMS es que no presenta represión catabólica por la adición de elevados niveles de azúcares de fácil asimilación como es la glucosa o la sacarosa (Solís-Pereyra *y col.*, 1996; Díaz-Godínez, 1997) mientras que la FML la presenta a bajos niveles de esos azúcares (Trejo-Hernández *y col.*, 1991). Sin

embargo, se han realizado pocos estudios sobre la influencia de la composición del medio de cultivo embebido en el soporte sólido, ya que por la naturaleza biodegradable de los soportes utilizados en las FMS, el manejo y control de su composición se complicaba, imposibilitando la caracterización de la fermentación.

La composición del medio de cultivo y los factores ambientales como la actividad de agua (A_w), el pH del medio y la temperatura de fermentación, podrían influir sobre la diversidad y la cantidad de estas enzimas producidas (Taragano y Pilosof, 1999). Los estudios sobre la producción de enzimas por FMS utilizando medios de cultivo sintéticos, embebidos sobre un soporte inerte (como la espuma de poliuretano) han permitido incrementar la cantidad de enzimas producidas, obteniendo altas especificidades en su síntesis en comparación con las obtenidas por FMS sobre soportes biodegradables y por FML (Zhu y col., 1996; Díaz-Godínez, 1997). Las productividades mayores de pectinasas en la FMS con respecto de la FML se han demostrado, pero no se ha logrado establecer la causa.

En este trabajo se estableció un diseño experimental que permitiera determinar si la mayor productividad de la FMS con respecto a la FML era porque, *A. niger* tiene una mayor productividad intrínseca de la biomasa medida por el coeficiente de rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$), o porque existe un mayor y más rápido crecimiento, evaluados por los parámetros de velocidad específica de crecimiento (μ , h^{-1}) y de la biomasa máxima (X_{max} , g/L) (los parámetros cinéticos se describen en la sección 8.8. de ésta tesis), lo

cual se vería reflejado en los valores de la producción de enzima por unidad de biomasa por unidad de tiempo ($\mu Y_{E/X}$, UI/gXh).

También se logró la caracterización y comparación de la FMS y de la FML en cuanto a niveles de producción de exopectinasas, de proteasas y de biomasa; así como se observó el efecto de los cambios de A_w y de la composición del medio de cultivo sobre los títulos de actividad exopectinasa.

2. GENERALIDADES.

2.1. Género *Aspergillus*.

Los aspergilos negros, o el grupo de *Aspergillus niger*, son los hongos comúnmente llamados mohos negros. Este grupo está ampliamente distribuido desde las regiones árticas hasta el trópico. Parece que el aire de cualquier lugar contiene conidias de estos organismos. Esto se podría comprobar fácilmente exponiendo al aire, por algunos minutos una caja de Petri con un medio de cultivo rico. El suelo, también contiene las esporas de aspergilos, pero nadie ha determinado con certeza si estos organismos juegan un papel importante en la ecología del suelo.

Los aspergilos son capaces de utilizar una gran variedad de sustancias para alimentarse gracias al elevado número de enzimas que producen. Desde luego, es difícil encontrar alguna sustancia que contenga alguna materia orgánica y una baja humedad donde los aspergilos no puedan crecer. Por eso, los aspergilos afectan nuestro bienestar de diferentes maneras. *Aspergillus niger* y otras especies son encontradas frecuentemente en alimentos, causando su deterioro. Por otro lado, algunas especies producen sustancias tóxicas llamadas micotoxinas, la más importante de estas es la aflatoxina.

Los aspergilos también causan considerables problemas como la contaminación de cultivos en laboratorios de micología y de bacteriología. Varias especies crecen en las fábricas de pieles y de ropa, reduciendo su valor comercial e impregnando un olor a moho a los zapatos

y a la ropa. En climas tropicales húmedos, donde los aspergilos encuentran las mejores condiciones para su desarrollo, la gente tiene que mantener su guardarropa tan seca como sea posible para prevenir que sus zapatos y sus ropas sean cubiertos por una gruesa capa de aspergilos.

Aspergillus fumigatus, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, y otras especies son patógenas para los animales y para el humano, ya que conjuntamente pueden causar enfermedades llamadas aspergilosis. La aspergilosis de los pulmones es probablemente la más seria de esas enfermedades, se presenta en aves, y varios mamíferos incluyendo al humano. Los síntomas son muy parecidos a los de la tuberculosis, por lo que en ocasiones los médicos diagnostican erróneamente (Alexopoulos y Mims, 1996).

Características fisiológicas de los aspergilos.

- Estructuras Somáticas. El micelio de los Aspergilos se parece al de muchos otros hongos. Las hifas estas bien desarrolladas, ampliamente ramificadas, septadas y transparentes, como regla, multinucleadas (Figura 1).

- Reproducción asexual. Mientras que está joven y vigoroso, el micelio produce abundantes conidióforos, los cuales no están organizados de ninguna manera, pero provienen del cuerpo de la hifa. Las células de la hifa que se ramifican para dar origen a los conidióforos son llamadas células pie. Los conidióforos son largos, y son la parte erecta de la hifa, cada conidióforo termina en un bulbo llamado vesícula. La vesícula produce un gran número de conidias en toda su superficie. Las conidias son típicamente esféricas y unicelulares con paredes externas muy duras. Las conidias son uninucleadas, pero en muchas especies pueden

multinuclearse por división nuclear. Las conidias de *Aspergillus* son formadas dentro de las fialides (conidióforos inmaduros) que son como tubos. Una fracción de protoplasma con un núcleo está delimitada por un septo, el cual se redondea por fuera y secreta una pared, madurando dentro de la conidia, posteriormente otra fracción de protoplasma inicia su maduración empujando al primero, el cual se considera espora que sale de la conidia. Dado que los conidióforos y las conidias son producidos en abundancia, su color es el que predomina en toda la colonia. Las colonias de *Aspergillus* pueden ser negras, cafés, amarillas, verdes, dependiendo de las especies y de la composición del medio sobre el cual esta creciendo el hongo. La producción de pigmentos en *Aspergillus* es importantemente influenciada por la presencia o ausencia de diminutas cantidades de los también llamados elementos traza. Mulder (1938) determinó que eran suficientes 2.5 μg de cobre para inducir el máximo desarrollo de color en *Aspergillus niger*. Cuando existe ausencia total de cobre, el color de la conidia es amarillo, mientras que en presencia de cobre, el color se presenta entre café oscuro y negro.

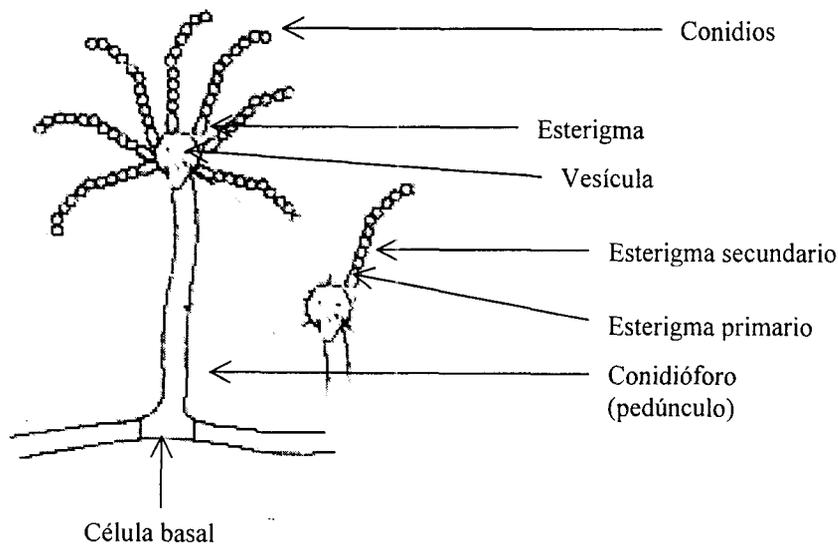


Figura 1. Diagrama de la estructura de un *Aspergillus*.

2.2. SUSTANCIAS PÉCTICAS.

Las pectinasas son enzimas que actúan sobre una gran variedad de sustancias pécticas. Las sustancias pécticas (Figura 2) comprenden un grupo extenso de polisacáridos vegetales cuya estructura básica se integra de moléculas de ácido D-galacturónico unido por enlaces glucosídicos α -D-(1,4), y en la que algunos de los carboxilos pueden estar esterificados con metilos o en forma de sales. También se encuentran asociadas con otros hidratos de carbono, como las hemicelulosas en las paredes celulares de los vegetales proporcionando firmeza en algunos de ellos (Fennema, 1993).

Entre las sustancias pécticas se pueden distinguir dos clases principales: los ácidos pectínicos, que tienen parte de sus ácidos galacturónicos como ésteres metílicos y los ácidos pécticos, que solo contienen moléculas del ácido sin esterificación; por definición las pectinas son ácidos pectínicos con diferentes grados de esterificación. Existen otros compuestos de este tipo que son las protopectinas, altamente esterificadas con metanol y muy insolubles en agua, que se encuentran en los tejidos inmaduros de los frutos y son responsables de su textura rígida (Badui, 1990). Las pectinas más abundantes e importantes se encuentran en los frutos inmaduros y especialmente en algunos tejidos suaves, como en la cáscara de los cítricos, en las manzanas, las peras, etc. Se sabe que aun dentro del propio vegetal, existe una distribución de las pectinas en donde las más esterificadas están en la parte más interna, y las menos esterificadas en su periferia, excepto para algunos productos como la espinaca y la remolacha, cuyas pectinas contienen una pequeña fracción de ácido ferúlico (0.6%) unido a los grupos no

reductores; en las frutas y hortalizas, la mayoría de éstos polímeros están constituidos exclusivamente por residuos parcialmente esterificados de ácido galacturónico (Fennema, 1993).

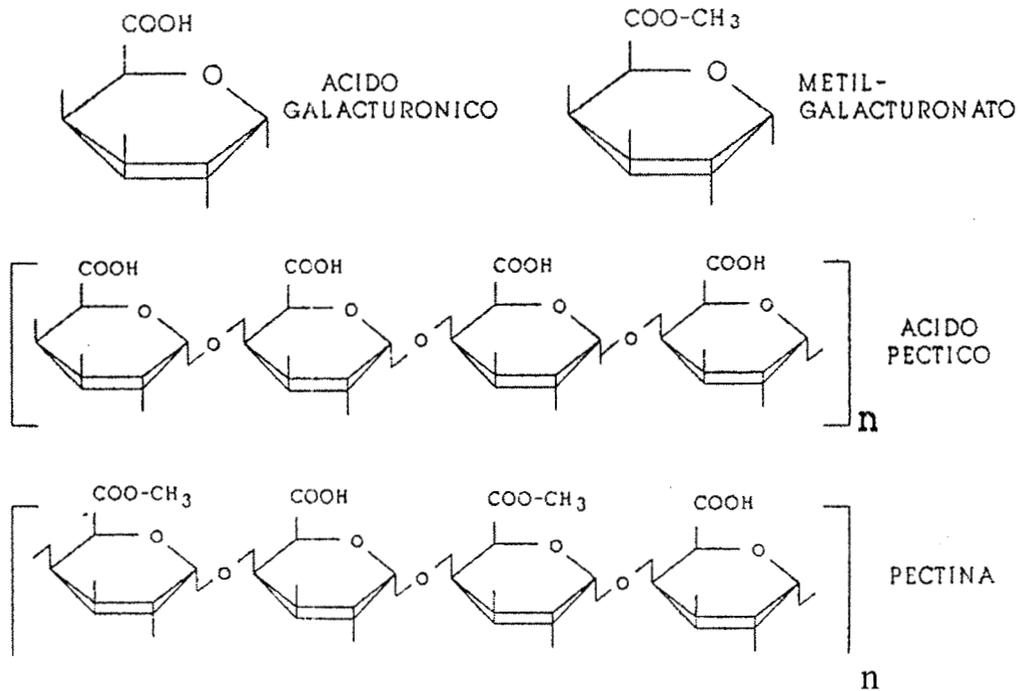


Figura 2. Estructura de las sustancias pécticas.

2.2.1. Propiedades y aplicaciones de las pectinas.

Las propiedades funcionales de las pectinas desempeñan un papel muy importante en la industrialización de las frutas, debido a que pueden aprovecharse en la elaboración de ciertos productos, donde se requiere formar geles en presencia de azúcar y ácido. En estos geles las moléculas de pectina se estructuran formando una red tridimensional, en cuyos

espacios capilares se encuentra jarabe inmovilizado (Whistler y Daniel, 1985). Las pectinas también se utilizan en la elaboración de jaleas de frutas tradicionales, flanes, coberturas y rellenos en repostería, bases de fruta para adicionar a yogures, así como también se usa como texturizante en helados, salsa, jarabes y refrescos (Badui, 1990).

Aunque no se ha determinado con precisión el mecanismo molecular por el cual la pectina forma el gel, se sabe que son indispensables: el ácido, que probablemente aporta iones H^+ para neutralizar las cargas negativas de la pectina en solución y, por tanto, las fuerzas de repulsión intermolecular, y el azúcar, que quizás intervenga en la formación del gel disminuyendo la actividad de agua (A_w) (Charley, 1987). Las propiedades características de los geles de pectina varían de acuerdo al tipo de pectina utilizada, puesto que es posible formar geles en ausencia de ácido, en presencia de iones divalentes cuando se utilizan pectinas de bajo metoxilo (Whistler y Daniel, 1985). Otros factores fisicoquímicos importantes en la formación de los geles de pectina son la temperatura, la concentración de los diversos componentes y el pH. La mayor parte de los geles de pectina comienzan a formarse por abajo de los $75^{\circ}C$ a un pH de 3.5 (May, 1990).

Por el contrario, la pectina representa un problema, sobre todo en la elaboración de bebidas. Por ejemplo al exprimir naranjas, se produce un jugo cuyas partículas en suspensión son de tejido desintegrado compuesto de fibra celulósica y pectinas, además de pequeños glóbulos de lípidos que contienen carotenoides y aceites esenciales; la turbiedad, la viscosidad y el "cuerpo" de este jugo se deben a un sistema coloidal que depende de la concentración y del grado de polimerización de la pectina, así como del pH y de las sales disueltas; de estas

características depende que el consumidor acepte el producto o no, de tal manera que aquél que esta clarificado no tiene demanda comercial. Sin embargo, en otros casos se persigue la eliminación de las pectinas como un paso importante en la clarificación de los jugos de uva y de manzana, para lo cual incluso se añaden enzimas pectinasas comerciales. Por otra parte, estos polímeros también llegan a ser la causa de problemas en ciertos procesos, sobre todo en la obturación de los poros de ciertos equipos usados en la industria (Baduí, 1990).

2.3. ENZIMAS PECTINASAS.

Las pectinasas se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a su forma de actuar sobre la pectina, se encuentran las pectinesterasas, las pectinasas hidrolíticas (endo y exo), y las pectin y pectato liasas. En la Tabla 1 se muestran diferentes enzimas pectinasas, su fuente y algunas propiedades fisicoquímicas (Pilnik *y col.*, 1973); como se observa, las pectinesterasas y pectinasas pueden ser de origen vegetal o microbiano, mientras que las pectin y pectato liasas son producidas solo por microorganismos.

Tabla 1. Algunas enzimas pectinasas, su fuente y algunas propiedades fisicoquímicas.

Enzima y fuente	Peso molecular	Punto isoeléctrico	pH óptimo	Observaciones
PECTINESTERASA				
Plátano I	30 000	8.8	6.0	2 isoenzimas
Plátano II	30 000	9.3	6.0	
Tomate	26 300	8.4		
Naranja I	36 200	10.0	7.6	2 isoenzimas
Naranja II	36 200	11.0	8.0	
<i>Fusarium oxysporum</i>	35 000			
<i>Clostridium multifermentans</i>	400 000		9.0	Complejo con PAL
PECTINASAS				
Tomate	44 000 84 000		4.5	endo, múltiples formas
<i>Aspergillus niger I</i>		3.8	4.0	endo
<i>Aspergillus niger II</i>			4.5	múltiples formas
<i>Aspergillus niger III</i>		4.5	5.5	
<i>Aspergillus niger</i>	46 000		5.0	
<i>Aspergillus niger I</i>	35 000		4.1	endo, múltiples formas
<i>Aspergillus niger II</i>	85 000		3.8	
<i>Rhizoctonia fragariae I</i>	36 000	6.8	5.0	endo, 2 isoenzimas
<i>Rhizoctonia fragariae II</i>	36 000	7.1	5.0	
<i>Fusarium oxysporum I</i>	36 500		5.0	endo, glicoproteínas
<i>Fusarium oxysporum II</i>	37 000		5.0	
PECTATO LIASA				
<i>Erwinia carotovora</i>	31 000	9.2	8.0	endo
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	30 000 a 36 000	9.4	9.8	endo, formada por 4 moléculas
<i>Erwinia aroideae</i>	37 000		9.1	endo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42 300	10.3	9.4	endo
<i>Clostridium multifermentans</i>	400 000		8.5	exo; complejo con PE
PECTIN LIASA				
<i>Aspergillus niger I</i>	35 400	3.65	6.0	glicoproteínas
<i>Aspergillus niger II</i>	33 100	3.75	6.0	péptidos
<i>Aspergillus sojae</i>	32 000		5.5	
<i>Aspergillus japonicus</i>	32 000	7.7	6.0	
<i>Dothidea ribesia</i>	31 200	8.9	8.4	

Fuente: Pilnik y col., 1973.

2.3.1. Pectinesterasas.

Las pectinesterasas transforman a la pectina en pectina de bajo metoxilo o pectato, al actuar producen metanol a partir de los grupos carboxilos esterificados (Figura 3). Lo anterior ocurre en muchas plantas y se presentan frecuentemente en cítricos y tomates, pero también son producidas en gran cantidad por hongos y bacterias. Las pectinesterasas producidas por los hongos tienen un pH óptimo alrededor de 4.5 mientras que el de las enzimas de plantas y bacterias se encuentra cerca de la neutralidad. Todas estas enzimas atacan la cadena pécica del lado del último carboxilo libre y esta enzima al producir gran cantidad de ácidos carboxílicos libres la hace extremadamente sensible al calcio, lo cual origina reacciones de entrecruzamiento que incrementan la firmeza de leguminosas como las habas verdes. Todas las pectinesterasas son altamente específicas sobre el metil ester del ácido poligalacturónico, ya que no son hidrolizados los enlaces éster metílicos de otros compuestos (Fennema, 1993).

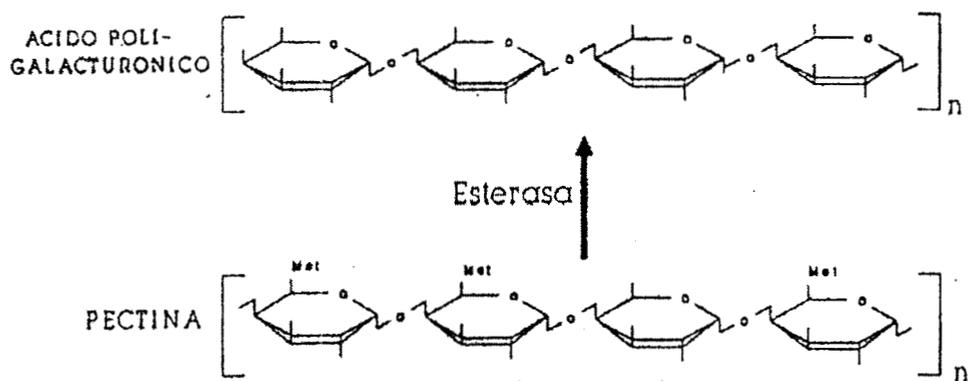


Figura 3. Diagrama de la acción de las pectinesterasas.

2.3.2. Pectinasas hidrolíticas.

Las poligalacturonasas o pectinasas hidrolíticas son enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico contiguo al grupo carboxilo libre (Figura 4); en consecuencia, las pectinas de alto metoxilo se hidrolizan muy lentamente, mientras que las de bajo metoxilo son buen sustrato, y se considera al pectato como el mejor. Las pectinasas hidrolíticas son producidas por la mayoría de los hongos, por las levaduras y también por algunas bacterias (Rombouts y Pilnik, 1980). El pH óptimo se estima entre 4.0 y 5.5. Se han reportado endo- y exo-pectinasas; las endo-pectinasas (*poli (1,4- α -D-galacturónido) glicano hidrolasa*, EC. 3.2.1.15) atacan a la cadena péctica en su interior; un pequeño incremento en grupos reductores se manifiesta con un fuerte descenso de la viscosidad de la solución que contiene el sustrato. Las exopectinasas (*poli (1,4- α -D-galacturónido) galacturono hidrolasa*, EC. 3.2.1.67) atacan del lado no reductor del polímero formando mono- ó dímeros, originando un incremento en el número de grupos reductores y una muy lenta disminución de la viscosidad (Badui, 1990).

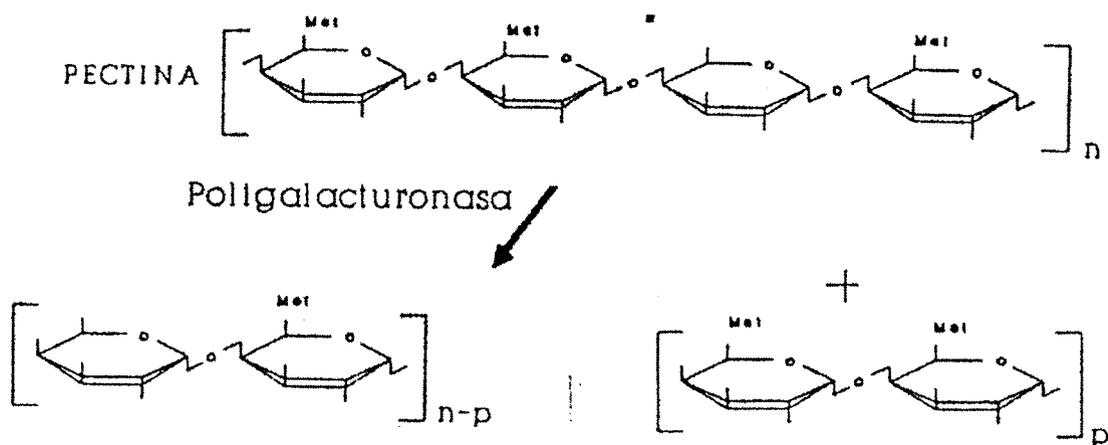


Figura 4. Diagrama de la acción de las poligalacturonasas.

2.3.3. Pectato y pectin liasas.

En la Figura 5 se observa la actividad de las liasas que actúan sobre la pectina. Las pectato liasas rompen el enlace glucosídico por β -eliminación, su acción produce dobles ligaduras entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido D-galacturónico. Al igual que las pectinasas hidrolíticas, éstas actúan del lado donde se encuentra más cercano el grupo carboxilo libre, y también se encuentran endo y exo pectato liasa. Para las del tipo exo, el pectato es el mejor sustrato y generalmente se obtienen dímeros insaturados a partir del grupo reductor terminal. Para las endo, las pectinas de bajo metoxilo son el mejor sustrato. Su pH óptimo está al rededor de 8-9.5 y por esta razón son de baja importancia en el procesamiento de frutas (Pilnik y col., 1973).

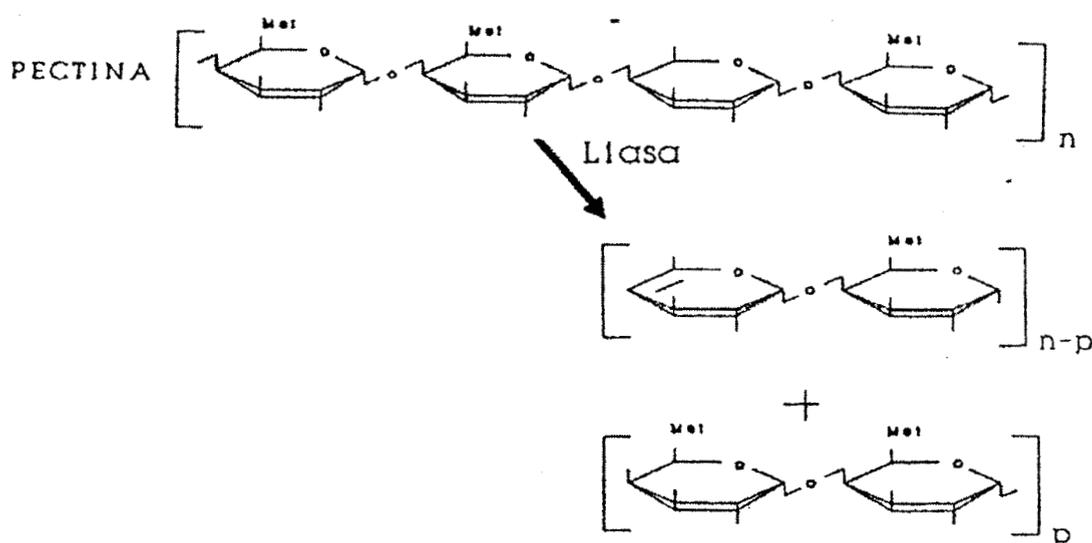


Figura 5. Diagrama de acción de las pectato y pectin liasas.

Las pectin liasas rompen el enlace glucosídico cercano al grupo metil ester por vía de la β -oxidación, su acción es similar a las de las pectato liasa. El mejor sustrato para estas enzimas (de las que solo se conocen de tipo endo), es la pectina altamente esterificada; el pH óptimo está entre 5-6, pero con la adición de iones calcio se puede presentar un segundo pH óptimo en 8 (Rombouts y Pilnik, 1980).

2.4. UTILIDAD DE LAS PECTINASAS.

La adición de enzimas pectinasas a los jugos de fruta, o bien a las frutas trituradas antes de su prensado, es una práctica general en muchas industrias alimentarias que consiste principalmente en la hidrólisis de la pectina, proceso conocido como despectinización (Potter, 1978).

Un jugo con pectina presenta propiedades de suspensión coloidal y al hidrolizar éste polisacárido se producen cambios esencialmente de carácter fisicoquímico debido a que, el jugo pierde las características de suspensión coloidal, y químico porque los productos de la despolimerización enriquecen al jugo, ya que no se eliminan por filtración y pueden participar en los procesos biológicos a los que será sometido el jugo de los que se mencionan los siguientes:

- a) Incremento en rendimientos. Cuando el tratamiento con pectinasas (mezcla de endo y exo-pectinasas) se realiza sobre la fruta en el triturador, se obtienen mayores rendimientos del jugo. La pectina funciona como un cemento que mantiene unidas a las células de las pulpas frutales. Al desaparecer este material se consiguen dos efectos que se complementan uno al otro; por un lado se reduce el poder de retención del jugo en los orujos al dejar de existir el soporte principal y por otro se atenúa sensiblemente la viscosidad del líquido, pudiendo fluir con más libertad (Rombouts y Pilnik, 1980). El rendimiento también se logra aumentar cuando la adición de las pectinasas se realiza sobre los jugos y no sobre la fruta triturada, ya que se producen otros efectos adicionales, por ejemplo, menores pérdidas de jugo en la filtración, obtención de lodos más compactos, etc. (Pilnik *y col.*, 1973).
- b) Clarificación y brillantez. La molécula de pectina es muy grande (peso molecular entre 150 y 300 kDa.). Su tamaño rebasa con gran holgura el límite inferior de las partículas coloidales. Constituyen, pues, verdaderas micelas, las cuales están cargadas negativamente. El tamaño, estructura y carga de estas micelas, hacen posible que se presenten fenómenos de adsorción. Así, todas las partículas insolubles que están presentes en los jugos, mostos, vinos, etc., se diseminan al igual que dichas unidades coloidales. El resultado es una turbiedad, cuando las pectinasas (principalmente las de tipo endo) entran en acción, convierten a las micelas en materiales solubles. El soporte que mantenía dispersas a las otras partículas no solubles es eliminado, y éstas se precipitan al fondo y el líquido se clarifica. Por otra parte, la disolución de los

productos de la despectinización, acción de las exopectinasas, determinan una brillantez muy notable (Velasco, 1968).

- c) Eliminación de problemas de filtración. La pectina convierte a los jugos, mosto, etc., en suspensiones coloidales de alta viscosidad, por lo que resulta difícil filtrarlos. Además, las grandes partículas de ese polisacárido tapan rápidamente los poros del filtro. Si la degradación producida por el proceso enzimático reduce tanto las partículas enormes de la pectina como la viscosidad del líquido, la filtración se facilita.
- d) Mejor y más rápida extracción del color. Como las pectinasas rompen las uniones de las células, el líquido solvente puede llegar a establecer más rápido e íntimo contacto con los pigmentos y se produce una mejor extracción del color (Neubeck, 1975).
- e) Reducción del tiempo de la fermentación. La despectinización libera monómeros o dímeros de ácido D-galacturónico principalmente por las exopectinasas, proceso que presenta una influencia sobre el tiempo de la fermentación. Parece ser que el hecho de que los mostos se enriquezcan con materiales fermentables (como son las unidades del ácido galacturónico, o bien los polímeros de él no muy grandes) acelera la fermentación. Aún cuando el contenido en pectina no es muy elevado en las frutas (1 a 3% dependiendo del tipo de fruta, variedad, etc.), cada molécula de pectina, puede rendir unas 1500 moléculas de ácido galacturónico (P.M. 194), de ahí que el tratamiento con pectinasas produzca un aumento considerable de materiales fermentables. La reducción de la viscosidad del mosto también facilita la tarea de los microorganismos. Así como la expulsión más fácil del bióxido de carbono producido.

El enriquecimiento de los mostos con materiales fermentables provenientes de la hidrólisis de la pectina da lugar a una mayor producción de alcohol, así como de ésteres y de materiales que comunican el aroma y el bouquet característico al producto final (Neubeck, 1975).

- f) Consideraciones económicas. Al existir mayores rendimientos en la obtención de jugos y mostos por la adición de pectinasas, provoca mayores ingresos económicos, además existe reducción de gastos por materiales filtrantes y clarificantes, así como de mano de obra, ganancia de tiempo en fermentaciones, mayor producción de alcohol, mejor calidad del producto final y simplificación de las labores industriales (Velasco, 1968).

2.5. PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

El mercado de las pectinasas es muy extenso, por lo que resulta de importancia económica. Las pectinasas se producen comercialmente por varias compañías en Europa, Estados Unidos y Japón (Oriol, 1987). Las empresas dedicadas a su producción se enfrentan con el problema de hacer más eficiente su producción, obteniendo preparaciones enzimáticas más puras, más concentradas y de mayor calidad a costos más bajos (Kilara y Benchura, 1990). Actualmente, la síntesis de enzimas a escala industrial por vía microbiana, requiere de microorganismos altamente productivos para reducir los costos de producción; pese a lo anterior, la gran cantidad de microorganismos que producen pectinasas, las restricciones impuestas sobre el origen de las materias primas utilizadas en la manufactura de alimentos y

medicinas para poder clasificarlos como “sanitariamente seguros” (status GRAS: “generally recognized as safe” de la USDA) han limitado de modo considerable las fuentes potenciales de producción de estas enzimas para su utilización industrial (Bailey y Pesa, 1990; Kilara y Benchura, 1990); de esta manera, prácticamente todas las pectinasas comerciales que existen en el mercado provienen de especies de hongos del género *Aspergillus*, sobre todo *Aspergillus niger*. Aunque existen bacterias productoras de pectinasas, como lo es por ejemplo *Bacillus subtilis*, las enzimas de origen bacteriano son vistas con cierta desconfianza y no se producen comercialmente, aunque representan una fuente potencial interesante si se considera que en algunos casos son producidas en forma constitutiva (Tsuyumu, 1977; 1979).

Las pectinasas fúngicas que se producen comercialmente consisten en mezclas de pectinesterasas, pectin liasas y pectinasas, y en ocasiones algunas otras actividades enzimáticas en diversas proporciones (Kotzekidou, 1991; Genecor Inc. Catálogo de información de productos enzimáticos No. P2CL84. San Francisco, USA. CA94080; Solvay Enzyme Product Information. California, USA). La producción industrial de estos complejos enzimáticos se lleva a cabo por fermentación sumergida (FML), o fermentación en medio sólido (FMS). El primero es ampliamente usado en comparación con el segundo, por la facilidad del control de las propiedades fisicoquímicas del sistema, sin embargo, el segundo método rinde mayor cantidad de enzima por gramo de sustrato (Trejo-Hernández y col., 1991) a una concentración mayor y es relativamente económico (Ghildyal y col., 1981; Pandey, 1992) (Para mayor información sobre la producción de pectinasas por fermentación sólida ver Antecedentes de este trabajo).

2.6. 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 “sumergida” (FML) (Hesseltine, 1972; Harvey y McNeil, 1993) en la cual los microorganismos son inoculados en una suspensión acuosa de nutrientes que se agita a fin de obtener un adecuado contacto entre estos y la fase abiótica (Scriban, 1985).

Sin embargo, existe otra técnica general de fermentación denominada “fermentación en medio sólido” (FMS), que se ha usado tradicionalmente para la manufactura de varios productos como son el pozol que se produce en algunas áreas de México por la fermentación del maíz; quesos madurados como el Roquefort y Camembert, que son fermentados con esporas de *Penicillium roquefortii* y *Penicillium camemberti*, respectivamente (Pandey, 1992).

A escala industrial se le da aplicación a la FMS para 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).

La fermentación en medio sólido es “toda aquella en la cual el sustrato no es líquido” (Hesseltine, 1972). La FMS 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 (Viniegra-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:

- a) La matriz sólida porosa puede o no ser biodegradable con una gran superficie de área por volumen. En el rango de 10^3 hasta 10^6 m²/L que favorece un rápido crecimiento microbiano sobre la interfase sólido/gas.
- b) La matriz deberá absorber agua varias veces su peso seco para presentar una alta actividad de agua (A_w) con respecto a la interfase sólido/gas y de esta manera facilitar los procesos bioquímicos.

- c) 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.
- d) 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.
- e) Las propiedades mecánicas de la matriz sólida pueden permitir la agregación de cajas 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.
- f) 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).

2.7. BIOSÍNTESIS DE PECTINASAS.

La síntesis de proteínas o de enzimas están reguladas por rutas bioquímicas, que consisten en la transferencia y decodificación de la información biológica almacenada en el ácido desoxirribonucleico cromosomal (DNA). La síntesis de proteínas funcionales o enzimas involucran etapas importantes como es la transcripción del mensaje genético a su complementario ácido ribonucleico (mRNA) y subsecuentemente la translación del mRNA como una secuencia de aminoácidos resultando un polipéptido específico. La transcripción y la translación son controladas por varios mecanismos que afectan la cantidad de enzima formada, entre ellos se encuentra los procesos de:

- a) Secreción de proteínas. La secreción de proteínas (tanto enzimas como proteínas estructurales) juega un papel muy importante en los hongos filamentosos. Las enzimas son liberadas desde la membrana citoplasmática hacia el espacio periplásmico, donde pueden ser incorporadas en la membrana citoplasmática o pared celular, y muchas veces, pueden ser excretadas a través de la pared celular hacia el medio externo. Las proteínas secretadas son incorporadas en la membrana citoplasmática o pared celular, las cuales tendrán funciones de reconocimiento. La mayoría de proteínas secretadas por hongos filamentosos (con excepción de las proteínas de membrana) son glicosiladas. Probablemente, las proteínas son secretadas tan pronto son sintetizadas (Peberdy, 1994).

b) Regulación de la síntesis de enzimas. Aunque los hongos son los principales microorganismos productores de pectinasas a escala industrial, la regulación de la síntesis de estas enzimas ha sido mejor estudiada en las bacterias fitopatógenas (Aguilar y Huitrón, 1987), quizás debido a cuestiones de simplicidad genética. Se ha reportado que dentro de éstas existen especies productoras de diferentes tipos de enzimas pécticas a un nivel constitutivo sensible a represión catabólica (Leone y Van den Heuvel, 1987; Crotti *y col.*, 1998a, 1998b, 1999). En algunos otros casos, la enzima es inducible (Foda *y col.*, 1984), pudiendo ser excretada al medio o permanecer ligada a la superficie celular (Rombouts y Pilnik, 1980).

En los hongos filamentosos el conocimiento sobre la regulación de la síntesis de pectinasas es más limitado, aunque es de esperarse una viabilidad al menos similar a la de las bacterias (Leone y Van den Heuvel, 1987). Los estudios realizados a la fecha indican que en este aspecto existen diferencias notables entre cepas, estudiando las condiciones óptimas en el medio de cultivo para la mejor producción de pectinasas con hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Algunos autores (Foda *y col.*, 1984; Taragano y Pilosof, 1999; Panda y Naidu, 2000) encontraron que factores como la temperatura, la aireación, el pH y la composición del medio eran factores importantes, pero que la cantidad de enzima producida a un nivel dado de cada uno de dichos factores variaba entre cepas -incluso de la misma especie- de acuerdo a la sensibilidad de cada cepa.

En general, se sabe que las actividades pectinolíticas pueden ser inducidas en algunos hongos por la presencia de pectina o de compuestos relacionados con ella, como el

poligalacturonato, en el medio de cultivo (Foda *y col.*, 1984) y se demostró que las enzimas pécticas producidas por *Aspergillus niger* ocurren en distintos tipos moleculares, existiendo algunas inducibles y otras constitutivas. Algunos investigadores han apoyado la idea de que existe un nivel bajo de secreción de enzimas constitutivas degradadoras de la pared celular y que los productos de la degradación pueden entonces atravesar la membrana celular hacia el interior e inducir la mayor producción de tales enzimas (Tsuyumu, 1977; Leone y Van den Heuvel, 1987). Varios estudios han comprobado que bajas concentraciones de moléculas de carbohidratos simples, como el ácido galacturónico o la sacarosa, son capaces de aumentar la presencia de diversas enzimas pectinolíticas en el medio (Foda *y col.*, 1984; Aguilar y Huitrón, 1987; Solís-Pereira *y col.*, 1993), y se ha demostrado que la adición continua y controlada de azúcares, permite obtener títulos más altos de pectinasas (sistema de lote alimentado) que en el sistema de adición única de la mezcla de sustratos al inicio del proceso (Aguilar y Huitrón, 1987).

Algunos autores reportan que los mejores medios para inducir las pectinasas son aquellos compuestos por una fuente mixta de carbono con moléculas de sustrato (pectina) y algún carbohidrato simple (glucosa, sacarosa o ácido galacturónico) (Rombouts y Pilnik, 1980; Acuña-Argüelles *y col.*, 1995, Solís-Pereyra *y col.*, 1996; Minjares-Carranco *y col.*, 1997; Díaz-Godínez, 1997; Crotti *y col.*, 1998a, 1998b). De este modo, la producción de pectinasas depende de un equilibrio entre los efectos de inducción y represión catabólica de los distintos compuestos presentes en el sustrato o medio de cultivo.

La represión catabólica, que consiste en la inhibición de la síntesis de enzima catabólicas inducibles provocada por la presencia de glucosa u otro azúcar simple en el medio, es un fenómeno general en los microorganismos (Herzkowitz, 1977). En el caso de *Aspergillus niger* se sabe que la producción de poligalacturonasa es reprimida por ciertos carbohidratos que son aprovechados con preferencia sobre el ácido galacturónico, como son la glucosa, la fructosa y los intermediarios de la glucólisis y que el punto de regulación de la pectinesterasa y de la poligalacturonasa se encontraba en la transcripción (Maldonado *y col.*, 1989).

2.8. ENZIMAS 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 3.4.21-24.x) y peptidasas (EC 3.4.11-17.x) dependiendo del sitio del enlace peptídico hidrolizable; enlace peptídico al centro o en los extremos de la proteína, respectivamente. El término proteasa es sólo aceptable cuando se desconoce la especificidad de la enzima (García-Carreño *y col.*, 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 potencial sustrato para una o más proteasas endógenas. Sin embargo, dentro de la célula, la proteólisis es altamente controlada por diversos factores, como son la compartimentalización, 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 buffer de extracción sobre la conformación de las proteínas puede incrementar la vulnerabilidad hacia la proteólisis (Pringle, 1979).

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* en comparación *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 por que 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. 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 estructurales 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, microheterogeneidad de bandas en soluciones de proteínas puras (Hames, 1981, García-Carreño *y col.*, 1993).

2.8.1. Detección de actividad proteolítica.

El desarrollo de técnicas para detección y cuantificación de la actividad de proteasas es una necesidad creciente. El sustrato mas utilizado en la evaluación de la actividad de proteasas en preparaciones biológicas es la caseína o alguno de sus derivados como la azocaseína. La caseína y sus derivados son usados a pH's neutros y alcalinos. Para enzimas con actividad a pH ácido, la hemoglobina es el mejor sustrato, dada la insolubilidad de la caseína a pH's menores a 6.0. La evaluación de las propiedades cinéticas de proteasas es complicada por dos hechos: 1) la naturaleza proteica del sustrato y 2) la especificidad de la enzima. Las proteinasas reconocen el lado carboxilo de un residuo de aminoácido específico, formando el enlace peptídico a hidrolizar. Cada vez que la enzima hidroliza un enlace peptídico la concentración molar del sustrato aumenta, en lugar de disminuir, como en la mayoría de las reacciones enzimáticas. Por esta razón se requiere de sustratos sintéticos que imitan las estructuras involucradas en un enlace peptídico (García-Carreño, 1993).

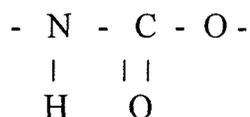
2.8.2. Inhibición de proteasas.

Para evitar la actividad de proteasas se podrían considerar 1) el protocolo de extracción de las proteínas o enzimas, 2) la inactivación de proteasas por desnaturalización y 3) la inactivación de proteasas por inhibidores. Dentro de las condiciones para la extracción de proteínas se deberán considerar; el buffer y su pH (los cuales serán los no óptimos para las proteasas), trabajar a bajas temperaturas para minimizar la actividad de las proteasas, trabajar a tiempos cortos, agregar estabilizantes de proteínas tales como el glicerol o el dimetilsulfóxido, evitar la presencia de activadores de proteasas tales como cationes divalentes (García-Carreño, 1992). Si las proteínas de interés no requieren estar en su forma activa, como es en el caso del análisis de proteínas por SDS-PAGE, la actividad de las proteasas se puede evitar por desnaturalización. La urea, el SDS o el ácido clorhídrico son agentes desnaturalizantes que podrían prevenir la proteólisis. La adición de inhibidores a las muestras representa la más favorable solución al problema de la proteólisis indeseada. Es importante agregar el inhibidor apropiado, ya que las proteasas pueden ser diferentes dependiendo del organismo o del tejido de extracción. Sin embargo, dado que solo existe un pequeño número de proteasas, los diferentes tipos de proteólisis pueden ser controlados. La pepstatina A es uno de los inhibidores recomendados para las aspartato-proteasas, para las cistein-proteasas se recomienda el ácido iodoacético, el p-methylsulfoxidefluoride, la quimostatina, leupeptina, el p-hidroxi-mercuribenzoato. Para las serin-proteasas se utilizan la benzamidina, la p-aminobenzamilina y el elastatinal, así como el inhibidor de tripsina de soya. Para las metalo-proteasas se utilizan el etilen-diaminotetraácetico y la fenantrolina. Para las calpainas se utilizan los mismos inhibidores que para las cistein-proteasas (Pringle, 1979).

2.9. ESPUMA DE POLIURETANO.

En la búsqueda de materiales inertes para los microorganismos y de utilidad como soportes en la fermentación sólida, se ha estudiado a la espuma de poliuretano como un buen candidato, ya que presentan elevada higroscopicidad y alta porosidad, no es biodegradable por *Aspergillus niger* y permite la medición de la biomasa. En estudios recientes se logró utilizar como soporte en FMS para la producción de Nucleasa P1 de *Penicillium citrinum* (Zhu y col., 1994; 1996), así como de enzimas de *Aspergillus niger* como exopectinasas (Díaz-Godínez, 1997), e invertasas (Romero-Gómez y col., 2000), así como de otros metabolitos de interés industrial como es el ácido cítrico, ácido giberélico, etc.

La espuma de poliuretano es uno de los polímeros de uretano que contienen el grupo:



Formado típicamente por medio de reacción de un diisocianato y un glicol.



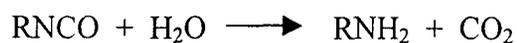
Además de espumas, a través de esta reacción se pueden obtener fibras, elastómeros y recubrimientos. Las espumas de poliuretano poseen un elevado porcentaje de enlaces cruzados, lo que les confiere una elevada termorresistencia. En la producción de las espumas

de uretano, los grupos isocianato en exceso del polímero reaccionan con agua o ácidos carboxílicos para producir dióxido de carbono, que origina la espuma, al mismo tiempo que se efectúa el entrecruzamiento. Las espumas de uretano pueden hacerse en forma flexible o rígida, según la naturaleza del polímero y el tipo de enlaces cruzados producidos.

2.9.1. Química de las espumas de uretano.

Las espumas de uretano se hacen en varias etapas. Un intermediario básico de peso molecular alrededor de 1000 Da es un poliéster formado a partir de poli(1,4-butilenglicol), poliésteres de sorbitol u otros. El intermediario básico es bifuncional si se desean espumas flexibles y polifuncional si lo que deben hacerse son espumas rígidas.

Se hacen reaccionar al intermediario con un diisocianato aromático, usualmente toluen diisocianato, para dar un prepolímero, se adicionan catalizadores basadas en aminas terciarias o en jabones de estaño para lograr la producción rápida de espuma. El entrecruzamiento se produce por medio de la formación de uniones de urea.



Para aumentar o reemplazar la acción del soplado químico se ha propuesto el uso de líquidos inertes de bajo punto de ebullición, en particular de fluorocarbonos, esto ha

conducido a ciertas propiedades ventajosas en las espumas finales, tales como la baja conductividad térmica, característica del gas de fluorocarbono que queda atrapado.

2.9.2. Propiedades y aplicaciones de las espumas.

Existen espumas flexibles y rígidas. La densidad varía de 0.03 kg/L a 0.8 kg/L; la conductividad térmica es baja hasta 0.11, sirven como retardadores de la llama y como aislantes térmicos.

- a) Espumas flexibles. Las espumas flexibles de uretano se utilizan para cojines en muebles y automóviles, desplazando a la espuma de caucho de estas aplicaciones, por su mayor resistencia, menor densidad y más fácil fabricación.
- b) Espumas Rígidas. Las espumas de uretano rígidas son resistentes a la compresión y pueden utilizarse para reforzar unidades estructurales huecas con un mínimo de peso. Además, consisten en células cerradas y tienen por ello bajos índices de transmisión de calor. Desarrollan una excelente adhesión cuando forman huecos o entre láminas de material. Finalmente, son resistentes a los aceites y la gasolina y no absorben cantidades apreciables de agua. Estas propiedades hacen a las espumas rígidas valiosas para las estructuras sándwich usadas en la prefabricación en la industria de la construcción, para el aislamiento térmico frigorífico, cabinas portátiles aisladas térmicamente, etc., además para dar flotabilidad a embarcaciones (Billmeyer, 1978).

3. ANTECEDENTES.

El método usual de producción de las pectinasas es por fermentación sumergida (FML), en los que se utilizan medios de cultivo sintéticos y medios de cultivo a partir de sustratos naturales, con una alta concentración de pectina, por ejemplo provenientes de la pulpa de remolacha, cáscara de limón, pulpa de henequén, desechos de manzana, etc. (Trejo-Hernández *y col.*, 1991).

En estudios recientes se ha desarrollado la producción de enzimas pécticas, utilizando la fermentación en medio sólido (FMS) sobre diferentes sustratos como el bagazo de caña de azúcar; salvado de trigo (Ghildyal *y col.*, 1981; Qadeer *y col.*, 1985; Budiatman y Lonsane, 1987; Durand y Blachere, 1988; Castilho *y col.*, 1999, 2000); sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la influencia de la composición del caldo de cultivo embebido en el soporte sólido. La composición del caldo de cultivo es un factor importante ya que influye sobre la diversidad de la síntesis y la cantidad producida de estas enzimas (Panda y Naidu, 2000).

Los estudios sobre la producción de enzimas en medio sólido utilizando caldos de cultivo sintéticos, embebidos sobre un soporte inerte permiten dilucidar el comportamiento de los hongos filamentosos respecto a la composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad de agua (A_w), la liberación de calor, así como la influencia de la transferencia de gases (Oriol, 1987). Por otra parte, las condiciones del prensado del medio para la

recuperación de los metabolitos producidos en estas fermentaciones en medio sólido origina la ventaja de obtener un producto concentrado de estas enzimas (Roussos, 1985; Castilho y col., 1999; Singh y col., 1999).

En 1991 Trejo-Hernández y col., estudiaron la producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por FMS sobre soporte. Realizaron un experimento previo donde evaluaron tres cepas de hongos filamentosos, los microorganismos utilizados fueron *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. y *Rhizopus oryzae* por FML; el medio mineral contenía pectina y sacarosa (20 g/L de cada uno) como fuente de carbono, los resultados del crecimiento y producción de pectinasas para las tres cepas se muestran en la Tabla 2. Se observó que *R. oryzae*, se caracterizó por una elevada producción de biomasa pero con títulos de actividad pectinasa muy bajos, los cuales aparecieron hasta las 72 h de fermentación. *A. niger* produjo menos biomasa que *R. oryzae* pero a las 48 h de fermentación ya presentaba actividad pectinolítica y a las 120 h presentó poco más del doble que en las horas antes evaluadas. La cepa de *Penicillium* sp., produjo a las 120 h los títulos más altos de todas las cepas en todos los tiempos, pero en los tiempos antes evaluados la actividad pectinasas fue nula. Estos resultados sugieren que la sacarosa presenta un efecto de represión catabólica de la síntesis de las enzimas pécticas, y se ve manifestado en diferente grado dependiendo de la capacidad de consumo de la glucosa y su resistencia a la represión catabólica de cada cepa. De acuerdo con el experimento anterior, emplearon la cepa de *Aspergillus niger* para producir pectinas por FMS, utilizaron bagazo de caña como soporte, y estudiaron el efecto de la relación pectina/sacarosa (p/s) sobre la actividad pectinolítica, donde encontraron que la relación 1:2 de p/s presentó la mayor actividad endopectinasa a las 65 h de fermentación, mientras que para la actividad exopectinasa fue mínima en todos los

casos. Midieron la sacarosa residual, el crecimiento microbiano por cuantificación de ácidos nucleicos y el pH. Encontraron que el crecimiento del hongo mostraba un comportamiento diáuxico, ya que la síntesis de las pectinasas se daba en el momento que la sacarosa se agotaba. Encontraron que la actividad pectinolítica fue mayor en la FMS y que el tiempo de fermentación se redujo en comparación con la FML, además, encontraron que al incrementar la cantidad de sacarosa en el medio hasta una relación de pectina/sacarosa (1:2), era posible incrementar la actividad, por lo que en FMS se disminuye el efecto de represión catabólica.

Tabla 2. Crecimiento y producción de enzimas pécticas de tres cepas diferentes en medio líquido, agitado durante 5 días a 30°C.

Cepas	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Actividad Pectinolítica (U/mL)
<i>Aspergillus niger</i>	48	4.84	3.8	5
	72	7.7	3.7	5
	120	6.95	3.5	11
<i>Penicillium sp.</i>	48	0.788	4.4	0
	72	0.87	4.4	0
	120	6.45	5.5	20
<i>Rhizopus oryzae</i>	48	12.2	4.2	0
	72	16.55	4.1	1
	120	18.3	3.9	5

Fuente : Trejo-Hernández y col., 1991.

En otro estudio, Solís-Pereira y col. (1993) evaluaron el efecto de la adición de glucosa, sacarosa y ácido galacturónico sobre la síntesis de pectinasas por *A. niger* en fermentación sumergida y medio sólido sobre bagazo de caña. Encontraron que la producción

de endo- y exopectinasas por FMS se incrementó cuando los niveles de glucosa, sacarosa y ácido galacturónico se adicionaron hasta un 10% al medio con pectina. Por otro lado, en la FML la actividad decreció importantemente cuando se alcanzó tan solo un nivel de 3% de sacarosa o glucosa adicionada. Las principales diferencias encontradas en los dos sistemas de fermentación fueron que las actividades pectinasas producidas por FMS fueron mayores, además no fueron susceptibles a represión catabólica, y los tiempos de producción fueron más cortos. Estos estudios sugieren que la menor susceptibilidad de FMS a la represión catabólica es por problemas de mezclado y de difusión de nutrientes, generando gradientes de concentración.

Con base en los estudios anteriores, Solís-Pereyra *y col.* (1996), observaron la producción de pectinasas de *A. niger* por FMS con elevados niveles iniciales de glucosa. Realizaron fermentaciones sólidas sobre bagazo de caña con un medio mineral, pectina como inductor natural y diferentes niveles de glucosa (100, 250, 350 y 400 g/L). Encontraron que la máxima producción de exopectinasas y de endopectinasas se presentó a las 72 h en el medio que contenía 100 g/L de glucosa. Cuando la concentración de sacarosa se incrementó hasta 250 g/L, la velocidad de producción de las exopectinasas se redujo, ya que a las 48 h se presentó menor actividad en comparación con la obtenida con 100 g/L de sacarosa; con concentraciones de 350 y 450 g/L se redujo fuertemente la actividad exopectinasa. Con estos resultados se observa que en la FMS se pueden utilizar como inductores indirectos de enzimas a azúcares simples, los cuales además de incrementar los títulos de enzimas, reducen los tiempos de producción, pero también se puede presentar cierto grado de represión catabólica a concentraciones muy altas de estos azúcares.

En estudios realizados para obtener cepas con mayor producción de pectinasas, Antier y col. (1993) realizaron una selección de cepas sobreproductoras de pectinasas. De 248 cepas aisladas de zonas cafetaleras, cultivadas sobre cajas Petri, solo 12 fueron escogidas para producir pectinasas, ya que los niveles de actividad pectinolítica que presentaron fueron iguales o mayores que los que reportó la cepa control (*Aspergillus niger* CH4), de esas cepas, se seleccionaron cuatro que en FMS sobre pulpa de café presentaron actividad pectinolítica (tres cepas de *Aspergillus* y una de *Penicillium*). De las cuatro cepas, una de *Aspergillus niger* denominada "C28B25" (la que presentó la mayor actividad, 27.7 UI/mL de extracto crudo enzimático (ECE), y 135 UI/g de pulpa seca) se utilizó para producir pectinas por FML en un medio con pectina como inductor y diferentes niveles de sacarosa y de glucosa, empezando por cero hasta 10 g/L. Antier y col. (1993) observaron que el sistema de pectinasas era sensible a represión catabólica cuando la concentración estaba entre 5 y 10 g/L de azúcares, sin embargo la adición de pequeñas cantidades de estos azúcares (1 g/L) provocaba un incremento en la producción de pectinasas.

Antier y col. (1993), realizaron una selección de cepas mutadas de la cepa de *Aspergillus niger* C28B25 sobreproductoras de pectinasas, variaron la A_w en presencia de 2-desoxiglucosa en los medio de fermentación, encontraron cepas desreprimidas y adaptadas a la FMS sobre pulpa de café o FML. De acuerdo con la A_w , se obtuvieron dos grupos de cepas, la AW99 ($A_w = 0.99$) que estaban adaptadas principalmente a la FML y las AW96 ($A_w = 0.96$) mejor adaptadas a la FMS. Estos estudios muestran que la A_w puede ser una variable que influye en la capacidad de síntesis y de excreción de las enzimas, pero hasta ahora no se sabe si afecta el número de especies químicas o solo los rendimientos.

En otro estudio sobre el efecto del A_w sobre la producción de pectinasas de *Aspergillus niger* CH4 por FMS, Acuña-Argüelles y col. (1994), evaluaron 3 depresores de A_w y el etilenglicol fue el más eficiente, pues encontraron que los títulos de actividad volumétrica se disminuyeron, mientras que la actividad específica se incrementó hasta 4.5 veces cuando se redujo la A_w hasta valores de 0.90. Grajek y Gervais (1987) reportaron que la actividad poligalacturonasa producida por *Trichoderma viride* por FMS decreció hasta cero cuando la A_w se bajó hasta 0.96. Estos resultados indican que existe un efecto negativo de la depresión de la A_w sobre la producción de enzimas, pero no se sabe si está relacionada directamente sobre la síntesis de las enzimas o con la disminución en la velocidad de crecimiento y de los rendimientos de biomasa.

Acuña-Argüelles y col. (1995), evaluaron las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de tres enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* producidas por FMS y FML; obtuvieron, primeramente altas productividades (la productividad fue calculada como (actividad) (volumen del reactor)⁻¹ (tiempo de producción máxima)⁻¹) de endo-, exopectinasas y pectin liasas con la FMS en comparación con las obtenidas por FML (Tabla 3); en la FMS, todas las pectinasas fueron más estables a valores extremos de pH y temperatura, pero los valores de K_m de las endo-pectinasas y pectin-liasas fueron más altas que las obtenidas por FML (Tabla 4). También encontraron a través de SDS-PAGE, que el ECE producido por FMS, presentó el mismo número de bandas que el producido por FML, pero con algunas diferencias de posición sobre el gel, tales diferencias en la movilidad de las pectinasas sobre el gel podrían deberse a cambios estructurales de las proteínas.

Se ha reportado que algunas propiedades fisicoquímicas y patrones electroforéticos pueden ser relacionados con los cambios en los niveles de glicosilación de las enzimas; además se ha mostrado que la glicosilación incrementa la termoestabilidad de las enzimas (Acuña-Argüelles *y col.*, 1995).

Tabla 3. Productividad máxima de las pectinasas producidas por *A. niger* CH4 en FMS y FML.

Actividad	Productividad (U ml ⁻¹ h ⁻¹)		Relación de productividad (Sólido/líquido)
	FMS	FML	
Endopectinasa	0.06	0.01	6.05
Exopectinasa	0.14	0.0002	51.47
Pectinliasa	0.008	0.0002	29.2

Fuente: Acuña-Argüelles *y col.*, 1995.

Tabla 4. Valores de K_m aparentes de las pectinasas producidas por *A. niger* CH4 en FML y FMS.

Actividad enzimática	K _m (mg/mL)	
	FMS	FML
Exopectinasa	2.05	5.42
Endopectinasa	270.4	69.4
Pectin-liasa	12.8	2.28

Fuente: Acuña-Argüelles *y col.*, 1995.

Minjares-Carranco *y col.* (1997) encontraron que *Aspergillus niger* produce isoenzimas con diferencias en las propiedades pectinolíticas en extractos crudos dependiendo del sistema de fermentación (FMS y FML) y cepa utilizada en su producción (cepa silvestre “C28B25”, cepas mutantes; AW99-iii adaptada a FML, AW96-3 adaptada a FMS). Encontraron diferencias en los patrones de bandas de los geles de electroforesis. En los extractos obtenidos por FML, las cepas mutadas presentaron tres bandas extras a las que presentó la cepa silvestre en sus extractos, además, en general los patrones producidos por FML fueron diferentes en comparación con los obtenidos por FMS.

A través de zimogramas encontraron que la actividad hidrolasa (endo y exopectinasas) obtenida por FML fue mayor con la cepa AW99-iii, pero termosensible, mientras que las bandas presentadas por las cepas silvestre y la AW96-3 fueron menores pero estables al tratamiento térmico. Las cepas silvestre y la AW96-3 produjeron una mayor actividad esterasa que la cepa AW99-iii, pero todas termosensibles. En los zimogramas de los extractos obtenidos de las tres cepas por FMS no se observó actividad hidrolasa, pero después del tratamiento térmico se hicieron presentes, lo cual sugiere que estas enzimas se encontraban en forma de zimógenos y que se activaron con calor, o es posible que en los extractos se encontraban inhibidores de las enzimas que se destruyeron por calor; al igual que en los extractos de la FML, las tres cepas presentaron una actividad esterasa similar, pero después del tratamiento térmico se inactivaron.

También evaluaron la estabilidad térmica de la actividad en los extractos crudos *in vitro* donde encontraron que las enzimas producidas por FML resultaron ser más termorresistentes que las producidas por FMS.

Díaz-Godínez (1997) evaluó la espuma de poliuretano como soporte en la FMS para producir enzimas exopectinasas, donde se observaron actividades específicas elevadas (aproximadamente 10 veces mayor que la obtenida por FMS sobre bagazo de caña y 100 veces mayor que la obtenida por FML), además no existió represión catabólica por adición de altos niveles de sacarosa en la FMS, mientras que en la FML se inhibió totalmente la síntesis de las enzimas.

Con base en los estudios antes mencionados, se tienen evidencias de que el incremento de azúcares como la glucosa o la sacarosa al medio de fermentación incrementan la síntesis de enzimas por FMS y que en FML se presenta la represión catabólica. Además se ha observado que dependiendo del sistema de producción de las enzimas (FMS y FML), se presentan diferentes patrones de secreción de las enzimas y de las proteínas en general, posiblemente por la composición del medio de fermentación, principalmente en la cantidad y tipo de fuente de carbono, actividad de agua, y disponibilidad física de los nutrimentos. Sin embargo no se sabe si la mayor productividad de las pectinasas en FMS con respecto a la FML se debe a una mayor producción de biomasa (X) en presencia de altos niveles de azúcares sin represión catabólica o si además se debe a un rendimiento más alto de la enzima por unidad de biomasa (UI/gX).

4. HIPÓTESIS.

1. La mayor productividad de las exopectinasas de *A. niger* cultivado por FMS con respecto a la obtenida por FML se debe, principalmente a una mayor producción de biomasa, dado que en la FMS existe un mayor y más rápido crecimiento en presencia de azúcares como la sacarosa o la glucosa y de una pequeña cantidad de inductor sin que se presente represión catabólica.
2. La depresión de la A_w por la adición de etilenglicol conduce a un metabolismo más lento de *A. niger*, lo cual retarda el crecimiento y como consecuencia disminuye la producción de las exopectinasas.
3. El uso de la PUF como soporte inerte en la FMS, eliminará las posibles interferencias que pudiera tener la degradación del soporte durante el crecimiento de *A. niger*, reflejándose en mayores actividades específicas en comparación con las obtenidas por fermentación sumergida.

5. JUSTIFICACIÓN.

Las pectinasas tienen un mercado amplio, y por otro lado, la FMS ha resultado más eficiente en la producción de estas enzimas que la FML, ya que las productividades ($\text{UI mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) obtenidas por FMS son mayores, además, presentan mayor estabilidad a cambios de pH y mayor termorresistencia; quizá debido al grado de glucosilación (Acuña-Argüelles *y col.*, 1995, Minjares-Carranco *y col.*, 1997; Kawano *y col.*, 1999). También se ha observado que la A_w es un factor que disminuye la producción de enzimas amilasas (Grajek y Gervais, 1987) y de pectinasas (Acuña-Argüelles *y col.*, 1994; Taragano y Pilosof, 1999), pero no se sabe si la depresión de la A_w tiene un efecto directo sobre la síntesis de las pectinasas o si la disminución de la actividad es consecuencia de la disminución de la velocidad de crecimiento de la biomasa. Por otro lado se han hecho estudios sobre la utilidad de la PUF como soporte en la FMS, donde se han obtenido extractos crudos enzimáticos con una elevada actividad específica, (Zhu *y col.*, 1996; Díaz-Godínez, 1997), y se ha observado que no hay represión catabólica de las pectinasas por adición de sacarosa de hasta 100 g/L.

Sin embargo, no se sabe con certeza cuáles son las causas de las diferencias en las actividades enzimáticas producidas por FML y por FMS. Se ha pensado que la depresión de la A_w o el tipo de inductor podrían ser señales que inducen la síntesis de diferentes enzimas (enzimas con diferente grado de glucosilación o de diferente cadena polipeptídica, que en ambos casos se reflejaría en el peso molecular de las enzimas, observado en geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes). También se ha sugerido que la mayor

productividad de la FMS está relacionada con una mayor productividad intrínseca de la biomasa (*A. niger*) medida por el coeficiente de rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$), o porque existe un mayor y más rápido crecimiento, evaluados por los parámetros de velocidad específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$) y por la biomasa máxima ($X_{\text{max}} \text{ g/L}$) (los parámetros cinéticos se describen en la sección 7.8. de ésta tesis). La producción de enzima por unidad de biomasa por unidad de tiempo también podría ser diferente en la FMS con respecto de la FML ($\mu Y_{E/X}$, UI/gXh). Es por eso que en este estudio se decidió utilizar un sistema de FMS que permitiera establecer y controlar las mismas variables que en la FML, y así poder determinar los factores que influyen en las diferencias de actividad de las exopectinasas obtenidas en ambos sistemas de fermentación. Se pensó en un sistema que tuviera las siguientes características:

1. Un soporte sólido, inerte (no biodegradable), sin agentes inhibitorios del crecimiento, altamente higroscópico, esterilizable, con una elevada porosidad y de fácil compresión mecánica para extraer y lixiviar el licor de cultivo que contuviera las enzimas extracelulares. Estas propiedades fueron satisfechas por la PUF de baja densidad (Raimbault y col., 1989; Zhu y col., 1994, 1996; Díaz-Godínez, 1997, Hakil y col., 1999).
2. Un diseño experimental en el que, gracias a las propiedades descritas del soporte sólido, se pudiese medir con precisión y reproducibilidad la biomasa, por incremento de materia sólida en el sistema, además de evaluar el consumo de sustrato y la

actividad enzimática excretada al licor de fermentación. Además que la composición del medio de cultivo fuera completamente definida por el empleo de compuesto químicos de grado analítico.

3. Un modelo cinético de tipo logístico asociado a la producción de la enzima que es descrito en detalle en la sección 7.8., el cual permita evaluar en forma precisa y fácil los parámetros fisiológicos de las fermentaciones, para su posterior comparación estadística orientada a la prueba de las hipótesis de este trabajo.

6. OBJETIVOS.

6.1. OBJETIVO GENERAL.

Explicar las causas de la mayor productividad y de las diferencias de los títulos de actividad exopectinasa de *A. niger* presente FMS con respecto a la obtenida en la FML.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Caracterizar las fermentaciones sumergida y sólida en cuanto a crecimiento de *Aspergillus niger* y a su producción de pectinasas a diferentes niveles de Aw, en dos diferentes medios de cultivo (con y sin sacarosa).
2. Caracterizar parcialmente los extractos crudos enzimáticos. Evaluación de la actividad exopectinasa, concentración de proteína, actividad de proteasas, así como la realización de cromatografías de isoelectroenfoque y zimografía.

7. METODOLOGÍA.

7.1. MICROORGANISMO.

Se usó la cepa silvestre de *Aspergillus niger* C28B25 (Boccas y col., 1994; Minjares, 1992; Antier y col., 1993), misma que se propagó a 30°C por 72 horas, y se mantuvo a 4°C en agar dextrosa y papa.

7.2. CONDICIONES DE CULTIVO.

7.2.1. Medios de cultivo.

Se usaron dos medios de cultivo sintéticos: medio con sacarosa (McS) y medio sin sacarosa (MsS), cuyas composiciones se muestran en la Tabla 5, se evaluaron dos actividades de agua: $A_w = 0.995$, sin etilenglicol y $A_w = 0.96$, ajustada con 10% de etilenglicol (se evaluaron tres depresores de A_w , de los cuales se eligió el etilenglicol por los motivos que se discuten en la sección 8.1. de esta tesis). Ambos medios se evaluaron en la FML y en la FMS, donde el pH inicial fue de 4.5.

Para evaluar el efecto del grado de metoxilación de la pectina sobre la variedad de pectinasas se utilizó el medio McS, en la FMS sobre PUF, donde se sustituyó la pectina con

8% de metoxilación por pectinas con 0, 31, 68 y 93 % de metoxilación así como con pectato extraído de la pulpa de café.

Tabla 5. Composición de los medios utilizados en la FMS y en la FML.

Constituyente	McS (g/100g medio)	MsS (g/100g medio)
Pectina (8% metoxilación)	1.5	1.5
Sacarosa	4.0	0.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.26	0.29
K ₂ HPO ₄	0.65	0.177
Urea	0.3	0.1
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.02	0.0066
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.029	0.0096
MnCl ₂ -4H ₂ O	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴
ZnCl ₂	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴
CuSO ₄	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴
Agua	92.94	97.69
C/N	5.75	5.72
C/P	7.37	8.50
C/S	19.88	19.46

Fuente: Díaz-Godínez, 1997 (modificado).

7.2.2. Fermentación sumergida.

Los cultivos en medio líquido se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Se colocaron 50 mL de cada medio y se inocularon bajo condiciones asépticas con 10⁸ esporas por gramo de fuente de carbono. Todos los cultivos fueron incubados a 35°C y agitados a 200 rpm en un agitador orbital.

7.2.3. Fermentación sólida.

Como soporte para la FMS se utilizó espuma de poliuretano (PUF) de baja densidad (17 kg/m^3) cortada en cubos de 0.5 cm por lado. Los cubos de PUF se lavaron dos veces con agua caliente y una vez con agua templada. Las FMS se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 1 g de la PUF seca y estéril mezclada con 30 mL del medio líquido. Se inocularon bajo condiciones asépticas con 10^8 esporas por gramo de fuente de carbono. Todos los medios se incubaron a 35°C y fueron agitados manualmente al menos tres veces al día para homogenizar el medio (Díaz-Godínez, 1997).

7.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS ENZIMÁTICOS Y DE LA BIOMASA.

En la FML, el ECE se obtuvo por filtrado y retención de la biomasa a través de papel filtro Whatman No. 4 a peso constante. El ECE se filtró a través de membranas Millipore ($0.45 \mu\text{m}$). La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó hasta peso constante para su cuantificación.

En el caso de la FMS, el ECE se obtuvo por prensado de la PUF a través de un embudo Buckner, mezclado con 6 mL de agua destilada usada en el lavado de la PUF después del primer prensado (para recuperar el volumen perdido por evaporación, que representó el 20% del volumen total). El ECE se filtró a través de membranas Millipore ($0.45 \mu\text{m}$). La biomasa

producida se quedó inmovilizada sobre la PUF, y los residuos del medio de cultivo se eliminaron con 3-4 lavados más, y después de secar la PUF hasta peso constante se pudo determinar la cantidad de biomasa producida (Zhu *y col.*, 1996; Díaz-Godínez 1997). El pH de los ECE se midió por potenciometría.

7.4. CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA EXCRETADA.

La proteína total excretada fue medida en los ECE libres de células por el método de Bradford (1977). A 50 μ L de ECE se le adicionaron 200 μ L del reactivo de Bradford, el volumen ajustó a 1 mL con agua destilada, y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se usó la albúmina sérica bovina como proteína estándar.

7.5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXOPECTINASA.

La actividad exopectinasa (AVP) se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) mediante la evaluación del incremento de los azúcares reductores (Miller, 1959) después de incubar la enzima (10 μ L de ECE) con 400 μ L de sustrato (10 mg/mL de ácido poligalacturónico) y con 500 μ L de buffer de acetatos 0.1 M a pH 4.5, por 15 min a 45 °C. Una unidad internacional de actividad exopectinasa (UI) se consideró como la cantidad de enzima que libera un micromol de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones de experimentación (Acuña-Argüelles *y col.*, 1995). Las UI por unidad de volumen se consideraron como la actividad volumétrica, y las UI por mg de proteína se consideraron como la actividad específica (AEP).

7.6. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS EXTRACELULARES.

La actividad de proteasas se midió en los ECE libres de células, por cambios en la absorbancia a 520 nm producidos en la mezcla de reacción de 50 μL de ECE, 850 μL de azocoll (Sigma) al 5% en buffer de acetatos 0.1M y pH = 4.5, e incubados a 35 °C por 30 min. La reacción fue detenida con 100 μL de ácido tricloroacético al 5%. Una unidad (U) de actividad de proteasas fue definida como la cantidad de enzima que libera grupos Azo, los cuales producen un incremento de 0.001 de absorbancia por minuto (Dosoretz y col., 1990a, 1990b).

7.7. AZÚCARES RESIDUALES.

El consumo total de azúcares fue evaluado midiendo los azúcares residuales por el método de Antrona (Trevelyan y Harrison, 1952).

7.8. ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.

Las curvas de crecimiento fueron establecidas por la ecuación logística:

$$dX/dt = \mu(1-X/X_{\max})X \quad (1)$$

donde, μ es la máxima velocidad específica de crecimiento y X_{\max} es la biomasa máxima (o de equilibrio) producida cuando $dX/dt = 0$ para $X > 0$. La solución de la ecuación (1) es la siguiente

$$X = X_{\max}/(1 + Ce^{-\mu t}) \quad (2)$$

donde, $C = (X_{\max} - X_0)/X_0$; cuando $X = X_0$ es el valor inicial de la biomasa.

La estimación de los parámetros cinéticos de las ecuaciones previas fue hecha mediante un procedimiento de minimización de las sumas de los errores usando el programa llamado "Solver" presente en la hoja electrónica de Excel (Microsoft). El rendimiento teórico de enzimas con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$ calc) fue estimado como la pendiente de la correlación lineal inicial entre E (UI/L) y X (gX/L). Se calculó la productividad teórica de las enzimas ($PR_T = \mu * X_{\max} * Y_{E/X}$), y la productividad observada en los picos de actividad ($PR_O = AVP/\text{Tiempo fermentación}$). También se calcularon, el rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato ($Y_{X/S} = X_{\max}/\Delta S$) donde ΔS es el consumo de sustrato, la tasa específica de formación de enzima ($q_p = \mu * Y_{E/X}$), y la tasa de utilización de sustrato ($q_s = \mu/Y_{X/S}$).

7.9. ISOELECTROENFOQUE.

Para realizar el isoelectroenfoque se tomaron dos ECE dializados con mayor actividad exopectinasa en los tiempos óptimos de cada fermentación (para la FMS: medio McS con $A_w = 0.995$ y 0.96 ; para la FML: medio MsS con $A_w = 0.995$ y 0.96). Estos experimentos se realizaron en un Rotofor (BioRad), con anfólitos (electrolitos con diversos pK's) de intervalo de 3–10 de pH.

7.10. ZIMOGRAMAS PARA LA DETECCIÓN *IN SITU* DE LA ACTIVIDAD DE PECTINASAS.

Los zimogramas se realizaron con alícuotas de los ECE dializados obtenidos por FMS y por FML con ambos medios de cultivo y con ambas A_w , de los tiempos de máxima actividad. Posteriormente, se hicieron comparaciones entre los ECE de mayor AVP de cada sistema de fermentación, que fueron de la FMS con McS a $A_w = 0.995$ y 0.96 , y de la FML con MsS a $A_w = 0.995$ y 0.96 , así como también a los ECE obtenidos en las FMS con pectinas de diferentes grados de metoxilación.

La actividad pectinasa fue detectada *in situ*, usando la técnica modificada SDS-PAGE de Laemmli (1970). El gel de separación contenía 9% de acrilamida, 2.7% de *bis*-acrilamida y 0.5% de pectina (8% de esterificación). El gel de empaquetamiento contenía 4% de acrilamida y 2.7% de *bis*-acrilamida. La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel. El buffer de corrida

contenía: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 35% glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Las muestras de ECE (0.08-0.1 UI cada una) fueron corridas en geles de 1.5 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini-Protean II (BioRad) a 150 voltios por 1 a 1.25 h. Después de la corrida, los geles fueron lavados con agua destilada y desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) por 5-6 h, con un cambio de agua cada hora para eliminar el SDS y renaturalizar a las proteínas. Posteriormente, los geles fueron incubados por 36 a 48 h a temperatura ambiente en buffer de acetatos 0.1M a pH 4.5. Después de la incubación, los geles fueron lavados 2 o 3 veces con agua desionizada, 1 min cada vez, para eliminar el exceso de buffer, por último se tiñeron con una solución de rojo de rutenio al 0.02% por 30 min (Ried y Colmer 1985; Cruickshank y Wade 1980). La actividad hidrolítica apareció como zonas claras. La movilidad relativa (R_f) y los pesos moleculares de cada banda con actividad de pectinasa fueron calculados con la ayuda de estándares preteñidos para SDS-PAGE, de bajo peso molecular (BioRad).

7.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los experimentos, así como las determinaciones químicas y bioquímicas se realizaron por triplicado. Se calcularon las medias y desviaciones estándar para la obtención de las curvas. El ANOVA y la prueba de diferenciación de medias por el método de Duncan se realizaron a los valores de X_{max} y de AEP, mediante el paquete estadístico SAS (Statistical analysis system).

8. RESULTADOS.

8.1. EVALUACIÓN DE DEPRESORES DE ACTIVIDAD DE AGUA.

La A_w obtenida después de la esterilización, tanto para la FML, así como para la FMS (medio sintético embebido en la PUF) fue de 0.995, lo cual nos indica que la PUF no tiene interacción con el agua y ésta se encuentra totalmente libre, por lo que en ambos sistemas de fermentación el agua se encuentra físicamente igual, es decir con la misma movilidad y disponibilidad, solo que en la PUF la relación área/volumen es aproximadamente 300 veces mayor que en el medio líquido. Para abatir la A_w se probaron a diferentes concentraciones en el medio de cultivo de la FMS de etilenglicol (EG), de polivinilpirrolidona (PVP) y de polietilenglicol (PEG). El primero resultó ser el más eficiente, ya que como se observa en la Figura 6, la PVP y el PEG perdieron su efecto de depresión de A_w después de una concentración del 3%, reduciendo la A_w hasta 0.99 que no era suficiente. El efecto del EG fue proporcional a su concentración, dando lugar a una $A_w = 0.98$ con una concentración del 5% y una $A_w = 0.96$ con 10% de EG. Dado que el etilenglicol fue el compuesto más efectivo en la FMS, se procedió a evaluarlo en el medio de la FML. En la Figura 7 se observa que el efecto en la depresión de la A_w fue muy similar al que se presentó en la FMS. Por lo tanto, las fermentaciones se trabajaron sin depresor con $A_w = 0.995$ y con una $A_w = 0.96$ ajustada con 10% de EG, (se hicieron fermentaciones preliminares donde se utilizó un 5% de EG para ajustar la $A_w = 0.98$).

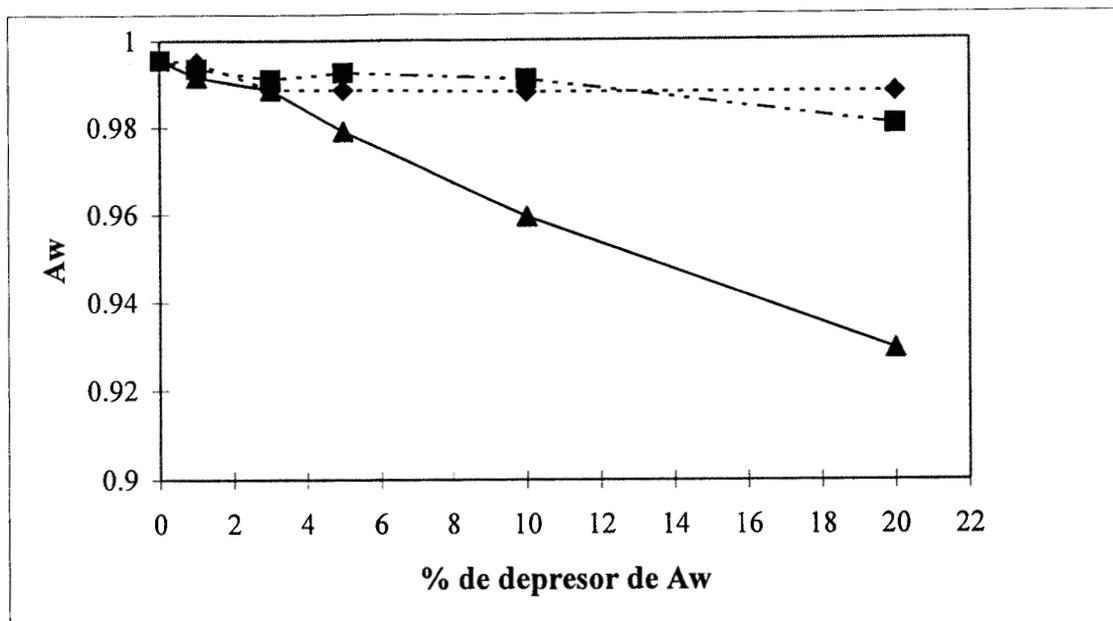


Figura 6. Evaluación del efecto de la concentración de tres compuestos sobre la Aw en el medio para FMS sobre PUF. Polivinilpirrolidona (◆), Polietilenglicol (■), Etilenglicol (▲).

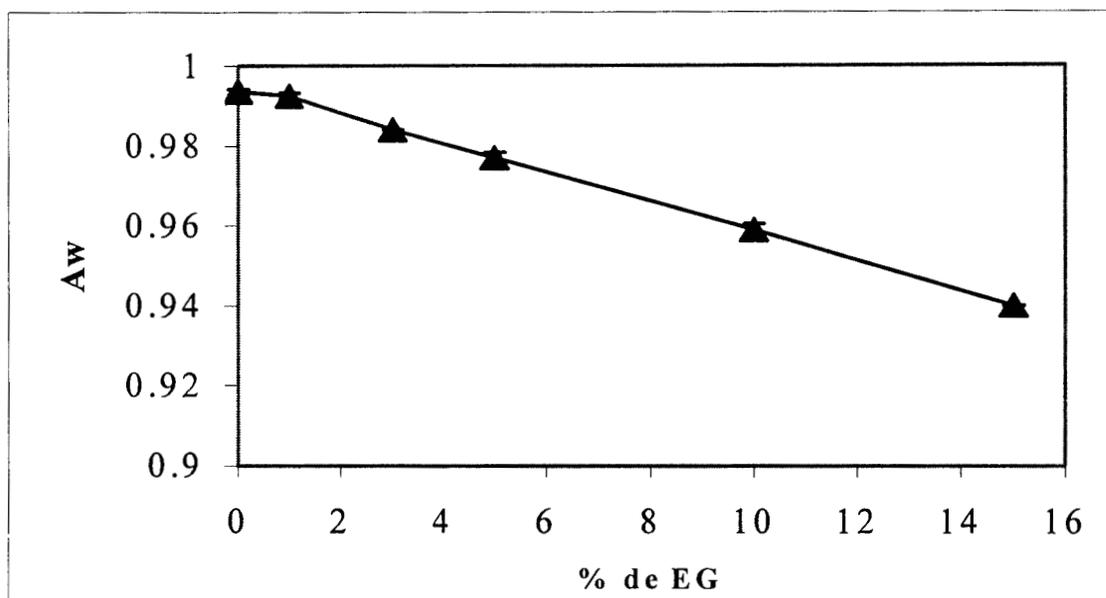


Figura 7. Evaluación del efecto de la concentración de etilenglicol sobre la Aw en el medio de la FML.

8.2. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE EXOPECTINASAS.

8.2.1. Fermentaciones preliminares.

Se realizaron FMS sobre PUF a dos A_w diferentes ($A_w = 0.98$ y 0.96), se hicieron muestreos cada 12 h hasta las 60 h de fermentación, con el fin de encontrar los tiempos de esporulación del hongo bajo esas condiciones de A_w , y así poder establecer los tiempos de muestreo y finalización de las siguientes fermentaciones. No se realizaron fermentaciones con una $A_w = 0.995$ (sin depresor de A_w), porque ya se tenían antecedentes del tiempo de esporulación que empieza a las 24 h (Díaz-Godínez, 1997).

Se encontró que el crecimiento del hongo a una $A_w = 0.98$, empieza a detenerse a las 24 h, pero es hasta las 36 h cuando ha esporulado completamente, mientras que con una $A_w = 0.96$ el crecimiento se detiene hasta las 36 horas y a las 48 h esporuló completamente (Figura 8). Se observó que la disminución de la A_w hasta 0.98 afecta muy poco la cantidad de biomasa que se produce y los tiempos de esporulación son muy parecidos a los obtenidos a una $A_w = 0.995$. La disminución de la A_w hasta 0.96, provocó retardos en el crecimiento, así como también los rendimientos de X_{max} fueron menores. Con base en estos resultados se decidió trabajar solamente con $A_w = 0.995$ y 0.96 , puesto que la $A_w = 0.98$ no mostró cambios significativos en el crecimiento de *A. niger*, y lo que buscamos en este trabajo es relacionar los cambios en productividades enzimáticas con cambios fisiológicos del hongo.

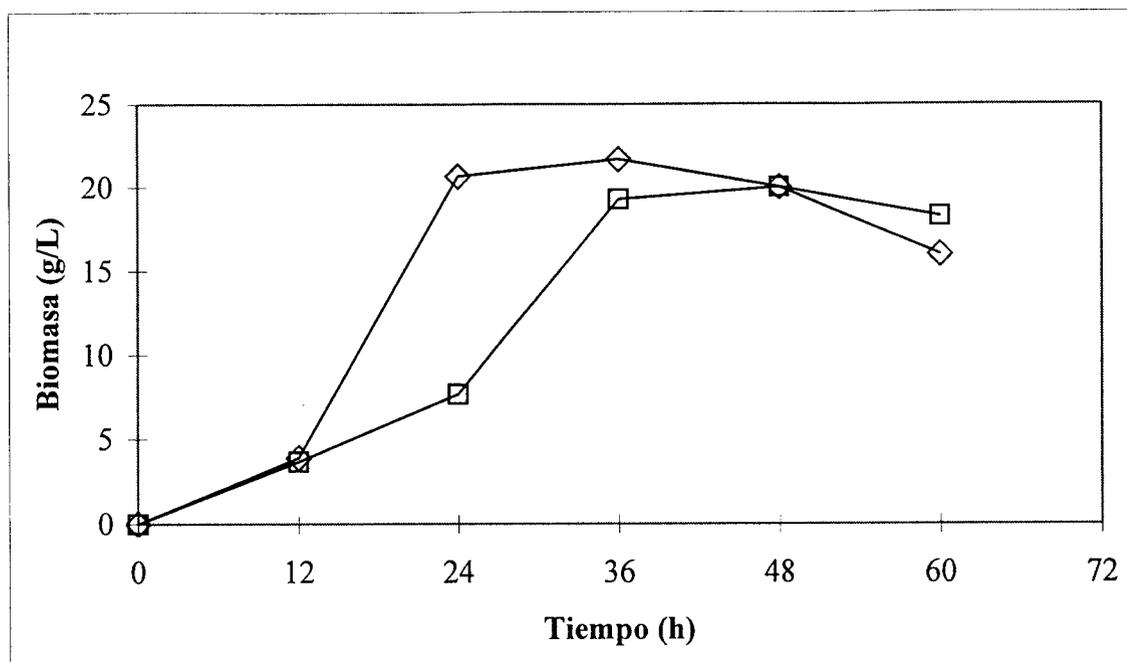


Figura 8. Curvas de crecimiento de *A. niger* por FMS sobre PUF a dos diferentes A_w . 0.98 (\diamond), 0.96 (\square).

8.2.2. Biomasa.

En los experimentos realizados tanto en la FMS como en la FML, se utilizaron dos medios de cultivo (con y sin sacarosa), cuya composición se muestra en la Tabla 5, además se evaluaron dos A_w (0.995 y 0.96). En la Figura 9 se muestran las curvas de crecimiento de *A. niger* bajo las condiciones de experimentación establecidas. Se observó que la sacarosa es un componente importante en el crecimiento del hongo ya que los máximos valores de biomasa en FMS y en FML se presentaron con el medio McS. La FMS con alta A_w y con McS produjo los títulos más altos de biomasa (X_{max}) que fue de 23.9 g/L, (Figura 9a, Tabla 6), seguido de la FMS con el mismo medio pero con $A_w = 0.96$, la cual mostró un valor de $X_{max} = 18.5$ g/L.

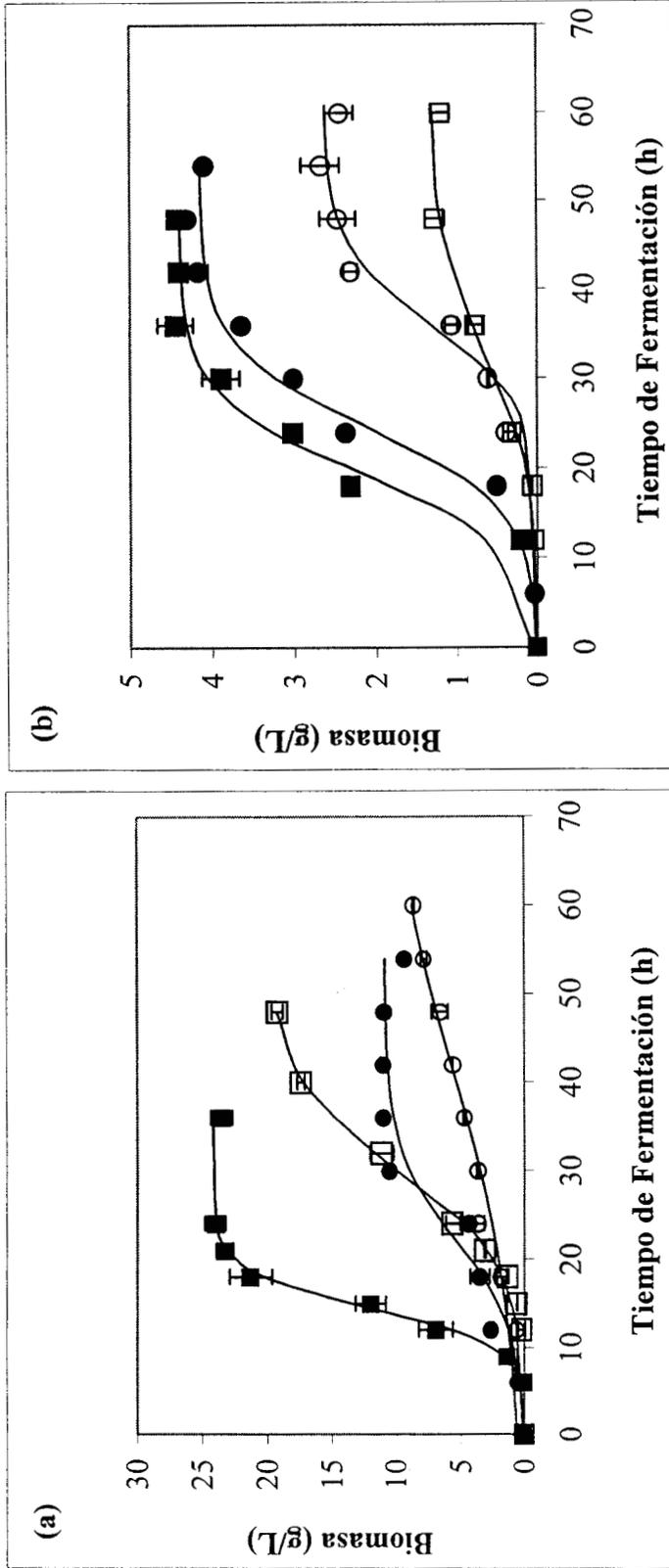


Figura 9. Curvas de crecimiento de *Aspergillus niger* C28B25 con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w=0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w=0.96$.

La línea continua representa las curvas ajustadas por el modelo logístico (ver materiales y métodos). Los intervalos en cada punto corresponden a las desviaciones estándar ($n = 3$). En algunos puntos, los intervalos fueron más pequeños que los símbolos.

La biomasa obtenida por FML con el medio McS y A_w de 0.995, produjo poco menos de la mitad que la FMS bajo las mismas condiciones (11 g/L), y cuando se redujo la A_w en ese mismo medio, la biomasa obtenida fue de 9.9 g/L, que también es aproximadamente la mitad de la obtenida por FMS bajo las mismas condiciones. Analizando los experimentos realizados con el medio MsS (Figura 9b), se observó que los valores de X_{max} disminuyeron drásticamente en comparación con los obtenidos con el medio McS, notando que la ausencia de sacarosa fue la principal causa. Cuando se evaluó el medio sin sacarosa y una $A_w = 0.995$, la X_{max} obtenida en la FMS no presentó diferencia significativa con la obtenida por FML en las mismas condiciones de experimentación (Tabla 6), mientras que cuando se redujo la A_w hasta 0.96, la FML presentó poco más del doble de X_{max} que la FMS, pero en ambos casos los valores fueron muy pequeños. Con estos resultados se puede observar que al incrementar la fuente de carbono se incrementan los rendimientos de biomasa, pero mucho más en la FMS que en la FML, posiblemente porque la FML se encuentre limitada por oxígeno. En otras palabras, al incrementar la concentración de azúcares, se incrementa la demanda bioquímica de oxígeno, y en el medio líquido no se satisfacen las demandas por la baja solubilidad del oxígeno (≈ 6 mg/L), mientras que en el aire la solubilidad del oxígeno es aproximadamente 50 veces mayor (≈ 304 mg/L). Lo anterior se comprueba al observar que la FMS y la FML sin sacarosa y $A_w = 0.995$ produjeron la misma cantidad de X_{max} , pues la demanda bioquímica de oxígeno es baja y se satisface con las cantidades de oxígeno disuelto, sin embargo, al incrementar la cantidad de fuente de carbono, la FML no satisface la demanda bioquímica de oxígeno, reflejándolo en una disminución de biomasa producida con respecto de la FMS.

Tanto en la FMS como en la FML, la depresión de la A_w es una condición de estrés para el hongo, la cual se refleja en la disminución de las velocidades específicas de crecimiento (Tabla 6). Se puede apreciar que la FMS con el medio McS y una $A_w = 0.995$ presentó el valor más alto de μ (0.47 h^{-1}). La FMS con la misma A_w pero con el medio MsS mostró una $\mu = 0.23 \text{ h}^{-1}$, al igual que la FML con el medio MsS a las dos A_w . Estos resultados muestran que la disminución de la A_w provoca una disminución en la μ y en la X_{\max} , lo cual comprueba la segunda hipótesis de esta tesis, indicando que la baja A_w es un factor antagónico al crecimiento de *A. niger*.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de crecimiento de *A. niger* y los valores máximos de actividad exopectinasa.

Sistema	A_w	Medio	μ (h^{-1})	X_{\max} (g/L)	AVP** (UI/L)	AEP** (UI/mg proteína)
FMS	0.995	McS*	0.47	23.9 ^a (0.87)	7150 ^a (450)	382
		MsS*	0.23	4.4 ^c (0.06)	623 ^{d,c} (16.5)	29
	0.96	McS	0.18	18.5 ^b (1.04)	1911 ^b (141)	91
		MsS	0.15	1.2 ^g (0.08)	541 ^c (8.1)	33
FML	0.995	McS	0.19	11.0 ^c (0.12)	0	0
		MsS	0.22	4.38 ^c (0.06)	1714 ^b (34)	181
	0.96	McS	0.07	9.9 ^d (0.47)	0	0
		MsS	0.22	2.7 ^f (0.13)	1146 ^c (165)	119

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Los números en paréntesis corresponden a la desviación estándar.

* McS = 40 g/L sacarosa, MsS = sin sacarosa.

** AVP = Actividad volumétrica exopectinasa, AEP = Actividad específica exopectinasa (AVP/mg proteína).

Otro aspecto importante que se observó en estos experimentos fue que, el hongo presentó una fase de adaptación más larga en la FMS cuando se utilizó el medio MsS, por lo que la sacarosa además de promover el incremento en los rendimientos de la biomasa, también ayudó a que el crecimiento fuera más rápido y que exista menos consumo de energía en la fase de adaptación cuando se crece sobre el soporte sólido. Es importante mencionar que las curvas de crecimiento se ajustaron con altos coeficientes de correlación ($R^2 > 0.98$) en todos los casos, mostrando que la ecuación (1) es un buen modelo para explicar estos procesos de crecimiento.

8.2.3. Consumo de sustrato.

En la Figura 10a se muestra el perfil de consumo de la pectina y sacarosa, mientras que en la Figura 10b se observa el consumo de la pectina, en ambas fermentaciones. Es importante hacer notar que en todos los experimentos la cantidad de azúcares al final de la fermentación fue mínima (se agotaron los azúcares), lo que muestra, que las diferencias en rendimiento de biomasa no estuvieron determinadas por las diferencias en consumo de sustrato, pues existieron diferencias en las velocidades de consumo, pero no en la cantidad asimilada. La velocidad de consumo de sustrato estuvo inversamente relacionado con la velocidad de crecimiento del hongo, por lo que, en las condiciones de mayor velocidad de crecimiento, la velocidad de consumo de sustrato también fue mayor.

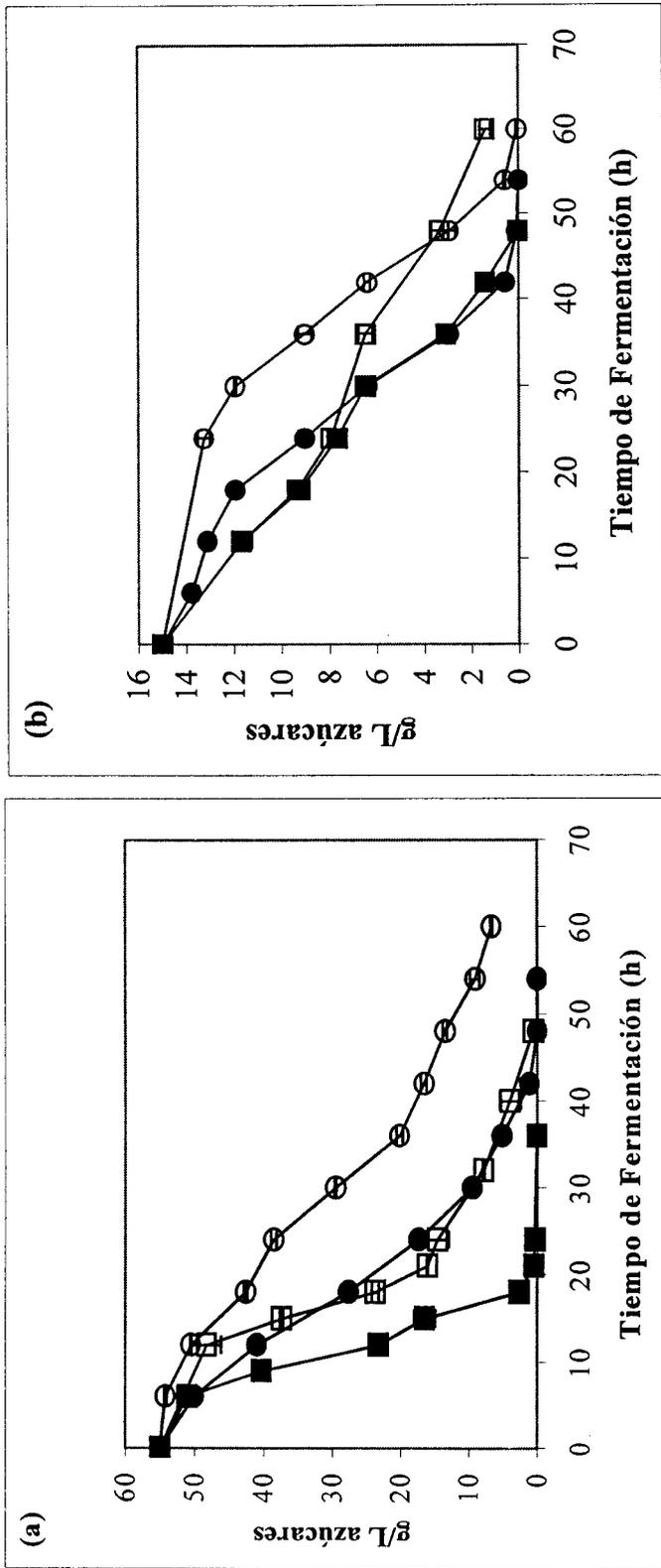


Figura 10. Curvas de consumo de sustrato por *Aspergillus niger* con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (○) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.

Los intervalos en cada punto corresponden a las desviaciones estándar ($n = 3$). En algunos puntos, los intervalos fueron más pequeños que los símbolos.

Se observó que la velocidad de consumo fue mayor cuando se utilizó el medio McS (Figura 10a), el cual contenía 15 g de pectina y 40 g de sacarosa, que cuando se utilizó el medio MsS (Figura 10b), que contenía solo 15 g de pectina. Lo anterior muestra que el hongo utiliza más rápido y más eficientemente a la sacarosa (disacárido) que a la pectina (polisacárido); es decir, mientras que el hongo tenga sacarosa en el medio, crecerá más rápido, y al existir más biomasa, habrá mayor producción de exopectinasas para hidrolizar a la pectina. Se sugiere que en la FMS, el hongo realiza un co-metabolismo de la sacarosa y de la pectina, utilizando la sacarosa como fuente de carbono (sin represión catabólica) en la producción de biomasa y la pectina como inductor de las exopectinasas, las cuales liberaran ácido galacturónico que utilizarán también como fuente de carbono.

Por otro lado, en la FML, se presentó el fenómeno de represión catabólica de las exopectinasas por presencia de azúcares simples, por lo que se sugiere que el hongo presentó un crecimiento diáuxico, donde utilizó la sacarosa como única fuente de carbono y energía, sin utilizar la pectina, pero cuando se agotó la sacarosa, empezó a utilizar la pectina excretando exopectinasas; pero el crecimiento del hongo podría limitarse no solo a las cantidades de azúcares disponibles sino a espacios y disponibilidad de oxígeno. Se pudo observar que con los mismos medios de cultivo, pero con diferente sistema de fermentación, los rendimientos de biomasa fueron diferentes (la FMS presentó el doble de la FML), lo cual sugiere que existe una limitación de oxígeno en el medio líquido por su baja solubilidad en el agua (≈ 6 mg/L), mientras que la solubilidad del oxígeno en el aire es aproximadamente 50 veces mayor (≈ 304 mg/L).

8.2.4. Actividad exopectinasa.

La Figura 11 muestra los perfiles de actividad exopectinasa (AVP) obtenidas en las fermentaciones. Se hace notar el efecto de la sacarosa sobre la actividad (Figura 11a), ya que en la FMS actuó como un inductor indirecto, mientras que en la FML actuó como un represor de la síntesis de exopectinasas. La máxima actividad obtenida fue en la FMS con el medio que contenía sacarosa y una A_w de 0.995 (Tabla 6) mientras que esta fermentación a la misma A_w pero sin sacarosa (Figura 11b), presentó aproximadamente 10 veces menos actividad. La FML presentó AVP con los medios que no contenían sacarosa, mostrando un valor ligeramente mayor en la fermentación con $A_w = 0.995$.

La sacarosa provocó represión catabólica en la FML a ambas A_w , por lo menos hasta las primeras 30 h de fermentación, sin embargo, durante ese tiempo existió crecimiento del hongo, lo cual nos sugiere que al agotarse la sacarosa, desapareció la represión catabólica, aunque la actividad presentada después de las 30 h fue muy pequeña (20 veces menor que la máxima de la FMS).

En los experimentos sin sacarosa, la FML en ambas A_w (Figura 11b) presentó AVP mayores que la FMS, lo que muestra que, solo en presencia de sacarosa la FMS es más eficiente que la FML.

Comparando ambos sistemas de fermentación, podemos decir que la actividad obtenida por el mejor sistema de FMS ($A_w = 0.995$ y medio McS) es aproximadamente cuatro veces

mayor que el mejor de la FML ($A_w = 0.995$ y medio MsS). En la FMS con el medio McS y A_w de 0.995 se presentaron dos picos de actividad, el primer pico se presentó a las 15 h, y el segundo a las 24 h de fermentación, éste último fue aproximadamente mayor en un 40% con respecto del primero; en las otras tres FMS se presentó un pico de actividad a las 20 h de fermentación. La FML con el medio con sacarosa presentó represión catabólica en ambas A_w , mientras que con el medio sin sacarosa y A_w de 0.995, se presentó la máxima actividad a las 20 h y se mantuvo hasta las 48 h de fermentación. Al disminuir la A_w hasta 0.96, la actividad máxima se presentó desde las 36 h y se mantuvo hasta las 60 h de fermentación. El efecto de la depresión de la A_w sobre la μ y sobre la X_{\max} (Tabla 6) en la FMS y en la FML comprueba la segunda hipótesis de esta tesis indicando que la baja A_w es un factor antagónico al crecimiento de *A. niger*. Sin embargo en la FMS, la disminución de la A_w incrementó el $Y_{E/X}$, tanto con el medio MsS como con el medio McS, lo cual sugiere que la producción de la enzima puede estar regulada por procesos diferentes a los de la regulación del crecimiento de *A. niger*.

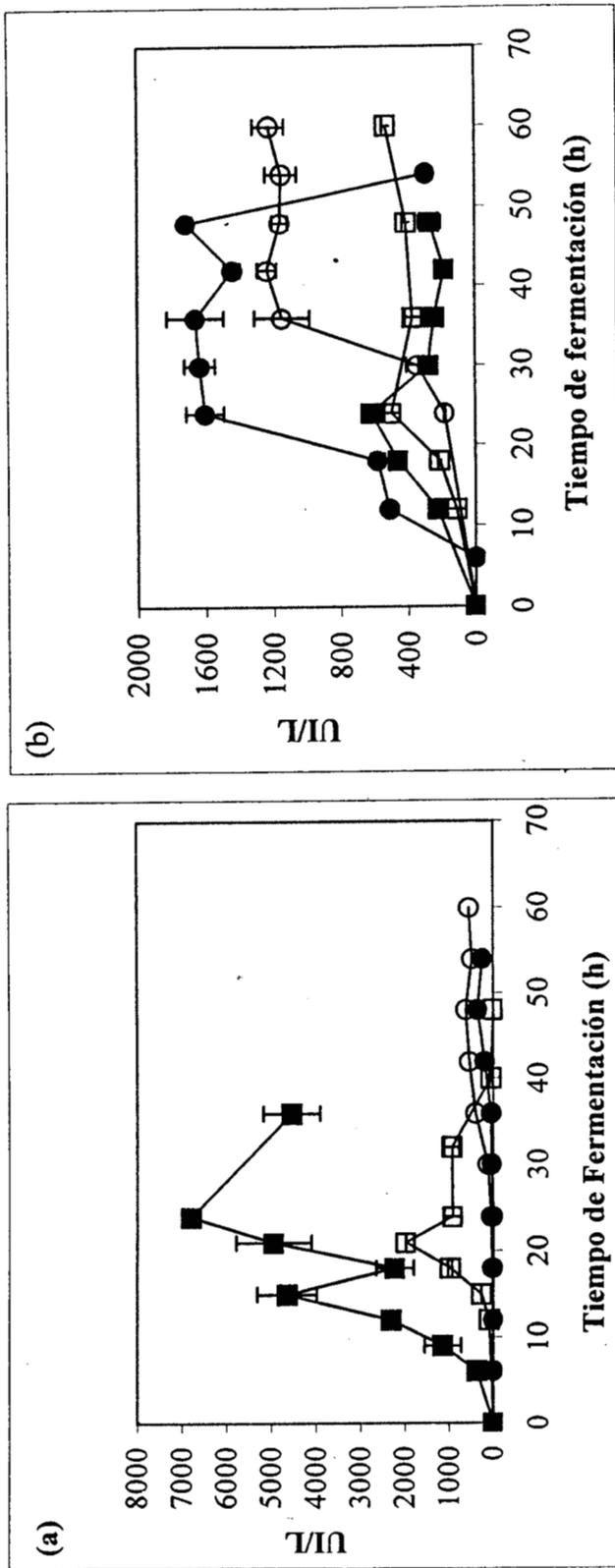


Figura 11. Actividad exopectinasa de *Aspergillus niger* C28B25 obtenida con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (○). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.

Los intervalos en cada punto corresponden a las desviaciones estándar ($n = 3$). En algunos puntos, los intervalos fueron más pequeños que los símbolos.

8.2.5. Proteína excretada.

En la Figura 12 se muestran los perfiles de proteína excretada. En general, Los títulos se mantuvieron cercanos a 0.02 mg/mL hasta las 30 horas de fermentación, para alcanzar valores de 0.06-0.08 mg/mL, mostrando mayores títulos las fermentaciones sin sacarosa. La FMS con medio McS (Figura 12a) a una A_w de 0.995 presentó en las primeras 18 h el valor más bajo, del orden de 0.001 mg/mL, para después incrementar su valor hasta 100 veces a las 36 h, este fue el mayor de todos los casos.

8.2.6. Actividad específica de las exopectinasas.

Las diferencias en cuanto a la AEP estuvieron dadas en pequeño grado por las diferencias en la concentración de proteína en los ECE, pero fuertemente afectadas por los diferentes niveles de actividad volumétrica. Se pudo observar que, la FMS con el medio McS y A_w de 0.994 presentó cerca de 400 UI/mg (Figura 13a), la cual fue poco más del doble que la obtenida por FML con el medio MsS y A_w de 0.995 (Figura 13b), en ambos casos fueron los máximos valores para cada fermentación. Por otro lado, en la FMS con el medio sin sacarosa a ambas A_w , presentó valores de 30 UI/mg, los cuales fueron menos de la décima parte obtenida en presencia de sacarosa y elevada A_w . La FML con medio McS presentó represión catabólica por lo que los valores de actividad no se pudieron calcular y se reportaron como cero. Es importante mencionar que los picos de AEP en la FMS se presentaron en las primeras horas de fermentación.

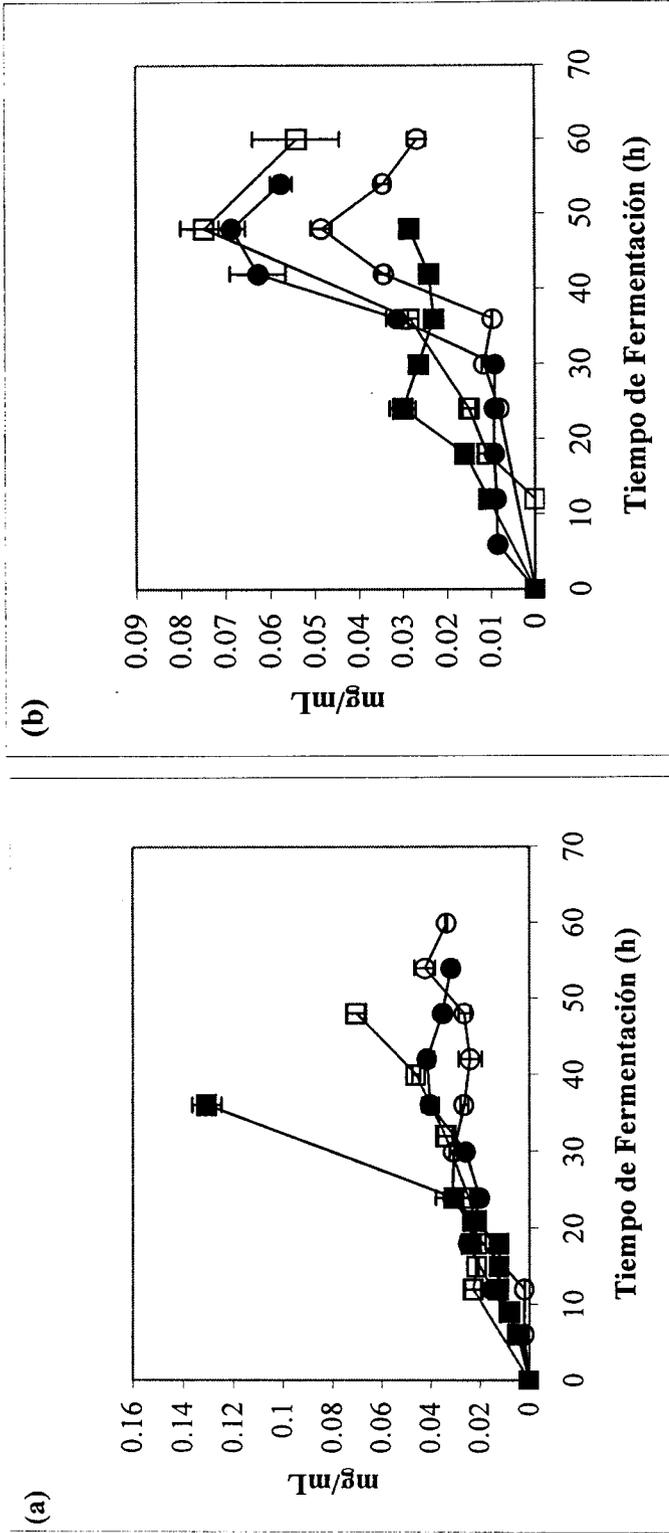


Figura 12. Perfiles de proteína excretada de *Aspergillus niger* C28B25 obtenida con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w=0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w=0.96$. Los intervalos en cada punto corresponden a las desviaciones estándar ($n = 3$). En algunos puntos, los intervalos fueron más pequeños que los símbolos.

En la Figura 13a se aprecia que la FMS con A_w de 0.995 presentó un solo pico a las 15 h y cuando la A_w fue de 0.96, el principal pico se presentó a las 20 h. En la FML se presentaron los picos de actividad a tiempos más tardíos. En la Figura 13b se puede observar que el pico de actividad de la FML con A_w de 0.995 se presentó entre las 24 y 30 h de fermentación, mientras que con una A_w de 0.96, el pico se presentó hasta las 36 h de fermentación. Este resultado comprueba la tercera hipótesis de ésta tesis, que indica la producción de ECE's con menor cantidad de proteínas no deseables en la FMS sobre PUF en comparación de la FML.

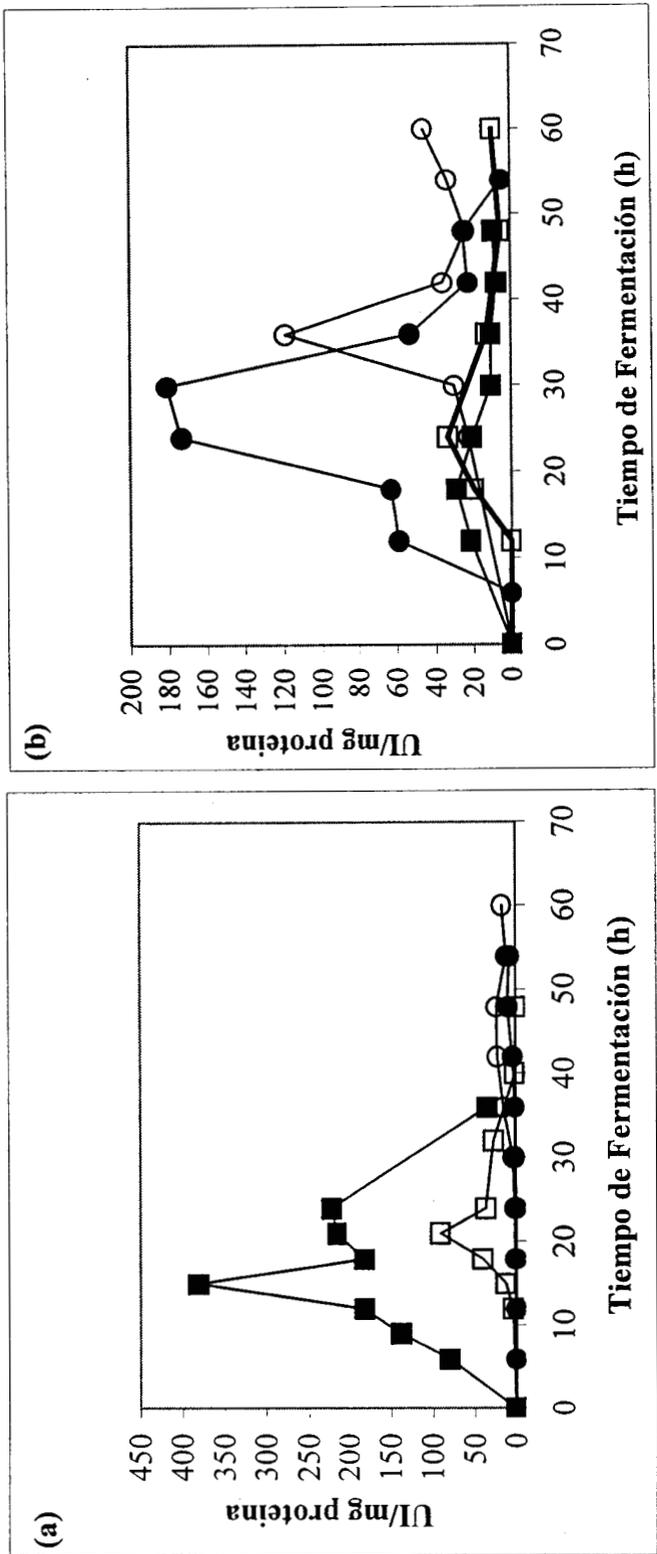


Figura 13. Actividad específica exopectinasa excretada de *Aspergillus niger* C28B25 obtenida con Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.

8.2.7. Rendimientos y productividad de las exopectinasas.

Se observó en la FMS que la depresión de A_w fue un factor que incrementó el rendimiento $Y_{E/X}$ (Tabla 7), además, el medio sin sacarosa presentó el valor más elevado, posiblemente porque el hongo tenía solo a la pectina como fuente de carbono, pero no tuvo impacto sobre los títulos totales de actividad, porque al disminuirse la cantidad de azúcares se redujo la cantidad de biomasa y como consecuencia la cantidad de exopectinasas fue menor. En la FML se corroboró el efecto de la represión catabólica de las exopectinasas por la presencia de sacarosa. En las fermentaciones sin sacarosa, se observó que la A_w no tuvo efecto sobre el rendimiento, ya que en ambos casos fue similar y su valor fue mayor que los valores obtenidos por FMS con $A_w = 0.995$. Con estos resultados se aprecia que la depresión de la A_w es un factor que puede incrementar los rendimientos en la FMS, pero como también limita el crecimiento del hongo, la actividad total se ve disminuida. Por otro lado, los rendimientos en la FML no se ven afectados por la depresión de la A_w , pero la X_{max} si se disminuye, por lo que los títulos de actividad también son menores.

La FML es más eficiente productora de exopectinasas por unidad de biomasa que la FMS, pero presenta baja disponibilidad de oxígeno lo que provoca que se obtengan bajos niveles de biomasa y como consecuencia bajos títulos de actividad (Tabla 6). Este resultado indica que la mayor producción de exopectinasas en la FMS se debe a una mayor producción de biomasa, sin represión catabólica, lo cual prueba la hipótesis principal de esta tesis.

Las posibles razones por las que la FMS produce más biomasa en presencia de elevados niveles de azúcar y por consecuencia elevados títulos de actividad sin represión catabólica, son de tipo fisicoquímico, ya que aproximadamente, en la FML se tiene una relación área/volumen de $0.5 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$, mientras que para la PUF utilizada en la FMS bajo las condiciones que se trabajaron en éste estudio es de aproximadamente $160 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$, lo cual nos dice que la FMS tiene mayor área disponible para el crecimiento del hongo en forma de redes de grosores muy pequeños ($\approx 200 \mu\text{m}$) en contacto con la fase gaseosa, mientras que en el medio líquido, el crecimiento se da en forma de pellets que pueden llegar a medir hasta 2 mm de diámetro, los cuales tienen menos disponibilidad de oxígeno. Por otro lado, los tiempos de mezclado en el medio líquido son muy cortos ($\approx 4 \text{ s}$) mientras en el medio sólido son muy lentos por lo que se favorecen gradientes de concentración de las fuentes de carbono; los coeficientes de difusividad de sólidos en medios líquidos son mayores que en los sólidos porosos, lo cual favorece que en el medio líquido exista una alta concentración de sacarosa en la interfase sólido-líquido (en la superficie del pellet), mientras que en la PUF las concentraciones son menores. En el caso del oxígeno, la difusividad depende del área superficial de contacto, ya que el coeficiente de transferencia de masa (k_L) se incrementa cuando existe mayor área de contacto (k_{La}). En los medio líquidos, el oxígeno suministrado en forma de pequeñas burbujas incrementa la difusividad hasta 100 veces. Dado esto, se observa que el medio líquido está limitado de oxígeno, y como el crecimiento es en forma de pellets de tamaño macroscópico, el micelio podrá acceder al sustrato y al oxígeno solo por difusión de éstos dentro del pellet. Pirt (1975) estableció las ecuaciones para determinar el radio crítico

(R_c) del pellet (Figura 14), el cual es el suficientemente aireado y que se obtiene con la ecuación (3).

$$R_c = (6 D_o Y_{X/S}/\rho\mu)^{1/2} \quad (3)$$

Donde D_o es el coeficiente de difusividad del sustrato, ρ es la densidad de la biomasa.

Con la ecuación (3) se estima que aproximadamente el 3-5 % del radio total del pellet tiene suficiente oxígeno (Figura 15a), pero también elevados niveles de sacarosa, por lo que en esa parte se presenta represión catabólica, mientras que en el 95-97 % restante del micelio donde la concentración de sacarosa es menor (por problemas de difusión), el oxígeno se encuentra en mínimas concentraciones, por lo que el hongo no puede realizar un metabolismo completamente aerobio, y el consumo de sustrato no se destina para la síntesis de biomasa ni de enzimas exopectinasas, sino de otros metabolitos como el ácido cítrico, glicerol, etc. (metabolitos que no se midieron).

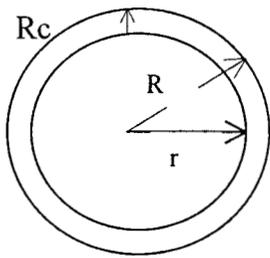


Figura 14. Esquema de un pellet, en el cual se muestra el radio total (R), el radio con deficiencia de oxígeno (r), y el radio crítico o con suficiente oxígeno (R_c).

Se supone que en la PUF (considerando al micelio como una placa plana de grosor de aproximadamente 200 μm), los gradientes son como se muestra en la Figura 15b, donde, de acuerdo con lo supuesto y respaldado por las diferencias de solubilidad del oxígeno y de las relaciones área/volumen, así como de los problemas de difusión en cada uno de los casos (i.e. FMS, FML), podemos estimar que el grosor de la capa de micelio en el medio sólido con suficiente oxígeno y baja concentración de sacarosa es de aproximadamente el 60 %, la cual es una zona sin represión catabólica, y el resto (40%) es una zona no productiva de exopectinasas porque los niveles de oxígeno y de sacarosa son elevados, lo que provoca represión catabólica. Con estos supuestos defendemos la teoría de que la FMS es más eficiente productora de exopectinasas en presencia de elevados niveles de sacarosa sin represión catabólica, mientras que la FML presentará la represión catabólica aún con bajos niveles de sacarosa.

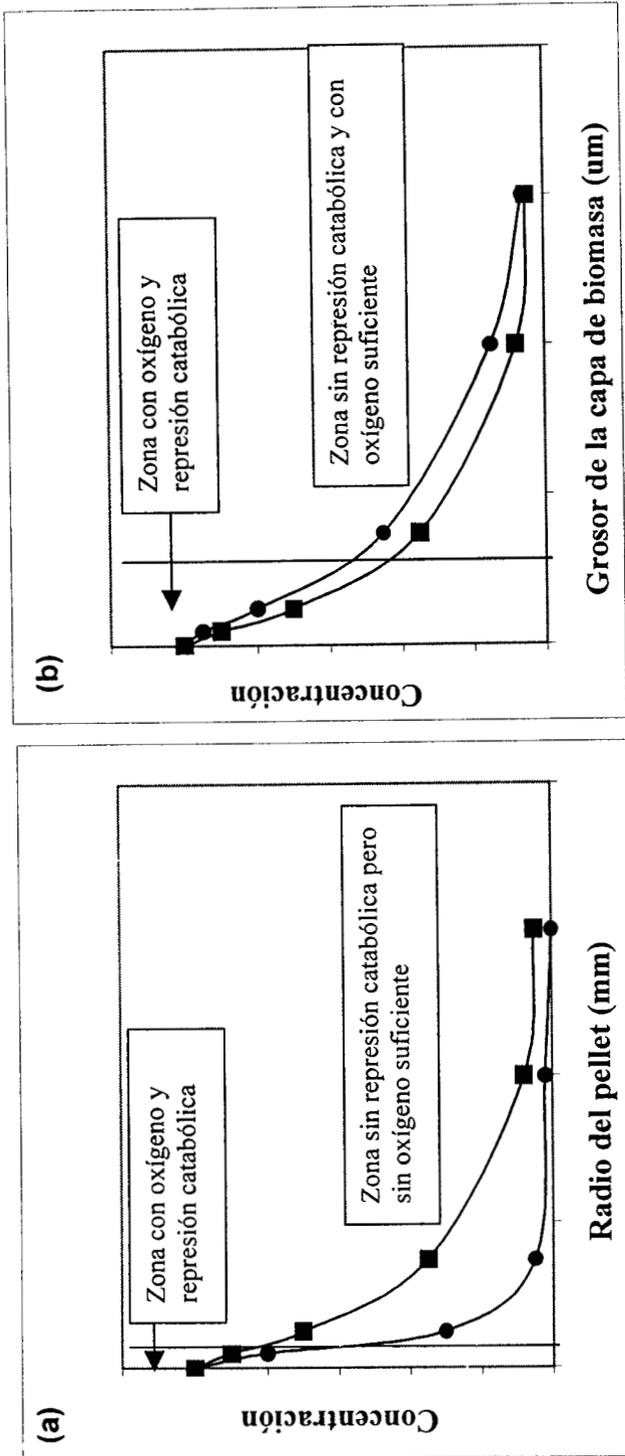


Figura 15. Gradientes hipotéticos de concentración para el oxígeno (●) y para la sacarosa (■), dentro de un pellet (a) y a través de una capa de micelio crecido sobre PUF (b).

Los valores de q_p también sustentan la primera hipótesis de esta investigación, ya que se observó en las fermentaciones donde hubo producción de exopectinasas que sus valores fueron muy parecidos (Tabla 7), por arriba de $100 \text{ UI g}^{-1}\text{X h}^{-1}$ (excepto para la FMS sin sacarosa y $A_w = 0.96$), lo cual nos dice que la velocidad de producción por unidad de biomasa es aproximadamente la misma, por lo tanto, nuevamente se observa que la cantidad de exopectinasas depende de la cantidad de biomasa producida. La FMS es más eficiente en presencia de sacarosa ya que no presenta represión catabólica.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la producción de exopectinasas.

Sistema	Aw	Medio	$Y_{E/X}^1$ (UI g ⁻¹ X)	q_p^2 (UI g ⁻¹ X h ⁻¹)	$Y_{X/S}^3$ (gX gS ⁻¹)	q_s^4 (gS g ⁻¹ X h ⁻¹)	Productividad (UI mL ⁻¹ h ⁻¹)	
							PR _O	PR _T
FMS	0.995	*McS	330	155	0.43	1.08	0.298	3.7
		*MsS	187	43	0.29	0.78	0.026	0.189
	0.96	McS	600	108	0.34	0.53	0.091	1.99
		MsS	1129	169	0.08	1.87	0.022	0.203
FML	0.995	McS	---	0	0.20	0.95	---	---
		MsS	534	117	0.29	0.75	0.071	0.515
	0.96	McS	---	0	0.19	0.35	---	---
		MsS	557	123	0.18	1.22	0.032	0.331

* McS = 40 g/L sacarosa, MsS = sin sacarosa.

¹ $Y_{E/X}$ = Rendimiento de enzima con respecto a la biomasa

² q_p = Tasa específica de formación de enzima

³ $Y_{X/S}$ = Rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato consumido

⁴ q_s = Tasa específica de utilización de sustrato.

Como se observa en la Tabla 7, el valor de $Y_{X/S}$, que se obtuvo en la FMS con sacarosa y $A_w = 0.995$ fue el valor más alto (aproximadamente el doble con respecto de los demás casos), mientras que la FMS y la FML sin sacarosa y $A_w = 0.995$, presentaron el mismo valor de 0.29 g X/g S , tales resultados nos ayudan a suponer que los rendimientos de biomasa están limitados por la disponibilidad de oxígeno en el medio de fermentación, ya que al aumentar la concentración de azúcares fermentables también se aumenta la demanda bioquímica de oxígeno, donde, por las características físicas de los sistemas, la FMS si puede abastecerse del oxígeno necesario, mientras que la FML no lo puede hacer, lo cual se refleja en menores rendimientos de biomasa. Por otro lado se observó que en todos los casos se agotó la fuente de carbono (ver Figura 10) y que la tasa de consumo (q_s) fue mayor en las fermentaciones sin sacarosa y A_w baja (Tabla 7), lo cual sugiere que el hongo consumió la fuente de carbono, pero no la incorporó como biomasa, y posiblemente se utilizó como energía de mantenimiento y en la síntesis de metabolitos intermediarios de las rutas productoras de energía, como pueden ser glicerol, ácido cítrico, ácido málico etc. Además se observó que al comparar la FMS y FML en condiciones de fermentación similares, las q_s fueron muy parecidas entre sí, lo cual nos indica que en ambos casos se asimiló a la misma velocidad la misma cantidad de sustrato por unidad de biomasa, pero fue mejor aprovechada en la FMS para síntesis de biomasa y de exopectinasas por la mayor disponibilidad de oxígeno.

En la Tabla 7 se muestran los valores de productividad observada o experimental y teórica de las exopectinasas ($\text{UI mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Se aprecia que el valor observado es aproximadamente diez veces menor que el valor teórico en todos los casos, debido posiblemente a la presencia de factores que destruyen las enzimas, principalmente proteasas o

inestabilidad a las condiciones de almacenamiento. El máximo valor de PR_0 fue el de la FMS con el medio McS y una $A_w = 0.995$; al bajar la A_w a esta fermentación, la productividad se redujo en un 70% aproximadamente, mientras que en las FMS con el medio MsS, los valores de obtenidos con una $A_w = 0.995$ y 0.96 resultaron ser 11 y 14 veces menores respectivamente que el obtenido con la misma A_w pero en presencia de sacarosa. En la FML sin sacarosa, también se redujo la productividad a la mitad aproximadamente al disminuir la A_w (la productividad de la FML con el medio McS fue cero, ya que no se presentó AVP).

Se observó que la FMS con sacarosa y $A_w = 0.995$ es el sistema más productivo, por la presencia de sacarosa la cual promueve un rápido crecimiento del hongo sin presentar represión catabólica, lo cual provoca una mayor cantidad de exopectinasas producidas debido a los altos valores de biomasa producida, ya que al comparar los sistemas sin sacarosa, se observó que la FML fue más productiva que la FMS, siendo casi tres veces más productiva la FML con $A_w = 0.995$ con respecto a la FMS a la misma A_w , y de un 30% más al bajar la A_w hasta 0.96 . Estos resultados también comprueban la hipótesis principal de este trabajo, ya que, los valores de AVP están relacionados con los valores de biomasa obtenidos en esas mismas condiciones. Por otro lado, se observó que al disminuir la A_w en todos los casos experimentados, la productividad bajó, lo cual también comprueba la segunda hipótesis de este trabajo.

8.2.8. Perfil de proteasas.

Como se puede apreciar en la Figura 16, en general la FMS bajo todas sus variantes mostró alrededor de tres veces menos niveles de proteasas comparado con la FML bajo las mismas condiciones de experimentación, además, la FMS con sacarosa y $A_w = 0.995$ mostró los niveles más bajos de proteasas, cercanos a cero durante las primeras 24 h de fermentación, mientras que la FML sin sacarosa produjo la máxima actividad de proteasas desde las primeras 18 h (más de 50 U/mL). Es importante hacer notar que la presencia de sacarosa en todas las fermentaciones provocó una disminución de hasta cinco veces la actividad de proteasas. Por otro lado, la disminución de la A_w provocó ligeros incrementos en los títulos de proteasas en todas las fermentaciones. Este resultado da más evidencias para comprobar la tercera hipótesis de este trabajo, indicando que la FMS produce menos proteasas contaminantes que la FML y que estas enzimas destructoras son menos abundantes cuando hay suficiente fuente de carbono.

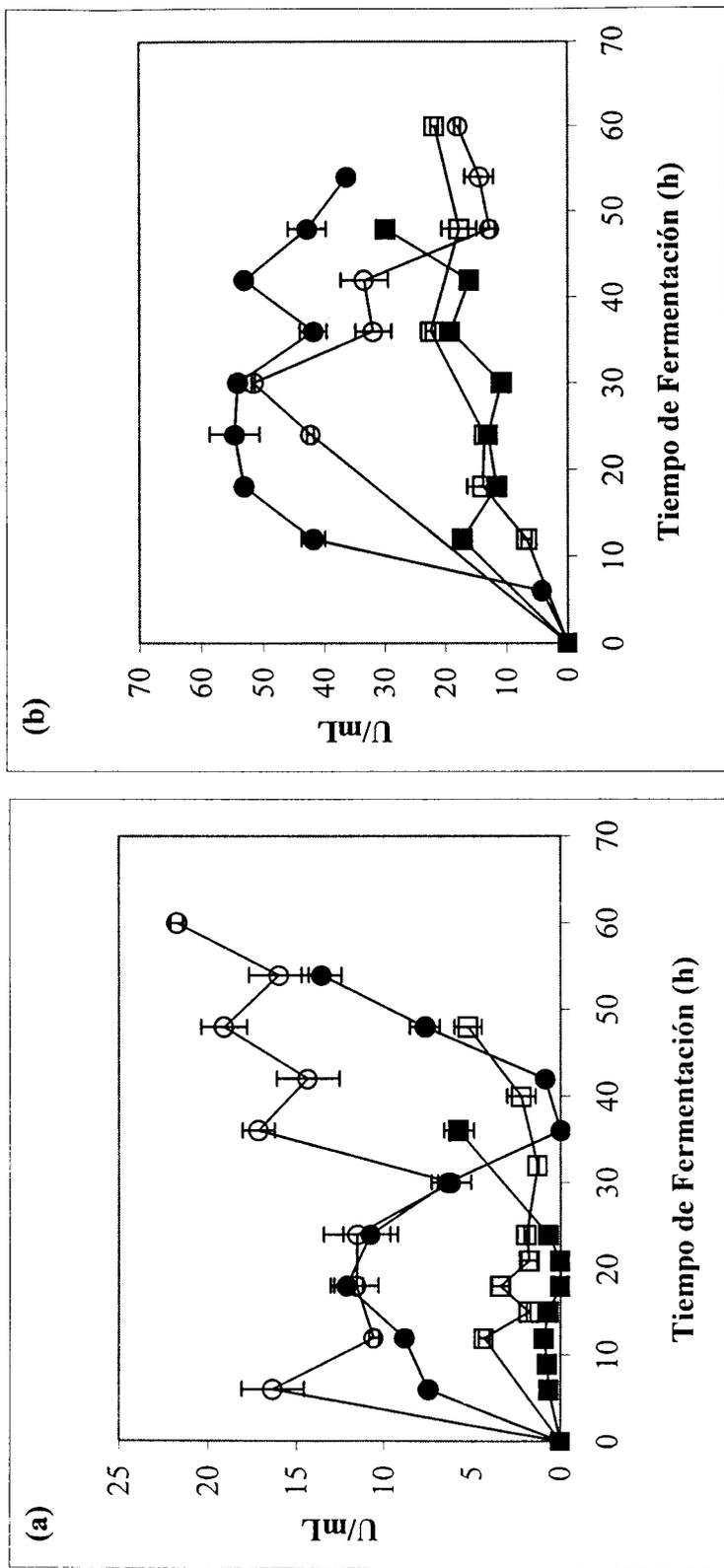


Figura 16. Perfil de proteasas extracelulares por *Aspergillus niger* C28B25 en Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por F'ML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.

Los intervalos en cada punto corresponden a las desviaciones estándar ($n = 3$). En algunos puntos, los intervalos fueron más pequeños que los símbolos.

8.2.9. Perfiles de pH.

Todos los perfiles de pH fueron similares en tendencia (Figura 17), ya que a las primeras horas existió un ligero incremento del pH, seguido de una disminución que se mantuvo durante las horas de la fase de crecimiento exponencial, después se presentó un aumento notorio asociado con la fase estacionaria y la etapa de esporulación del hongo. El descenso del pH, se puede relacionar con el crecimiento y el metabolismo primario del hongo, y la subida del pH en las últimas horas de fermentación se puede asociar con el momento de la esporulación y la posible lisis celular que libera el líquido citoplasmático, el cual tiene un valor de $\text{pH} \approx 7$. Estos cambios de pH podrían estar relacionados con los picos de actividad exopectinasa, a pH por debajo de 4.5, se podría inducir la síntesis de las exopectinasas, y a pH mayores se podría inhibir la síntesis. Los perfiles de pH y de proteasas parecen estar relacionados, mostrando el mismo comportamiento.

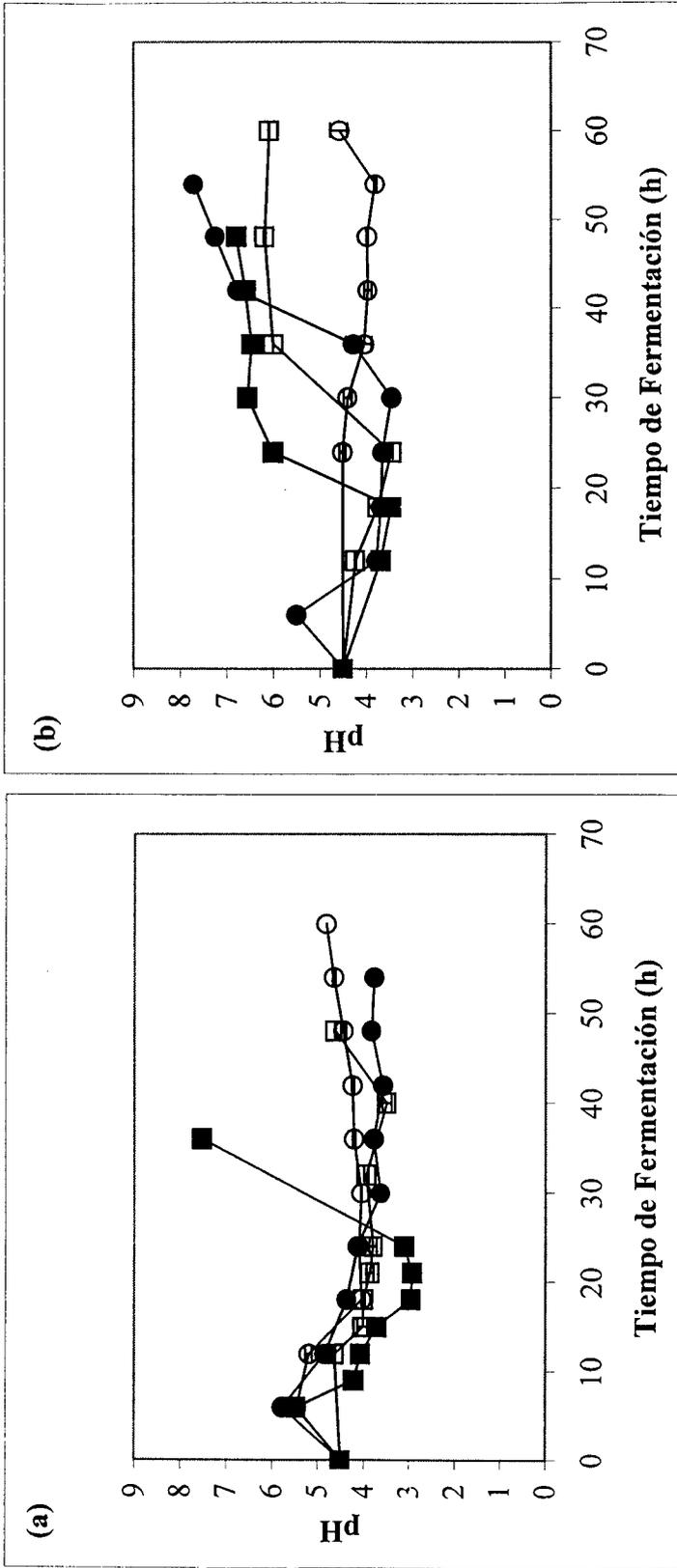


Figura 17. Perfiles de pH de los ECE obtenidos por *Aspergillus niger* C28B25 en Medio McS (a) y Medio MsS (b). Por FMS sobre PUF (■) y por FML (●). Los símbolos llenos indican $A_w = 0.995$ y los símbolos vacíos indican $A_w = 0.96$.

Los intervalos en cada punto corresponden a las desviaciones estándar ($n = 3$). En algunos puntos, los intervalos fueron más pequeños que los símbolos.

8.2.10. Isoelectroenfoque.

Se evaluaron los ECE dializados de la FMS con el medio McS a $A_w = 0.995$ y 0.96 , y de la FML con el medio MsS a $A_w = 0.995$ y 0.96 ; ya que fueron los extractos con mayor AVP. En la Figura 18 se muestran los cuatro cromatogramas de isoelectroenfoque obtenidos, en los cuales se puede apreciar que tanto la FMS como la FML con A_w de 0.995 (Figuras 18a y 18c respectivamente) presentaron dos picos perfectamente bien definidos, siendo el segundo mucho mayor que el primero. En el caso de las fermentaciones con $A_w = 0.96$ (Figura 18b y 18d) se presentaron zonas de actividad con picos poco definidos.

En los casos de $A_w = 0.995$, el primer pico de actividad (pequeño) tuvo un pI entre $pH = 3.13$ y 3.04 (FMS con McS y FML con MsS respectivamente), lo cual nos sugiere que se podrían tratar de las mismas especies químicas, independientemente del sistema de producción. Por otro lado, el segundo pico de estas fermentaciones presentó un pI entre $pH = 5.52$ y 5.66 (FMS con McS y FML con MsS, respectivamente), lo que también sugiere que estas especies químicas también podrían ser las mismas. Para el caso de las fermentaciones a $A_w = 0.96$, se puede observar en las Figuras 18b y 18d, (FMS con McS y FML con MsS respectivamente) que no existió una buena definición en la separación de los picos de actividad, pero los perfiles de pH se presentaron bien definidos. En ambas fermentaciones, se presentaron dos picos que de acuerdo con el pH al cual presentan su máximo valor de actividad corresponden al pI de los dos picos presentes en las fermentaciones con $A_w = 0.995$. Para la FMS el pI apareció a $pH = 3.58$ y para la FML a $pH = 3.07$. El segundo pico para la FMS fue a $pH = 5.61$ y para la FML a $pH = 5.97$; pero además de esos dos picos, se

presentaron zonas con actividad baja, lo cual nos hace sospechar de la presencia de otra u otras especies moleculares.

Es importante mencionar que aunque la FML se realizó con solo pectina y la FMS con sacarosa y pectina, se encontraron los mismos dos picos de actividad en todos los casos, y que al disminuir la A_w se presentaron cromatogramas con menor calidad de resolución, poniendo en evidencia la posible existencia de una tercer enzima o grupo de enzimas con actividad exopectinasa. Estos resultados sugieren que *A. niger* produce extractos con actividad de exopectinasas con propiedades fisicoquímicas diferentes al disminuir la A_w , y que la sacarosa no tiene ningún efecto sobre esas características.

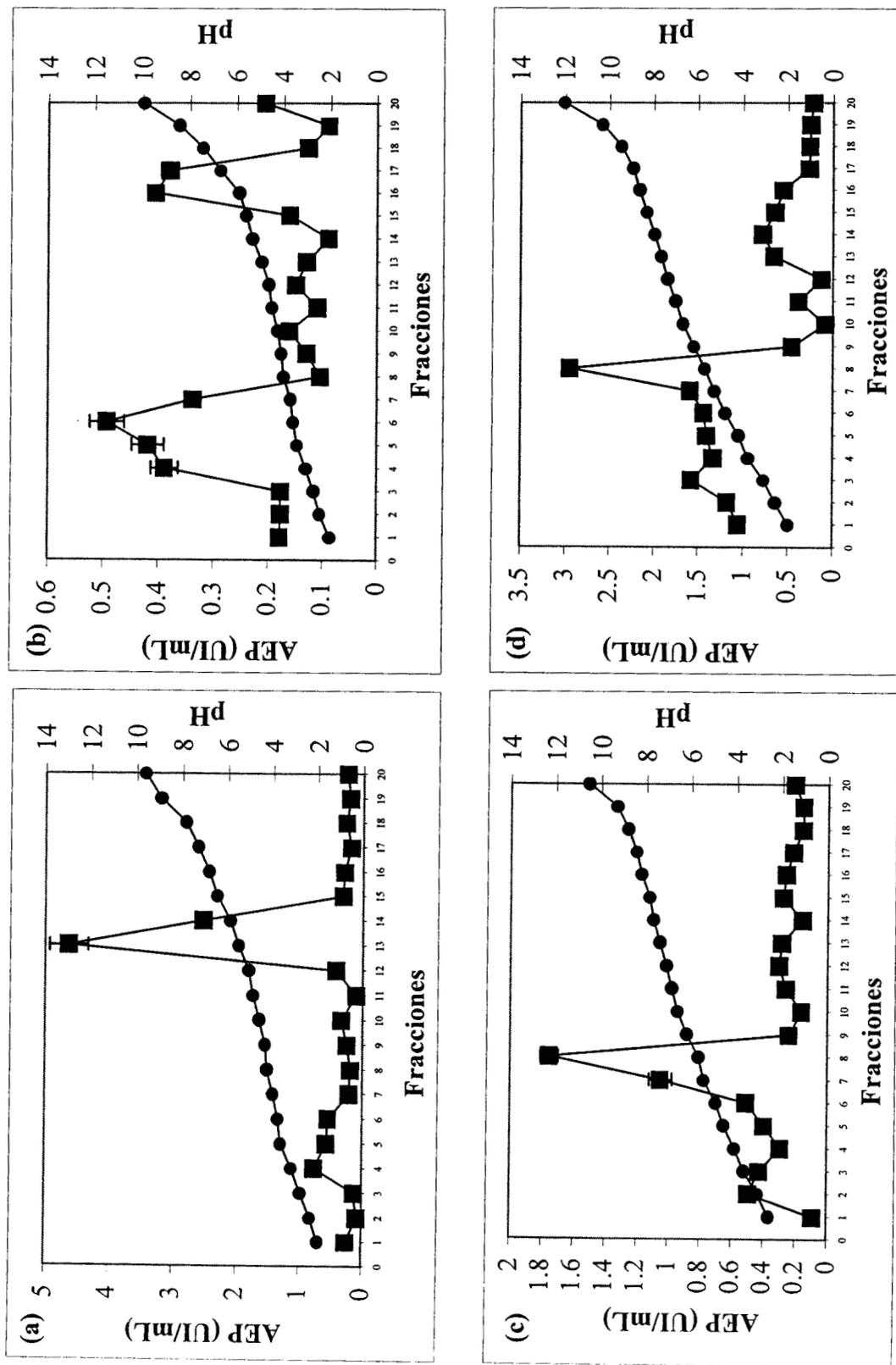


Figura 18. Cromatogramas de los isoelectroenfoques de los ECE obtenidos por FMS, McS Aw = 0.995 (a); FMS, McS Aw = 0.96 (b); FML, MsS Aw = 0.995 (c) y FML, MsS Aw = 0.96 (d). AVP (■), perfil de pH (●). Los intervalos en cada punto corresponden a las desviaciones estándar (n = 3). En algunos puntos, los intervalos fueron más pequeños que los símbolos.

8.2.11. Zimografía.

Los zimogramas representan una herramienta muy útil para caracterizar los ECE con actividad, ya que solo se harán evidentes las proteínas con actividad enzimática de interés, dando un panorama de las posibles isoenzimas o grupo de ellas que se presentan en cada sistema de fermentación, con la posibilidad de comparar en número y posición (peso molecular) de las enzimas. Como se observa en la Figura 19, en todos los casos evaluados en esta investigación (excepto para la FML en presencia de sacarosa ya que no mostró actividad), se presentaron dos bandas de actividad pectinasa (sin posibilidad de diferenciar entre endo- y exopectinasas) en la misma posición sobre el gel.

De acuerdo con los R_f de los marcadores utilizados, se determinó que el peso molecular de la banda más pesada fue de aproximadamente 51650, y de la otra fue de 33650 daltones. Para corroborar lo encontrado en los anteriores zimogramas, se decidió trabajar con los ECE de mayor AVP tanto de la FMS como de la FML, y se obtuvo el patrón que se muestra en la Figura 20, donde podemos observar que se mantienen dos bandas con actividad de hidrolasa y en la misma posición para todas las condiciones en que se obtuvieron tales ECE. Por otro lado, al trabajar con ECE con más de 20 días de almacenamiento en refrigeración, el patrón zimográfico mostró cambios, ya que la banda de mayor peso desapareció gradualmente, es decir, con poco tiempo de almacenamiento perdió intensidad, pero con un tiempo de almacenamiento más prolongado desapareció por completo, al mismo tiempo se presentó otra banda de peso ligeramente menor a la banda ligera presente en ECE frescos.

En la Figura 21 se puede apreciar el perfil zimográfico de los ECE almacenadas por aproximadamente 25 días a temperatura de refrigeración, donde se puede apreciar que la banda de 51 kDa desapareció, pero otra de aproximadamente 29 kDa apareció, lo cual nos sugiere que la banda más pesada podría ser un dímero de la isoforma más ligera, el cual por acción posiblemente de proteasas o por las condiciones de almacenamiento (pH y temperatura) se disocia, manteniendo actividad de exopectinasa, pero en menor proporción. En las Figuras 19 y 20, se puede observar que existe similitud entre los patrones de los zimogramas, con esto podemos decir que no existen diferencias en número y posición sobre el zimograma de las pectinasas dadas por el sistema de fermentación ya sea FMS o FML, o por el estrés que se pueda observar al hongo dado por los diferentes niveles de A_w . La sacarosa no presentó ningún efecto sobre el número y peso molecular de las pectinasas (verificado en la FMS, ya que en la FML no se pudo porque se presentó represión catabólica).

Debido a que en todos los ECE frescos obtenidos bajo todas las variantes de esta investigación, los patrones zimográficos fueron similares, se decidió emplear en la FMS con medio McS y $A_w = 0.995$ como inductores a pectinas de diferentes grados de metoxilación para ver su efecto sobre el número y peso molecular de las pectinasas producidas, donde se encontró (Figura 22) que el perfil es exactamente el mismo en todos los casos y que además corresponden a los obtenidos en los anteriores experimentos. En los ECE evaluados para la realización de los zimogramas no se detectó en ningún caso la presencia de actividad de esterases.

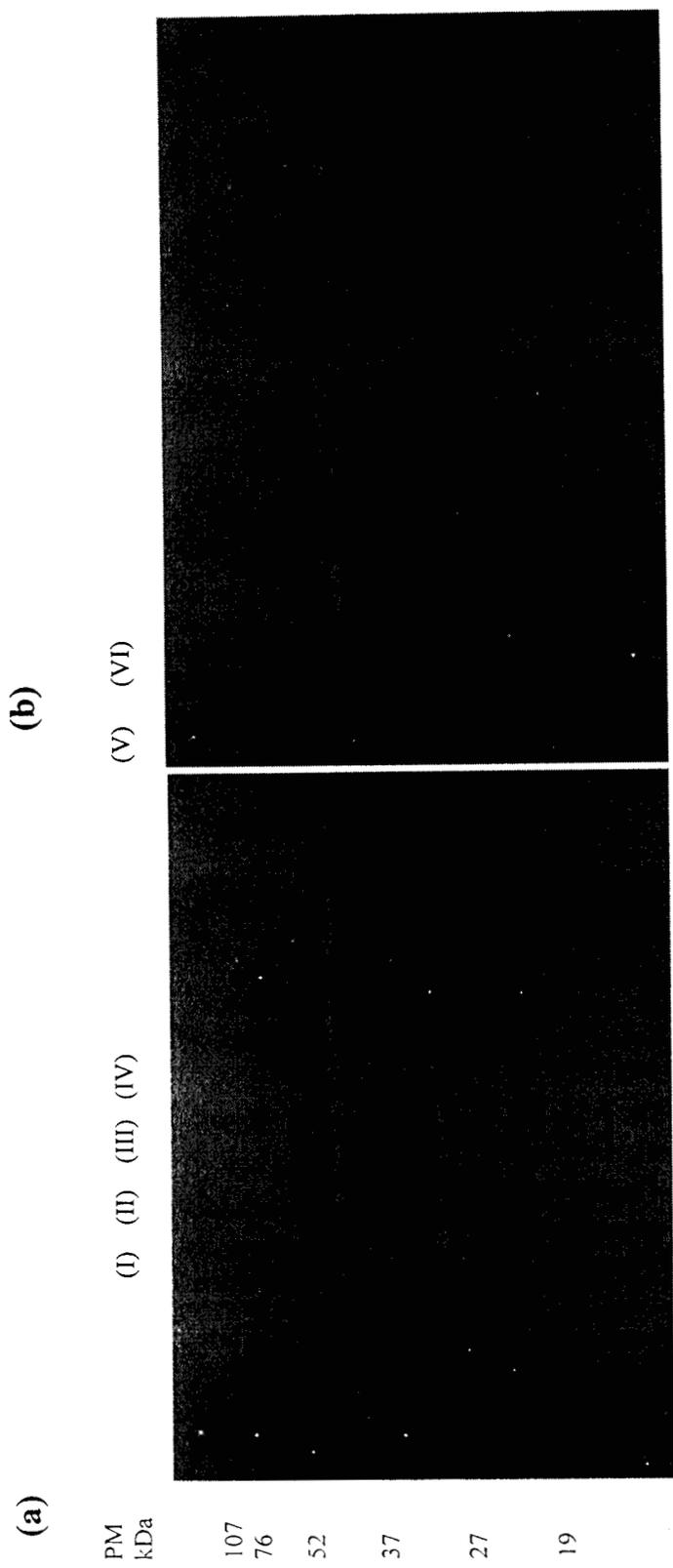


Figura 19. Zimogramas obtenidos por FMS (a) y FML (b). Con el medio McS (I y II) y con el medio MsS (III, IV, V y VI). A una $A_w = 0.995$ (I, III y V) y $A_w = 0.96$ (II, IV y VI).

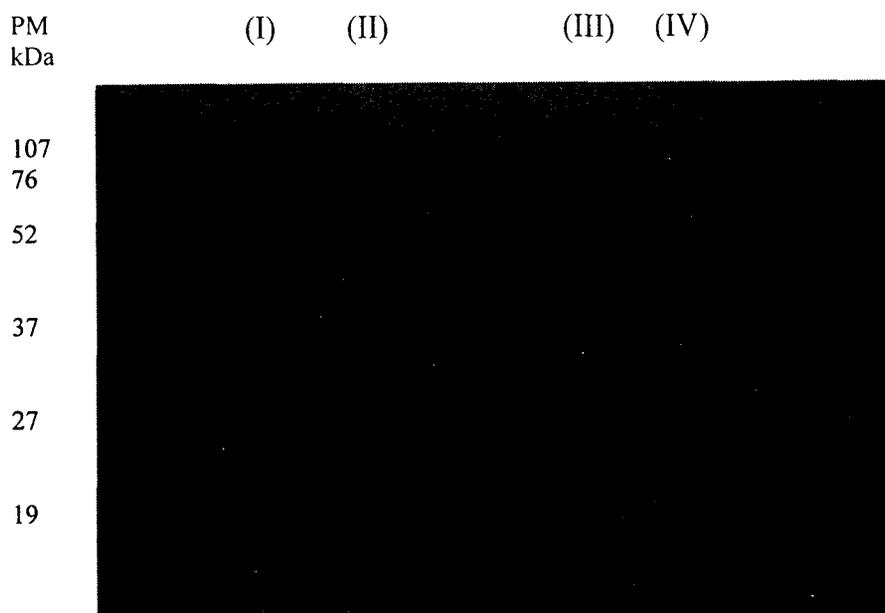


Figura 20. Zimograma de los ECE obtenidos por FMS con el medio McS (I y II) y por FML con el medio MsS (III y IV). Los números impares fueron obtenidos a una A_w de 0.995 y los números pares a una A_w de 0.96.

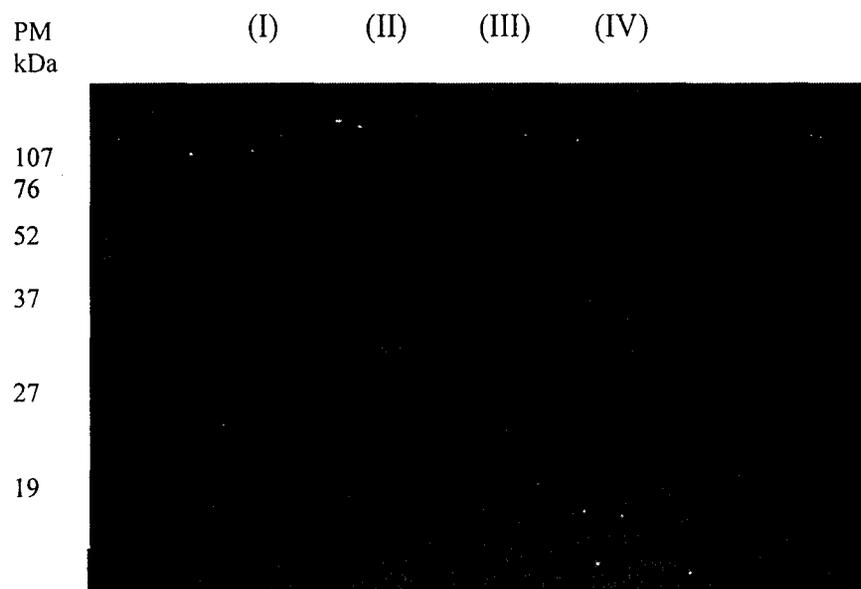


Figura 21. Zimograma de los mismos ECE de la Figura 18 después de un periodo de almacenamiento en refrigeración. El orden de los ECE es el mismo que en la Figura anterior.

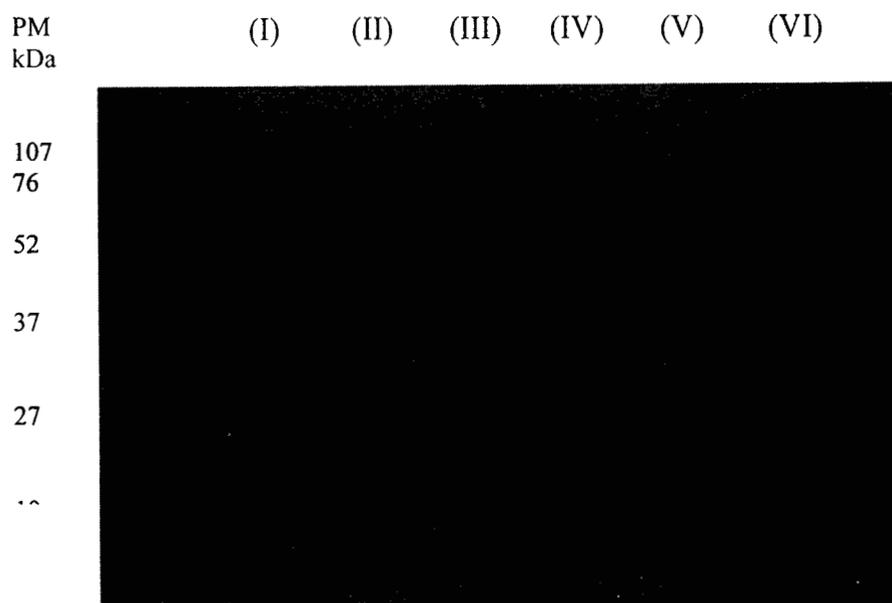


Figura 22. Perfil zimográfico de los ECE obtenidos por FMS sobre PUF con pectinas de diferente grado de metoxilación como inductor. 0% (I), 8% (II), 31% (III), 68% (IV), 93% (V) y pectato extraído de la pulpa de café (VII).

9. DISCUSIÓN.

Existen varios reportes donde se ha comparado la FMS con la FML (Trejo-Hernández *y col.*, 1991; Antier *y col.*, 1993; Solís-Pereira *y col.*, 1993; Acuña-Argüelles *y col.*, 1995; Minjares-Carranco *y col.*, 1997), pero principalmente en cuanto a producción de metabolitos como enzimas, pero dado que en la FMS se han utilizado soportes biodegradables, la composición del medio de cultivo resultaba compleja, haciendo muy difícil la caracterización de la FMS y su comparación con la FML. La mayoría de los autores han encontrado que existe mayor productividad de las enzimas obtenidas por FMS en comparación con las obtenidas por FML, pero dado a la complejidad de los soportes utilizados en la FMS, no se había podido hacer una comparación en cuanto a producción de biomasa, así como de cantidad, variedad y propiedades de las enzimas producidas. Si bien es sabido que existen diferentes métodos para cuantificación de biomasa, en la FMS sobre soportes biodegradables resultaba complicado cuantificarla, además se necesitaba tener un método de cuantificación igual para ambos sistemas de fermentación y que además fuera un método directo y que cuantificara tanto células viables como no viables. Trejo-Hernández *y col.*, (1991), determinó la cantidad de biomasa producida a lo largo de una fermentación sólida sobre bagazo de caña, por cuantificación de ácidos nucleicos, la cual es una técnica indirecta y poco representativa de la cantidad real de biomasa, ya que el soporte sobre el cual crecía el microorganismo interfería en los resultados aportando sus ácidos nucleicos. En esta investigación se utilizó un soporte no biodegradable para la FMS, donde *Aspergillus niger*, creció favorablemente, y además, se pudo cuantificar la biomasa por peso seco, técnica que es directa y que reporta la cantidad total de biomasa producida (viables y no viables). En la FML también se determinó la biomasa

producida por peso seco, lo cual permite hacer comparaciones minimizando los errores experimentales. Por otro lado, al poder trabajar con soportes inertes, la composición del medio de cultivo sintético se considera completamente constante al inicio de las fermentaciones y da la posibilidad de trabajar con el mismo medio tanto en la FMS como en la FML, también se favorece la caracterización y comparación de la fisiología del microorganismo utilizado, como son la velocidad específica de crecimiento, los rendimientos de biomasa, los rendimientos de enzimas, entre otros.

En esta investigación se lograron determinar parámetros cinéticos de crecimiento de *Aspergillus niger*, así como parámetros que describen la producción de exopectinasas en la FMS como en la FML. Cuando el hongo se cultivó con el mismo medio de cultivo que contenía sacarosa además de pectina (McS), y a la misma A_w (0.995) pero en diferentes sistemas (FMS o FML), se observó que en la FMS, la velocidad de crecimiento es mayor que en la FML, además la cantidad de X_{max} también fueron mayores con poco más del doble de biomasa producida, pero cuando se trabajó con el medio sin sacarosa (MsS) y A_w de 0.995 no existió diferencia significativa entre las velocidades específicas de crecimiento y entre los valores de X_{max} . Lo anterior sugiere que existen condiciones (bajos niveles de azúcares) en las cuales, no existe diferencia en la capacidad del hongo para asimilar los azúcares y utilizar cierta cantidad en la producción de biomasa independientemente del sistema de fermentación, pero al incrementar la cantidad de azúcares al medio de fermentación, la demanda bioquímica de oxígeno también aumenta, presentándose el efecto Crabtree, el cual consiste en la inhibición del metabolismo aerobio por un exceso en la concentración de azúcares y una baja disponibilidad de oxígeno, principalmente porque la solubilidad del oxígeno en el agua es 50

veces menor en comparación con la concentración disuelta en el aire, además se encuentran en contacto con la superficie del soporte sólido donde se está creciendo *Aspergillus niger*. Además, dependiendo de las condiciones de fermentación, la morfología de *A. niger* será diferente, ya que en la FMS el crecimiento se presenta en forma filamentosa y generalmente en la FML crecerá en forma de pellets. Romero-Gómez (datos no publicados) observó por microscopia, que el crecimiento de *A. niger* sobre la PUF, fue de forma filamentosa y creció en una sola capa que posteriormente se orientó hacia los espacios huecos formando una red. La capacidad de crecimiento del hongo dependió de la gran área superficial con que se dispone en la PUF, y dado a que el hongo creció en una sola capa embebida de una pequeña capa de medio líquido no presentó problemas con la difusividad del oxígeno, favoreciendo un crecimiento rápido con la máxima utilización del sustrato asimilado en la síntesis de biomasa y de exopectinasas. Por otro lado, El-Enshasy *y col.* (1999) observaron que en la FML, la morfología de los hongos dependerá de la composición del medio de cultivo de las condiciones de agitación principalmente, ya que el tamaño de los pellets es inversamente proporcional a la velocidad de agitación del medio, además, al disminuir el tamaño de los pellets se incrementó la densidad micelial y se favoreció el transporte de los nutrientes hacia las partes internas del pellets incrementando los rendimientos de enzimas (glucosa oxidasa). También observaron que la formación de los pellets se da en dos pasos; 1) la agregación de esporas libres hasta formar un agregado que germina entrelazando sus hifas, y 2) la agregación de varios agregados primarios hasta alcanzar el tamaño final dependiendo de la fuerza de agitación del medio. Así también Cui *y col.* (1998) observaron que la morfología de los hongos en la FML depende principalmente de la intensidad de la fuerza mecánica aplicada, y

que el incremento en la cantidad de oxígeno disuelto influye en aumentando la cantidad de biomasa por área superficial del pellet.

Al observar que la morfología del crecimiento de *A. niger* dependerá de las condiciones de cultivo, se verá reflejado en un metabolismo diferente. Doohyun y Chang-Sun (1999) observaron que los factores que inducen la formación de pellets también incrementan la hidrofobicidad de la pared celular de *A. niger*, por lo que se disminuye la capacidad de transporte del oxígeno y en general de las moléculas polares a través del pellet. También se ha observado que los coeficientes de difusión de los sustratos a través de los pellets son más o menos constantes independientemente de su concentración inicial pero se disminuye con el incremento del diámetro del pellet (Iwahori y col., 1995). Existen diversos trabajos donde se ha observado que al incrementar el tamaño del pellet se disminuyó la producción de metabolitos de interés, por ejemplo de penicilina (Moore y Bushell, 1997), de fitasa (Papagianni y col., 1999), de glucosa oxidasa (El-Enshasy y col., 1999), etc.

Con los estudios que se han hecho en cuanto a la relación que existe entre la morfología del hongo y su capacidad de asimilar los nutrimentos y de crecer, podemos decir que la FMS es más eficiente productora de exopectinasas que la FML, porque el área superficial con que cuenta el hongo para crecer es mucho mayor en la FMS, lo que facilita el crecimiento del hongo en una sola capa o red disminuyendo los problemas de difusividad del oxígeno hacia la biomasa, lo que favorece un metabolismo completamente aerobio con velocidades de crecimiento, rendimientos de biomasa y rendimientos de exopectinasas mayores que en la FML, donde el crecimiento se presentó en forma de pellets y se presentaron

problemas de difusión de oxígeno en las partes más internas del pellet, donde el metabolismo se modificó con respecto del que se presentó en las capas más externas del pellet. Por tal razón el crecimiento fue más lento y la biomasa producida fue menor, ya que aunque se consumió todo el sustrato, se favoreció la síntesis de metabolitos intermediarios como podría ser glicerol, ácido cítrico, etc., en lugar de la síntesis de biomasa y de exopectinasas.

El hecho de que la FMS no se encontró limitada por disponibilidad de oxígeno, el crecimiento del hongo fue más favorable que en la FML. En la FMS hay más oxígeno disponible, y *A. niger* puede tener una fisiología equilibrada cuando se agrega sacarosa, por lo tanto en menor tiempo produce más biomasa, y como no hay represión catabólica en FMS, la $Y_{E/X}$ resulta mucho mayor que en FML. Cuando no se agrega sacarosa a la FML, no hay represión catabólica, pero *A. niger* crece mucho menos y por eso se produce menos exopectinasa, aunque el $Y_{E/X}$ y X_{max} sean similares en la FMS y FML bajo estas condiciones.

Por lo tanto, la ventaja de la FMS solo se aprovecha cabalmente cuando se agrega sacarosa a un alto nivel. Esto explica la causa de la mayor productividad en la FMS; lo que aún no se demuestra es por qué no hay represión catabólica en la FMS con sacarosa, pero con los conocimientos de las diferencias fisicoquímicas entre ambos sistemas de fermentación se supone que en la FML existen problemas de difusión del oxígeno dentro de los pellets, por lo que el metabolismo del hongo no es eficiente, y en la parte externa donde se encuentra el micelio laxo, la concentración de oxígeno y sacarosa son elevados provocando la represión catabólica. Por otro lado, en la FMS, no presenta problemas graves de difusión del oxígeno,

por lo que en la zona de baja concentración de sacarosa, existe suficiente oxígeno para crecer sin represión catabólica.

Acuña-Argüelles *y col.* (1994), evaluaron 3 depresores de A_w y resultó ser el más eficiente el etilenglicol, pues encontraron que la actividad volumétrica de pectinasas de *Aspergillus niger* CH4 por FMS disminuyó cuando la A_w se llevó hasta valores de 0.90. Grajek y Gervais (1987) reportaron que la actividad poligalacturonasa producida por *Trichoderma viride* por FMS decreció hasta cero cuando la A_w se bajó hasta 0.96. En esta investigación, la depresión de la A_w , también provocó disminución de la velocidad de crecimiento, y un poco en los valores de X_{max} de todas las fermentaciones realizadas, pero el efecto mayor que tuvo fue sobre la producción de exopectinasas en la FMS con el medio McS, ya que la actividad se disminuyó aproximadamente 3.7 veces (Tabla 6), mientras que en los casos donde se utilizó el medio MsS tanto en la FMS como en la FML, el efecto de la depresión de A_w fue mínimo en cuanto a la actividad exopectinasa.

En cuanto a la producción de las exopectinasas, se encontró que la FMS fue más eficiente que la FML, comparadas con el mismo medio de cultivo y con la misma A_w . Se encontró que la sacarosa tiene diferentes efectos, dependiendo del sistema de fermentación en el que se trabaje, pues en la FMS actuó como un promotor de la actividad exopectinasa, mientras que en la FML actuó como un represor de la actividad exopectinasa, inhibiéndola totalmente. Con estos resultados se confirma lo encontrado por otros autores (Solís-Pereyra *y col.*, 1996; Díaz-Godínez, 1997), los cuales observaron que la FMS es más resistente a la represión catabólica que la FML, además que existen ciertos niveles de azúcares que además

promueven el rápido crecimiento de los microorganismos, trayendo como consecuencia una mayor producción de enzimas exopectinasas.

Las enzimas proteasas, que en esta investigación son productos no deseados en los ECE, ya que deterioran a las enzimas de interés, se presentaron en menor proporción en la FMS, y además la sacarosa fue un componente importante, ya que en las fermentaciones con sacarosa, los niveles de proteasas fueron menores, independientemente del sistema de fermentación (FMS ó FML). Fang y col. (1998), encontraron que los niveles de proteasas extracelulares de *Aspergillus niger* disminuyeron cuando el hongo se inmovilizó, lo cual apoya nuestros resultados, ya que en la FMS con sacarosa y Aw elevada, los niveles de proteasas fueron cercanos a cero en las primeras horas de fermentación. Se sugiere que las proteasas se excretan en mayor proporción como resultado de un estado de estrés del hongo, como puede ser una limitación de oxígeno en la FML o ausencia de azúcares fácilmente asimilables, ya que la cantidad de nitrógeno en todas las fermentaciones no fue limitante, por lo que, las proteasas no se excretaron con la finalidad de reutilizar fuentes nitrogenadas como serían las proteínas excretadas.

Existen diversos reportes en los cuales se identificaron varias isoformas de pectinasas, por ejemplo, Anjana y Appu (1996) lograron purificar y caracterizar las pectinasas producidas por *Aspergillus carbonarius*, pero no lograron saber si se trataba de un mismo gen, solo que con modificaciones postranscripcionales o de diferentes genes; sus enzimas se encontraron con pesos moleculares entre 40 y 60 kDa y pH óptimos de 4.0-4.3. Por otra parte, Caprari y col. (1993), reportaron la secuencia de cuatro formas activas de pectinasas de *Fusarium*

moniliform, las cuales resultaron provenir del mismo gen, con diferencias en el grado de glucosilación, sin embargo, Bussink y col. (1991, 1992), reportaron que las poligalacturonasas de *Aspergillus niger* son codificadas por una familia de diferentes genes. En esta investigación, con el análisis de los cromatogramas del isoelectroenfoque, se puede decir que la posibilidad de que existan al menos dos especies de exopectinasas es muy alta, ya que se presentaron claramente dos picos de actividad en los cuatro casos analizados por isoelectroenfoque. Con esto se puede decir que existen dos formas de exopectinasas activas extracelulares de *Aspergillus niger* C28B25 ya sea por FMS o por FML, con pI de 3.1 y 5.5-5.7. Dado que en los zimogramas no se puede hacer una diferenciación de las enzimas endo de las exopectinasas, solo podemos hablar de dos formas con actividad hidrolítica cuyos pesos moleculares son de 51 y 33 kDa, además, se observó que con el añejamiento de los ECE, la banda más pesada desapareció dando origen a otra de aproximadamente la mitad de peso molecular, lo cual sugiere que la banda pesada podría estar formada por dos formas activas de pectinasas de igual peso molecular.

Se han hecho estudios en donde se han observado que las enzimas producidas por fermentación, varían en sus propiedades fisicoquímicas y cinéticas dependiendo del sistema de producción, ya sean en medio sólido o en medio líquido, y han postulado que tales diferencias podrían estar dadas por diferencias químicas de las enzimas, pero debido a que las FMS las han realizado sobre soportes biodegradables, los cuales resultan ser un medio de cultivo muy complejo y no caracterizado, los resultados no se pueden comparar del todo con los resultados obtenidos en las FML; por ejemplo, Acuña-Argüelles y col. (1995), evaluaron las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de tres enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* producidas por

FMS y FML; obtuvieron, mayores productividades de actividad exopectinasa en la FMS; todas las pectinasas producidas por FMS fueron más estables a valores extremos de pH y temperatura, además encontraron a través de SDS-PAGE, que el ECE producido por FMS, presentó el mismo número de bandas que el producido por FML, pero con algunas diferencias de posición sobre el gel, pero, debido a que no hicieron zimografía o purificación y caracterización de las enzimas, solo pudieron suponer que tales diferencias podrían asociarse con cambios en la composición polipeptídica de las enzimas (existencia de diferentes genes) o a cambios en los niveles de glicosilación en las enzimas. Otros autores también han reportado que algunas propiedades fisicoquímicas y patrones electroforéticos pueden ser relacionados con los cambios en los niveles de glicosilación de las enzimas; además se ha mostrado que la glicosilación incrementa la termoestabilidad de las enzimas (Acuña-Argüelles *y col.*, 1995). Otro trabajo, el cual mostró evidencias sobre las diferencias fisicoquímicas de las pectinasas producidas por FMS y por FML fue el de Minjares-Carranco *y col.*, (1997), en donde encontraron el mismo número de pectinasas y en la misma posición sobre el gel, solo que con diferencias en cuanto a termoestabilidad. Tales antecedentes muestran que es necesario contar con zimografía y otros métodos complementarios para poder hablar de la naturaleza química y del número de pectinasas producidas en ambos sistemas de fermentación. En esta investigación se logró optimizar la técnica de zimografía para pectinasas, en la cual se hacen evidentes bandas perfectamente separadas y definidas, por lo que fue posible comparar en número y posición sobre el gel de las pectinasas producidas en la FMS y en la FML, se observó que no existen diferencias en el número y peso molecular de las pectinasas, por lo que pensamos que lo observado por otros autores está dado por factores (inductores) presentes en los soportes biodegradables y que confieren diferencias a las enzimas producidas.

10. CONCLUSIONES.

1. Se confirmó que la FMS es un sistema más productivo de exopectinasas con respecto a la FML, si en el medio se agregan altos niveles de azúcar.
2. Se confirmó que en la FMS no se produce la represión catabólica por la adición de azúcares al medio de cultivo en presencia del inductor.
3. Se demostró que la mayor productividad de la FMS es debida a una mayor producción de biomasa y no a un mayor rendimiento ($Y_{E/X}$) de la enzima por unidad de biomasa.
4. Se demostró que la depresión de la A_w hasta 0.96 tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de *A. niger* pero no de la producción de exopectinasas, evaluadas como $Y_{E/X}$.
5. Se demostró que en la FMS se disminuyen notablemente la producción de proteasas indeseables durante la producción de exopectinasas y que ello se minimiza por la adición de sacarosa.
6. Se demostró que se producen extractos con actividad de exopectinasas con propiedades fisicoquímicas diferentes, si se cambia la A_w de 0.995 hacia 0.96.

7. No se logró encontrar diferencias zimográficas en la producción de pectinasas que estuvieran asociadas a las condiciones de cultivo en líquido o sobre espuma de poliuretano.
8. Se demostró que las isoformas de pectinasas presentes en los extractos enzimáticos cambian al menos en peso molecular durante su almacenamiento.
9. Se comprueba la utilidad de la FMS sobre espuma de poliuretano como sistema para el estudio de la producción de enzimas de organismos crecidos sobre un soporte sólido poroso.

11. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.

Con los estudios realizados en esta tesis, se lograron establecer las condiciones de producción de exopectinasas por FMS, demostrando la causa por la que es más productiva la FMS con respecto a la FML, por lo que se sugieren experimentos donde se evalúen otras cepas para determinar si el comportamiento sobre la PUF es general e independiente de la cepa, y posteriormente probar cepas mejoradas genéticamente con elevada capacidad de producción de enzimas y tratar de alcanzar niveles de producción a escala industrial. También se podrían evaluar cepas para la producción de diferentes enzimas bajo las mismas condiciones.

En cuanto a la demostración de que los problemas de difusión del oxígeno son la causa de las diferencias en cuanto a crecimiento del hongo, se sugiere: 1) realizar FML con 40 g/L de sacarosa y pectina, incrementando la velocidad de agitación y el K_{La} , en el medio líquido, con lo cual esperaríamos aumentar el crecimiento del hongo y 2) realizar FMS sobre PUF con el mismo medio de cultivo cambiando la concentración de los gases (disminuyendo la cantidad de oxígeno), para observar una disminución en la velocidad de crecimiento y en la X_{max} del hongo.

Para demostrar la causa de la represión catabólica, podrían realizarse FML con bajos niveles de sacarosa (niveles que en matraz agitado provocan represión catabólica) en fermentadores aireados por burbujeo con K_{La} grandes y una elevada agitación para promover la formación de un número mayor de pellets con diámetros menores, consiguiendo menos problemas de difusividad del oxígeno y esperando evitar la represión catabólica.

12. BIBLIOGRAFÍA.

Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G. y Favela Torres E. (1994).

Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* on solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 16 (1):23-28.

Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G. y Favela-Torres E. (1995).

Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43:808-814.

Aguilar G. y Huitron C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic of

Aspergillus sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme and Microbial Technology*. 9:690-696.

Alexopoulos C.J. y Mims C.W. (1996) *Introductory Mycology*. Third Edition. John Wiley and

Sons, Inc. USA. 291-295.

Antier P., Minjares A., Roussos S., Raimbault M. y Viniegra G. (1993). Pectinase-

hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme and Microbial Technology*. 15:254-260.

- Baduí D.S. (1990). Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana. Segunda edición, México D.F. 105-109.
- Bailey M.J. y Pessa E. (1990). Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme and Microbial Technology*. 12: 266-271.
- Billmeyer F.W. (1978). Ciencia de los polímeros. España. Editorial Reverté. 458-460, 483, 484.
- Boccas F., Roussos S.S., Gutierrez M., Serrano L. y Viniegra-González G. (1994). Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: Selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *J Food Science Technology*. 31 (1):22-26.
- Bradford M.M. (1977). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248.
- Brock T.D., Smith D.W. y Madigan M.T. (1987). Microbiología. 4a. ed. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana. México. 118-123.
- Budiatman S. y Lonsane B.K. (1987). Cassava fibrous waste residue; a substrate to wheat bran in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 9 (8): 597-600.

Bussink H.J., Brouwer K.B., de Graaff L.H., Kester H.C. y Visser J. (1991). Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. *Current Genetic* 20 (4):301-307.

Bussink H.J., Buxton F.P., Fraaye B.A., de Graaff L.H. y Visser J. (1992). The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur J Biochemistry*. 208(1):83-90.

Caprari C., Bergmann C., Migheli Q., Salvi G., Albersheim P., Darvill A., Cervone F. y De Lorenzo G. (1993). *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 43:453-462.

Castilho LR., Alves TLM. y Medronho RA. (1999). Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. 34 (2):181-186.

Castilho LR., Medronho RA. y Alves TLM. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 71 (1):45-50.

Charley H. (1987). *Tecnología de Alimentos*. Ed. Limusa. México. 643-645, 728-737.

- Crotti LB., Terenzi HF., Jorge JA. y Polizeli ML. (1998a). Characterization of galactose-induced extracellular and intracellular pectolytic activities from the *exo-1* mutant strain of *Neurospora crassa*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 20 (3-4):238-243.
- Crotti LB., Terenzi HF., Jorge JA., de Lourdes M. y Polizeli ML. (1998b). Regulation of pectic enzymes from the *exo-1* mutant strain of *Neurospora crassa*: effects of glucose, galactose, and galacturonic acid. *J Basic Microbiology*. 38(3):181-188.
- Crotti LB., Jabor VA., Chellegatti MA., Fonseca MJ. y Said S. (1999). Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. *J Basic Microbiology*. 39(4):227-235.
- Cruickshank H.R. y Wade G.C. (1980). Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 107:177-181.
- Cui YQ., Van der Lans RGJM. y Luyben KCAM. (1998). Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 57(4):409-419.
- Díaz-Godínez G. (1997). Producción de exopoligalacturonasas por fermentación en medio sólido utilizando como soporte espuma de poliuretano. Tesis de Maestría, Departamento de Biotecnología UAM-I, México.

- Doohyun R. y Chang-Sun C. (1999). Surface thermodynamics of pellet formation in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*. 21(2):97-100.
- Dosoretz C., Chen H-C. y Grethlein H. (1990). Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (2): 395-400.
- Dosoretz C., Dass B., Reddy A. y Grethlein H. (1990). Protease-mediated degradation of ligninperoxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (11): 3429-3434.
- Durand A. y Blachere. (1988). Solid state fermentation. En: Raimbault, M. (Ed.). *Solid-state Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials (Proceedings of the Seminar)*. ORSTOM. Montpellier, Francia. 83-89.
- El-Enshasy H., Hellmuth K. y Rinas U. (1999). Fungal Morphology in Submerged Cultures and Its Relation to Glucose Oxidase Excretion by Recombinant *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 81(1):1-11.
- Fang L., Wenqing L., Darin R., Tingyue G. y Murray M-Y. (1998). Inhibition of extracellular protease secretion by *Aspergillus niger* using cell immobilization. *Biotechnology letters*. 20 (6):539-542.

Fennema O.R. (1993). Química de los alimentos. Editorial Acribia, S. A., 2º edición, España, 141-143, 493-495;

Foda M.S., Hussein M.F., Gibriel A.Y., Risk I.R.S. y Basha S.I. (1984). Physiology of polygalacturonase formation by *Aspergillus aculeatus* and *Mucor pusillus*. Egypt. J. Microbiology. 19 (2):181-191.

García-Carreño FL. (1992). Protease inhibition in theory and practice. Biotechnology Education. 3:145-150.

García-Carreño FL. (1993). Student-friendly classification of proteases. Biotechnology Education. 3:49-53.

García-Carreño FL., Dimes N. y Haard N. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry. 214 (1):65-69.

García-Carreño FL., Hernández-Cortés P. y Ezquerro M. (1996). Proteinase inhibition of fish muscle enzyme using legume seed extracts. Journal of Food Protection. 59:312-318.

Ghildyal N.P., Ramakrishna S.V., Nirmala Devi, P., Lonsane B.K. y Asthana H.N. (1981). Large scale production of pectinolytic enzyme by solid-state fermentation. J. Food Science Technology. 18:248-251.

Grajek W. y Gervais. (1987). Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.*, 9: 658-662.

Hakil M., Voisinet F., Viniestra-Gonzalez G. y Augur C. (1999). Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamarii*: effects of additional nitrogen sources. *Process Biochemistry.* 35 (1-2):103-109.

Harvey L. M. y McNeil B. (1993). Liquid fermentation systems and product recovery of *Aspergillus*. In *Biotechnology Handbooks 7*, ed. J. E. Smith. Plenum Press, New York.

Herzkowitz I.H. (1977). Principles of genetics. 2° ed. Mc. Millan. U.S.A. 483, 719.

Hesseltine C.W. (1972). Biotechnology report: Solid state fermentations. *Biotechnology and Bioengineering.* 14: 517:532.

Iwahori K., Tatsuta S., Fujita M. y Yamakawa K. (1995). Substrate permeability in pellets formed by *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 79(4):387-390.

Kawano CY., Dos-Santos CCMA., Said S. y Fonseca MJV. (1999). Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 29(2):133-140.

Kilara A. y Benchura M.A. (1990). Enzymes. En: A.L. Branen, P.M. Davidson y S. Salminen (Eds.) Food Additives. Dekker. U.S.A. 425-476.

Kotzekidou P. (1991). Production of polygalacturonase by *Byssoclamys fulva*. J. Industrial Microbiology. 7:53-56.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Lehninger A.L. (1979). Bioquímica. 2a ed. Omega. Barcelona, España. 203-205.

Leone G. y Van den Heuvel J. (1987). Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. Canadian J. Botanic. 65:2133-2141.

Maldonado M.C., Strasser A.M. y Callieri D.A. (1989). Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. Sciences des aliments. 9:101-110.

May C.D. (1990). Industrial pectins: Sources, production and applications. Carbohydrate Polymers. 12: 79-99.

Miller Gail L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31 (3):426-428.

Minjares C. (1992). Obtención de mutantes de *Aspergillus niger* C28B25 hiperproductores de pectinasas por fermentación en medio sólido de la pulpa de café. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. 6-10, 24, 86-94.

Minjares-Carranco A., Trejo-Aguilar B., Aguilar G. y Viniegra-González G. (1997). Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 21:25-31.

Moore J. y Bushell M.E. (1997). The effect of morphology and oxygen uptake on penicillin production by *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Mycological Research*. 101(10):1237-1241.

Mulder E.G. (1938). Sur l'influence de cuivre sur la croissance des microorganismes. *Ann. Ferm.*, n. S. 4:513-533. (Abs. In *Rev. Appl. Mycol.* 18:241. 1939).

Neubeck C.E. (1975). Fruits, fruits products and wines. In *Enzymes in Food Processing*. Ed. by G. Reed. Academic Press, Inc., London. 397- 442.

Oriol E. (1987). Croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. Thèse Doctorat (U.P.S.), Toulouse, Francia. 1-115.

- Panda T. y Naidu GSN. (2000). Rotating simplex method of optimization of physical parameters for higher production of extracellular pectinases in bioreactor. *Bioprocess Engineering*. 23 (1):47-49.
- Pandey A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 27: 109-117.
- Papagianni M., Nokes S.E. y Filer K. (1999). Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 35(3-4):397-402.
- Pilnik W., Rombouts F.M. y Voragen A.G.J. (1973). On the classification of pectin depolymerases activity of pectin depolymerases on glycol esters of pectate as a new classification criterion. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 2:122-128
- Pirt SJ. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell scientific publications. First edition. 222-232.
- Potter N. (1978). La ciencia de los alimentos. Edutex S.A., México. 566-568.
- Qadeer M.A., Iqbal J., Aziz S.K. y Hassan H. (1985). Solid substrate fermentation for pectinase production by *Aspergillus foetidus*. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 28:179-181.

Raimbault M., Roussos S., Oriol E., Viniegra G., Gutierrez M. y Barrios-González J. (1989).

Procédé de culture de microorganismes sur milieu solide constitué d'un support solide, absorbant, compressible et non fermentable'. Solicitud de Patente No. 89 06558, ante el Institut National de la Propreté, Paris, Francia.

Ried J.L. y Colmer A. (1985). Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels. *Applied and Environmental Microbiology*. 50:615-622.

Rombouts F.M. y Pilnik W. (1980). Pectin enzymes. En: *Economic Microbiology, Microbial Enzymes and Bioconversions* (Rose, A. H. ed.). Acad Press Inc., London-New York. 227-282.

Romero-Gómez S., Augur C. y Viniegra-González G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 22: 1255-1258.

Roussos S. (1985). Croissance de *Trichoderma harziianum* Par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Provence, Francia. 193.

Scriban R. (1985). Biotecnología. Manual Moderno. México. 98, 163, 168-170.

Singh SA., Ramakrishna M. y Rao AGA. (1999). Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochemistry*. 35 (3-4):411-417.

Solís-Pereira S., Favela-Torres E., Viniegra-González G. y Gutiérrez-Rojas M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39: 36-41.

Solís-Pereyra S., Favela-Torres E., Gutiérrez-Rojas M., Roussos S., Saucedo-Castañeda G., Gunasekaran P. y Viniegra-González G. (1996). Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 12:1-4.

Taragano VM. y Pilosof AMR. (1999). Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 25 (3-5):411-419.

Trejo-Hernández M.R., Oriol E., López-Canales A., Roussos S., Viniegra-González G. y Raimbault M. (1991). Produccion de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micol. Neotrop. Apl.* 4:49-62.

- Trevelyan W.E. y Harrison, J.S. (1952). Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochemistry. J.* 50:298.
- Tsuyumu S. (1977). Inducer of pectic acid lyase in *Erwinia carotovora*. *Nature.* 269 (5625): 237-238.
- Tsuyumu S. (1979). "Self-catabolite repression" of pectate lyase in *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriology.* 137 (2): 1035-1036.
- Velasco F. (1968). Las pectinasas en la elaboración industrial de jugos frutales y sus derivados (concentrados, vinos, sidras, etc.). *Tecnología de Alimentos.* 3:24-32.
- Whistler R.L. y Daniel J.R. (1985). Carbohydrates. En: O.R. Fennema (Ed) *Food Chemistry.* 2a ed. Dekker, U.S.A. 123-125.
- Viniegra-González G. (1997). Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes in solid substrates. In *Advances in Bioprocess Engineering II*, eds E. Galindo and O. T. Ramírez. Kluwer Academic Publishers. 123-135.
- Zhu Y., Knol W., Smits J.P. y Bol J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology.* 16:643-648.

Zhu Y., Knol W., Smits J.P. y Bol J. (1996). Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme and Microbial Technology*. 18:108-112.

13. ANEXO 1. COPIA DE LA PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA TESIS.



JOURNAL OF
**INDUSTRIAL
MICROBIOLOGY
& BIOTECHNOLOGY**

Editor-in-Chief:
Dr J.J. Cooney, Boston, MA, USA

Environmental, Coastal and Ocean
Sciences Program
University of Massachusetts
100 Morrissey Blvd
Boston, MA 02125-3393, USA

Tel: +1-508-747-1816
Fax: +1-508-747-2230
email: jjc@capecod.net

Senior Editors:
R.H. Baltz, Indianapolis, IN, USA
A.I. Laskin, Somerset, NJ, USA
J.W. Patching, Galway, Ireland
R.D. Schwartz, North Chicago, IL, USA
S. Silver, Chicago, IL, USA
G.A. Somkuti, Wyndmoor, PA, USA

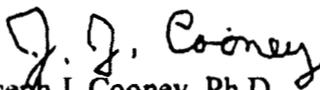
8 March 2001

To whom it may concern:

This will acknowledge that your manuscript, Diaz-Godinez et al: "Exopectiases produced by ..." (MS 00-108J) has been accepted and was forwarded to the publisher on 12 February 2001. I apologize for the delay in informing you of this, but my assistant, who handles the correspondence was ill for a period of 10 days and we are just now catching up.

Congratulations in advance on succesful completion of your degree.

Sincerely,


Joseph J. Cooney, Ph.D.
Editor-in-Chief



Specialist Journals Division
345 Park Avenue South
New York, NY 10010-1707

Exopectinases Produced by *Aspergillus niger* in Solid-State and Submerged Fermentation: A Comparative Study.

Gerardo Díaz-Godínez², Jorge Soriano-Santos¹, Christopher Augur³ and Gustavo Viniestra-González¹.

¹ **Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. Michoacán y Purísima D.F. CP. 09340, México. Tel: 58044719 Fax: 58044712 Email: vini@xanum.uam.mx.**

² **Área de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Ixtacuixtla Tlax. México. Tel./Fax: 24815482**

³ **IRD-Mexique. Cicerón 609. Los Morales 11530, D. F. México.**

SUMMARY

Exopectinase production by *Aspergillus niger* was compared, in submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF). SSF was carried out on polyurethane foam as solid support. The purpose was to study the effect of sucrose addition (0 or 40 g/L) and water activity level ($A_w = 0.99$ or 0.96) on the level of enzyme activity induced by 15 g/L of pectin. Mycelial growths as well as extra cellular protease production were also monitored. Sucrose addition in SmF resulted in catabolite repression of exopectinase activity. However, in SSF an enhancement of such activity, was observed. Protease level was minimal in SSF experiments with sucrose and maximal in SmF without sucrose. Exopectinase yields (IU/gX) were negligible in SmF with sucrose. The high levels of exopectinase with sucrose and high A_w in SSF can be explained by a much higher level of biomass production without catabolite repression and with lower protease contamination.

KEYWORDS. Exopectinase, Solid-State Fermentation, Polyurethane, Enzyme yield.

INTRODUCTION

Enzymes are important commercial products with an estimated annual sales value between 600 and 700 million dollars [14]. Another estimate [4] indicates a world sales figure of 505 million dollars in 1991 and 1 billion dollars for 2000 with more than 9% annual growth, and a large share for food and feed enzyme with a total market in 1995 about \$483 million including “pectinases (which) are of the utmost importance in juice and wine production” [4]. Most of the enzymes are produced by the Submerged Fermentation (SmF) technique [11]. However, the number of research papers related to the alternative Solid State Fermentation (SSF) technique is increasing steadily [1-3, 5, 7, 12-13, 15, 17-20, 22-27]. Furthermore, several studies have been published describing the use of SSF technique for pectinase production [3, 5, 7, 12, 22-24]. Advantages of the latter technique include: higher enzyme titers [22-23], higher productivity levels [2], stability of excreted enzymes [2, 17] and, with a low level of catabolite repression [2, 15, 22-23]. However, such studies, have not established yet, the nature of the physiological differences between pectinase production in SSF and SmF. For example, in terms of technical coefficients, such as: specific growth rate ($\mu = h^{-1}$) and enzyme yield ($Y_{E/X} = \text{enzyme units/g of biomass}$). Lack of a detailed understanding is mainly due to the biodegradable nature of the solid supports used, such as, sugar cane bagasse, [1, 2] coffee pulp, [3, 17] and wheat bran [7, 12]. In the latter examples, biomass measurements were either difficult or impossible to obtain.

Recently, polyurethane foam (PUF) has been used as inert support for enzyme production by SSF technique [18, 26-27] allowing direct measurement of biomass production, together with

measurements of substrate uptake and enzyme activity in the culture medium. An important question to address is whether higher enzyme productivity by SSF technique, mentioned above, is related to higher levels of biomass production or to higher enzyme yields (units per gram of biomass). This paper presents evidence supporting the former alternative, by measuring kinetic parameters of biomass production and enzyme excretion, using a strain of *Aspergillus niger* cultured on defined liquid medium absorbed on PUF cubes. Special attention is paid to the effect of environmental factors such as water activity, the proportion of sucrose and pectin in the culture medium and the presence of protease activity. Differences in stability of exopectinase between SmF and SSF are in part due to different levels of protease activities induced by the environmental factors, and protein in the crude extract. Such considerations may be of utmost importance when considering future industrial applications.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism

Aspergillus niger C28B25 [3, 5], was propagated in Erlenmeyer flasks at 35°C for 72 hours, and maintained at 4°C on potato-dextrose agar.

Culture conditions

Media. Two basal liquid media were used, having the same C/N = 5.5 ratio. The first, was labeled NS (no sucrose), having (g/L): pectin with 8% of methoxylation, 15; (NH₄)₂SO₄, 2.9; K₂HPO₄, 3.0; urea, 1.0; MgSO₄-7H₂O, 0.066; FeSO₄, 0.096; MnCl₂, 0.001; ZnCl₂, 0.001; CuSO₄, 0.001; water up to 1 L. The second, was labeled PS (plus sucrose) and contained:

pectin, 15; sucrose, 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 12.6; K_2HPO_4 , 6.5; urea, 3.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; FeSO_4 , 0.29; MnCl_2 , 0.001; ZnCl_2 , 0.001; CuSO_4 , 0.001. Water was added up to 1 L. Both media were adjusted to an initial pH of 4.5. To depress water activity ($A_w = 0.96$), ethylene glycol was added to 10% (v/v). In all other experiments, $A_w = 0.995$ as measured from vapor pressure at equilibrium. All chemicals were from Baker, except pectin from Sigma-Aldrich.

Submerged fermentation. Erlenmeyer flasks with a nominal volume of 125-mL were filled with 50 mL of liquid medium and inoculated under aseptic conditions with 10^8 spores per gram of carbon source. All cultures were incubated at 35°C using an orbital shaker rotating at 200 rpm.

Solid-state fermentation. Low-density (17 kg/m^3) PUF was cut in cubes ($0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}$) and washed twice with boiling water. Erlenmeyer flasks with a nominal volume of 250 mL were filled with 1 g of oven dried and sterile PUF cubes to which 30 mL of liquid medium were added. Inoculation was made under aseptic conditions with 10^8 spores per gram of carbon source. All cultures were incubated at 35°C .

Separation of biomass and crude extracts in SmF and SSF systems.

Enzyme extracts (EE) obtained by SmF were filtered through a Whatman No. 4 paper and subsequently through a Millipore membrane ($0.45 \mu\text{m}$). Biomass retained on the Whatman paper was dried to constant weight. At selected times, 20 mL of distilled water was added to SSF and the PUF was then compressed in a Büchner funnel. Enzyme extracts obtained were then passed through a Millipore membrane ($0.45 \mu\text{m}$). The solid retentate with PUF was dried to constant weight. The calculated biomass was the difference between initial and final PUF

weight [27]. The pH of the EE was then measured. All experimental data are presented as mean values \pm the standard deviation of three separate runs.

Excreted protein

Total extra cellular protein excreted was measured in cell-free EE by the Bradford method [6], using bovine serum albumin as standard.

Exopectinase activity

Exopectinase activity in cell-free EE was assayed by quantification of reducing sugars using the DNS method [16]. Incubation mixture consisted of, 0.1 mL EE, 0.5 mL of 1.0% pectin solution and 0.4 mL acetate buffer pH 4.5 incubated for 15 min at 45 °C. Results were expressed as galacturonic acid equivalents. One international unit (IU) of exopectinase activity was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol galacturonic acid per minute.

Protease activity

Protease activity in cell-free EE was measured by changes in the absorbency at 520 nm. They were produced by 50 μ L of EE, mixed with 850 μ l of 0.5% Azocoll (Sigma) in acetate buffer 0.1M pH 4.5 after 30 min of incubation at 35°C. The reaction was stopped with 100 μ L of 5% trichloroacetic acid. One arbitrary azocoll unit (AU) of protease activity was defined as the amount of enzyme that released and azo group, increasing by 0.001 the absorbency min^{-1} [8, 9].

Estimation of kinetic parameters

Evolution of biomass $X = X(t)$ was followed by the Verhulst-Pearl or logistic equation

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[1 - \frac{X}{X_{\max}} \right] X \quad (1)$$

where, μ is the maximal specific growth rate and X_{\max} is the maximal (or equilibrium) biomass level achieved when $dX/dt = 0$ for $X > 0$. The solution of equation 1 is the following

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + Ce^{-\mu t}} \quad (2)$$

Where, $C = (X_{\max} - X_0)/X_0$; being $X = X_0$; the initial biomass value.

Estimation of kinetic parameters in the previous equation was done using a non-linear least square-fitting program, called "Solver" present in Excel electronic sheet (Microsoft). The coefficient $Y_{E/X}$, was estimated as the slope of the initial linear correlation between E (IU/L) and X (gX/L).

RESULTS***Biomass production***

Figure 1 shows biomass production by *Aspergillus niger* as a function of fermentation time. SSF had higher production of biomass than SmF independently of the presence or absence of sucrose or the different levels of A_w . However, the effect of ethylene glycol on biomass production for SSF was stronger than for SmF. Growth curves were fitted by equation 1 with high correlation coefficients ($R^2 > 0.98$) showing that the model was adequate for this process. Highest values of X_{\max} (around 20 g/L), were obtained in SSF in the presence of sucrose with

$A_w = 0.99$ (Table 1). In the absence of sucrose, biomass was greatly reduced whether produced by SmF or SSF technique and independently of A_w (Table 1, Figure 1). A similar effect was found for μ . Namely, sucrose addition in SSF with $A_w = 0.99$, had $\mu = 0.47 \text{ h}^{-1}$, as compared to $\mu = 0.23 \text{ h}^{-1}$ without sucrose. Addition of sucrose to SmF system did not enhance the rate of growth, but increased the values of X_{\max} , although, the highest values of X_{\max} in SSF experiments, showing that *Aspergillus niger* can use high levels of sugar more efficiently when cultured on a solid support than in a submerged culture. This result is very similar to the one obtained with three different strains of *A. niger* grown on PUF or shake flasks and supplied with 100 g/L of sucrose [21] and seems to be the case when initial substrate concentration is higher than 50 g/L (unpublished results). However, depression of water activity by ethylene glycol affected to a greater extent the fast growing cultures in SSF with sucrose, than the slow growing cultures in SmF.

Exopectinase activity

Figure 2(A) shows the profiles of extra cellular exopectinase titers obtained with sucrose addition. In the SSF system, sucrose addition led to a very high level of exopectinase activity ($E_{\max} \approx 7000 \text{ IU/L}$), when compared to exopectinase activity in SmF ($E_{\max} \approx 2000 \text{ IU/L}$). Addition of ethylene glycol ($A_w = 0.96$) decreased maximum exopectinase levels in all cases. Analysis of variance (ANOVA) of E_{\max} data showed again, as in biomass production, that exopectinase production was enhanced by high levels of water activity and by the use of SSF over SmF. It is worth noticing that in SmF system with sucrose addition, a definite repressive effect was observed. However, in SSF the effect was quite the opposite (see Figure 2 and

Table 1). Exopectinase production had a linear correlation ($R^2 > 0.98$) with the level of biomass during the initial period of fermentation ($X < X_{\max}/2$), which roughly corresponds to the exponential phase of growth. The value of the slope was called $Y_{E/X}$ (IU/gX), and was a measure of the productivity of exopectinase by the fungal cells. Table 1 shows that $Y_{E/X}$ was in SSF (with or without sucrose, and at the two A_w levels) equal or lower to $Y_{E/X}$ in SmF (without sucrose) suggesting that increases in exopectinase production by SSF system were related to better fungal growth but not to higher productivity of exopectinase. This is an important result because it has been the subject of speculation as to why SSF produces higher levels of enzymes [2, 19, 22].

The specific activity (SA) of excreted exopectinase was expressed as IU/mg excreted protein as shown in Table 1. Exopectinase specific activity was highest in SSF, in the presence of sucrose and with a water activity of 0.995. This indicates that *Aspergillus niger* grown by SSF technique on PUF, produces a purer pectinase extract as compared to the experiments done by SmF technique.

Protease activity

The kinetics of protease production by *Aspergillus niger* in SmF and SSF are shown in Figure 3. Protease production, regardless of experimental condition, was sharply lower in SSF. Moreover, the presence of sucrose in the media further decreased protease production (Figure 3). Hence, SSF technique may offer additional advantages in terms of exopectinase stability, because of reduced proteolysis.

DISCUSSION

Biomass of *Aspergillus niger* grown by SSF, could be measured directly, thanks to the use of PUF as inert carrier. The level of X_{\max} in SSF was higher than obtained in SmF in equal conditions and with the same media. This may be, because of the higher availability of oxygen in the solid to air interphase, since it is widely known that oxygen dissolves poorly in water (≈ 6 mg/L). In all cases, the residual sugars were minimal. In addition, the estimated maintenance coefficients were higher for SmF system than for SSF system (data not shown). In the presence of 40 g/L of sucrose, no catabolite repression was observed in SSF, but was present in SmF, confirming previous observations that in SSF there is a resistance to catabolite repression of pectinase as reported by other authors [22, 23] in SSF on sugarcane bagasse. Unpublished results obtained by Díaz-Godínez showed no inhibition of exopectinase activity in SSF when 40, 60, 80 and 100 g/L of sucrose were used. The SmF system produced more exopectinase activity per gram of biomass ($Y_{E/X}$) than SSF (Table 1). However, the maximal values of exopectinase activity and X_{\max} were obtained in SSF. Hence, the high titers of exopectinase activity obtained by SSF technique were related to the amount of biomass and not to intrinsic differences in enzyme yield. Whatever the experimental conditions (SSF or SmF; with or without sucrose), the addition of 10% ethylene glycol ($A_w = 0.96$) resulted in lower biomass production and lower exopectinase activity. Similar results have been reported [1], and this confirms the importance of high A_w levels on growth and enzyme production. SmF resulted in the production of more protease activity than SSF, but the presence of sucrose in the media reduced protease activity in both systems. It could be speculated that stress conditions induced protease activity in *Aspergillus niger*, and such stress conditions were

milder in presence of sucrose, at high A_w and using SSF technique. There are reports on the inhibition of protease activity by immobilization of *Aspergillus niger* [10]. In summary, we have now reasons to formulate the hypothesis that mass transfer phenomena of oxygen and substrates in solid supports are fundamental factors that account for differences of mold physiology as compared to stirred liquid fermentations. Higher oxygen levels at solid to air interphase would support faster growth with higher oxygen demand and very slow diffusion of substrate in the absorbed liquid producing local substrate and product gradients of concentration. At any rate, a practical consequence of our work is to stress the advantage of solid-state fermentation with supplemented concentrated culture broths in order to achieve high pectinase titers with low protease activity in the spent liquor.

Table 1. Growth Kinetic parameters of *Aspergillus niger* and maximal values of exopectinase activity.

Fermentation system	A _w	Media	μ (h ⁻¹)	X _{max} (g/L)	Exopectinase activity (IU/L)	Specific activity (IU/mg protein)	Y _{EX} (IU/g X)
SSF	0.995	*PS	0.47	23.9 ^a (0.87)	7150 ^a (450)	382	330
		*NS	0.23	4.4 ^c (0.06)	623 ^{d,e} (16.5)	29	187
	0.96	PS	0.18	18.5 ^b (1.04)	1911 ^b (141)	91	600
		NS	0.15	1.2 ^e (0.08)	541 ^c (8.1)	33	1129
SmF	0.995	PS	0.19	11.0 ^c (0.12)	355 ^c (0.8)	10	0
		NS	0.22	4.38 ^e (0.06)	1714 ^b (34)	181	534
	0.96	PS	0.07	9.9 ^d (0.47)	876 ^d (50)	24	0
		NS	0.22	2.7 ^f (0.13)	1405 ^c (165)	119	557

Means with the same letter are not significantly different. Numbers in parenthesis correspond to standard errors of three separate experiments

* PS = 40 g/L sucrose, NS = no sucrose. All media had 15 g/L pectin.

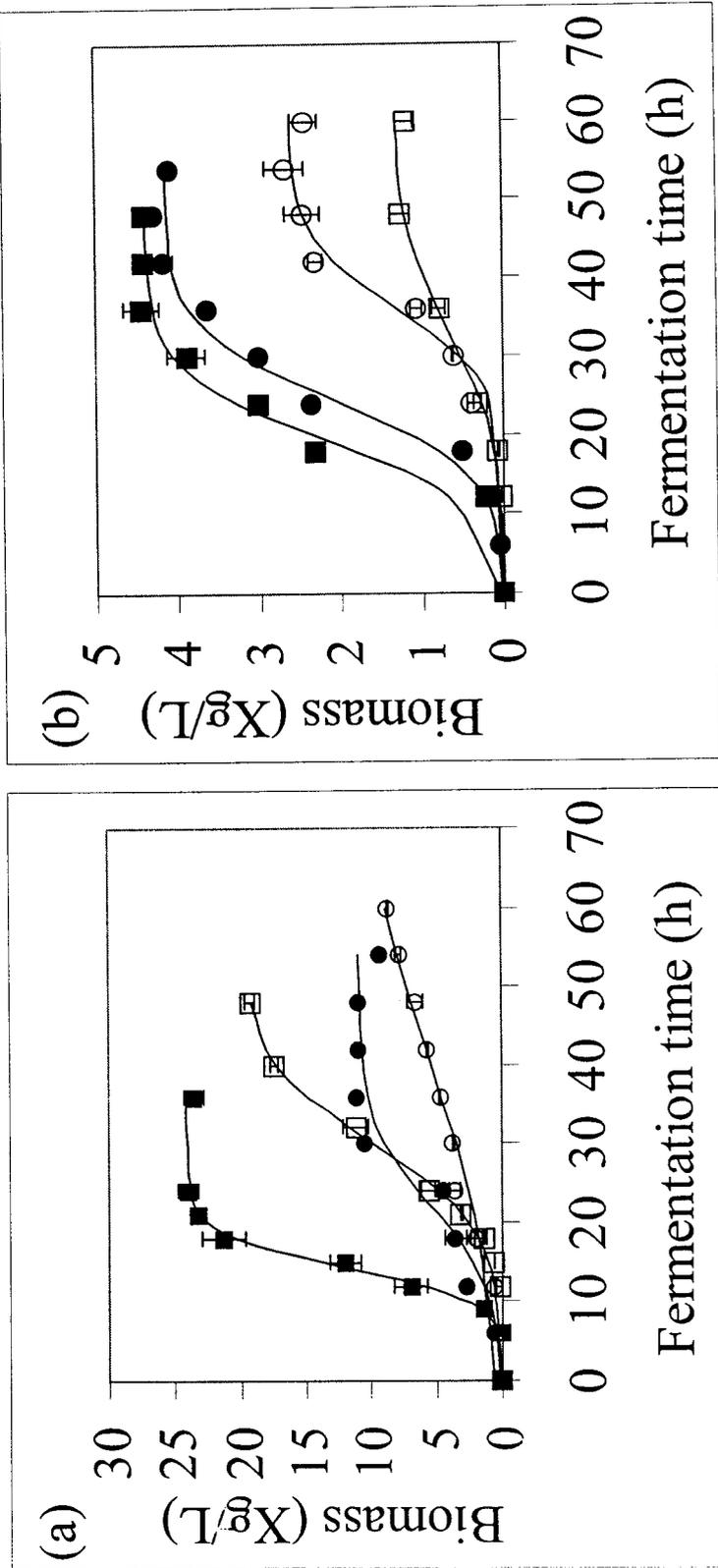


Figure 1. Growth curves of *Aspergillus niger* obtained by SSF (■) and SmF (●) and NS media (○) techniques. In the presence of sucrose (PS media) (a) and in the absence of sucrose (NS media) (b). Full symbols correspond to $A_w = 0.995$ and open symbols correspond to $A_w = 0.96$. The error bars on the graphs represent three different fermentation runs.

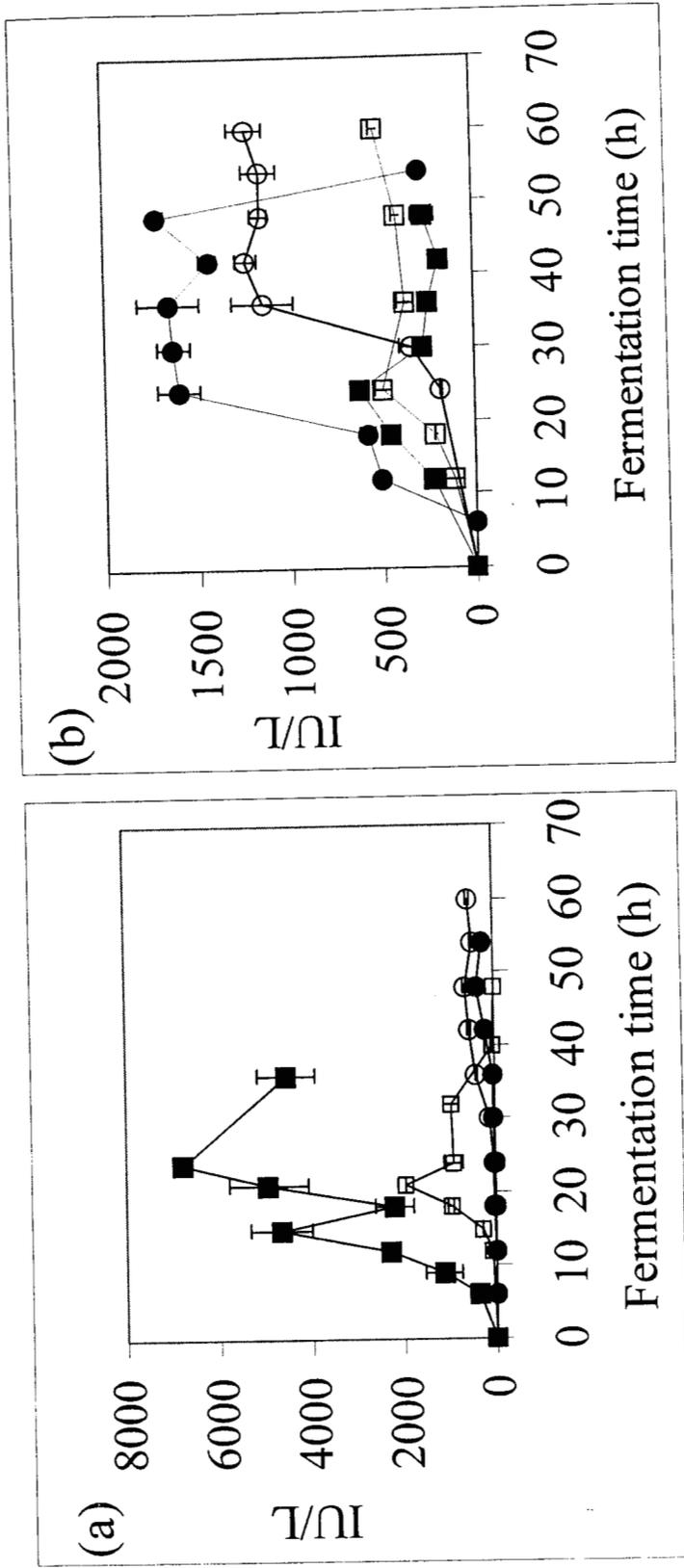


Figure 2. Comparative titers of exopectinase activity produced by *Aspergillus niger* in SSF (■) and SmF (○) techniques. In the presence of sucrose (PS media) (a) and in the absence of sucrose (NS media) (b). Full symbols correspond to $A_w = 0.995$ and open symbols correspond to $A_w = 0.96$. The error bars on the graphs represent three different fermentation runs.

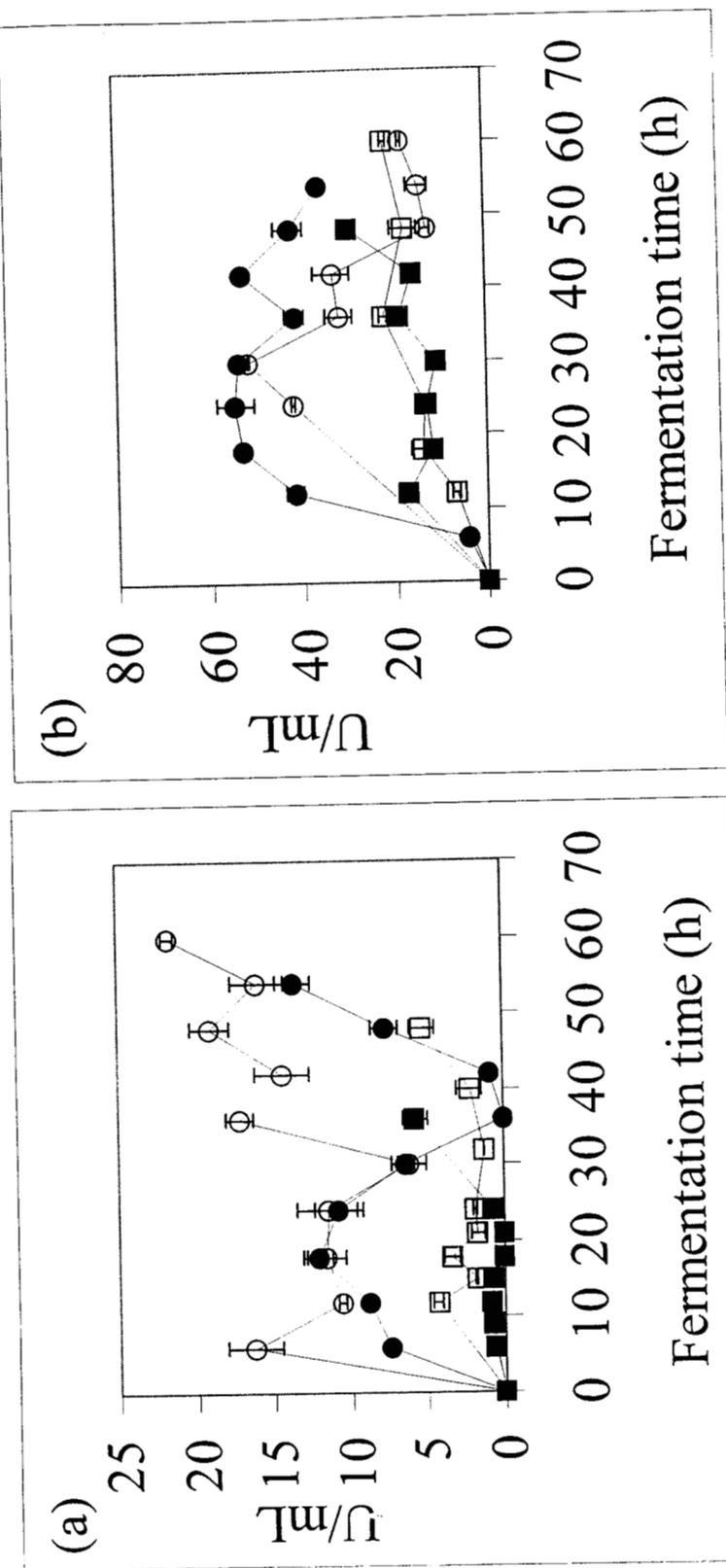


Figure 3. Protease production by *Aspergillus niger* in SSF (■) and SmF techniques (○). In the presence of sucrose (PS media) (a) and in the absence of sucrose (NS media) (b). Full symbols correspond to $A_w = 0.995$ and open symbols correspond to $A_w = 0.96$. The error bars on the graphs represent three different fermentation runs.

ACKNOWLEDGMENTS

Present work was partially financed by an agreement between Universidad Autónoma Metropolitana (México), Institut of Recherche pour le Développement (IRD) from France and also by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México). G. Díaz-Godínez had a scholarship from CONACYT.

REFERENCES

1. Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G and Favela-Torres E. 1994. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* on solid-state fermentation. *Biotechnol Lett* 16 (1): 23-28.
2. Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G and Favela-Torres E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 808-814.
3. Antier P, Minjares A, Roussos S, Raimbault M and Viniegra G. 1993. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microbiol Technol* 15: 254-260.
4. Biotechnology Support Services (2000) <http://www.biotechsupportindia.com/market.htm>
5. Boccas F, Roussos SS, Gutierrez M, Serrano L and Viniegra-González G. 1994. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: Selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *J Food Sci Technol* 31 (1): 22-26.

6. Bradford MM. 1977. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248.
7. Cavalitto SF, Arcas JA and Hours RA. 1996. Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnol Lett* 18(3): 251-256.
8. Chavira R Jr, Burnett TJ, and Hageman JH. 1984. Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem* 136: 446-450.
9. Dosoretz C, Chen H-C and Grethlein H. 1990. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 56 (2): 395-400.
10. Fang L, Wenqing L, Darin R, Tingyue G and Murray M-Y. 1998. Inhibition of extracellular protease secretion by *Aspergillus niger* using cell immobilization. *Biotechnol Lett* 20 (6): 539-542.
11. Harvey LM and McNeil B. 1993. Liquid fermentation systems and product recovery of *Aspergillus*. In *Biotechnology Handbooks* 7, ed. J. E. Smith. Plenum Press, New York.
12. Hours RA and Sakai T. 1994. Protopectinase production in solid state culture of *Aspergillus awamori*. *Biotechnol Lett* 16(7): 721-726.
13. Hesseltine CW. 1972. Biotechnology report: Solid state fermentations. *Biotechnol Bioeng* 14: 517:532.
14. Layman P. 1990. Promising new markets emerging for commercial enzymes. *Chem Eng News* 68: 17-18.

15. Maldonado MC, Strasser AM and Callieri DA. 1989. Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. *Sciences des aliments* 9:101-110.
16. Miller G L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal CEM* 31 (3): 426-428.
17. Minjares-Carranco A, Trejo-Aguilar B, Aguilar G and Viniegra-González G. 1997. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 21:25-31.
18. Murado MA, González MP, Torrado A and Pastrana. 1997. Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. *Process Biochem* 32(1): 35-42.
19. Pandey A, Sevakumar P, Soccol CR and Nigam P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77: 149-162.
20. Qadeer MA, Iqbal J, Aziz SK and Hassan H. 1985. Solid substrate fermentation for pectinase production by *Aspergillus foetidus*. *Pakistan J Sci Ind Res* 28: 179-181.
21. Romero-Gómez S, Augur C, and Viniegra-González G. 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnol Lett* 22: 1255-1258
22. Solís-Pereyra S, Favela-Torres E, Viniegra-González G and Gutiérrez-Rojas M. 1993. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 39: 36-41.

23. Solís-Pereyra S, Favela-Torres E, Gutiérrez-Rojas M, Roussos S, Saucedo-Castañeda G, Gunasekaran P and Viniegra-González G. 1996. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. *World J Microbiol Biotechnol* 12: 1-4.
24. Trejo-Hernández MR, Oriol E, López-Canales A, Roussos S, Viniegra-González G and Raimbault M. 1991. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micol Neotrop Apl* 4: 49-62.
25. Viniegra-González G. 1997. Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes in solid substrates. In *Advances in Bioprocess Engineering II*, eds E. Galindo and O. T. Ramírez. Kluwer Academic Publishers 123-135.
26. Zhu Y, Knol W, Smits JP and Bol J. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnol* 16: 643-648.
27. Zhu Y, Knol W, Smits JP and Bol J. 1996. Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme Microb Technol* 18: 108-112.