



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**"PRODUCCION DE EXOPOLIGALACTURONASAS DE
Aspergillus niger POR FERMENTACION EN MEDIO
SOLIDO UTILIZANDO COMO SOPORTE ESPUMA DE
POLIURETANO"**



T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A :
I.A. GERARDO DIAZ GODINEZ**

TUTORES: DR. JORGE SORIANO SANTOS

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

1999

222265

DEDICATORIA.

A mi esposa e hijo.

Diana y Gerardito, les dedico esta Tesis, ya que con su amor, apoyo y comprensión he logrado una meta más en la vida; los amo y por ustedes es que me esfuerzo cada día por ser mejor.

A mis padres.

Daniel y Sonia, por su apoyo, consejo y cariño; ya que siempre han estado conmigo en los mejores y peores momentos de mi vida.

AGRADECIMIENTO.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de esta Tesis.

A los integrantes del jurado:

Dr. Christopher Augur

Dr. Ernesto Favela Torres

Dr. Sergio Huerta Ocho

Dr. Jorge Soriano Santos

Por los comentarios realizados a la presente Tesis.

Especialmente al Dr. Jorge Soriano Santos y al Dr. Gustavo Viniegra González por el apoyo y confianza que han depositado en mi, desde el inicio del trabajo realizado en esta Tesis.

RECONOCIMIENTO.

Al Dr. Jorge Soriano Santos y al Dr. Gustavo Viniegra González por su profesionalismo, experiencia y calidad humana, que me han transmitido durante su dirección de la Tesis.

ABREVIATURAS USADAS:

Act. Esp.	= Actividad específica
Act. Vol.	= Actividad volumétrica
a_w	= Actividad de agua
°C	= Grados centígrados
cm	= centímetros
DNS	= Ácido Dinitrosalicílico
ECE	= Extracto crudo enzimático
EP	= Exopoligalacturonasa (s)
FML	= Fermentación en medio líquido
FMS	= Fermentación en medio sólido
g	= Gramos
h	= Horas
kg	= Kilogramos
Km	= Constante de Michaelis-Menten
l	= Litros
mg	= Miligramos
min	= Minutos
ml	= Mililitros
PUF	= Espuma de poliuretano
UI	= Unidades enzimáticas internacionales
V	= Voltios
Vmax	= Velocidad máxima enzimática
μ	= micras
%	= Por ciento

RESUMEN.

En esta tesis se evaluó la espuma de poliuretano de baja densidad como soporte en la fermentación en medio sólido para producir EP. Se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* C28B25, la cual está catalogada como una cepa sobreproductora de pectinasas en fermentación sólida. El caldo de cultivo, a pH de 4.5, contenía pectina y sacarosa como fuentes de carbono y se impregnó en cubos de poliuretano (0.5cm³). Las fermentaciones se realizaron a 35 °C. Se llevaron a cabo diversos experimentos con el fin de incrementar la actividad EP, encontrando que la concentración de sacarosa en el medio es determinante para la síntesis de estas enzimas, ya que la actividad volumétrica y específica se lograron incrementar al incrementar la concentración de sacarosa; por otro lado, se encontró que el tiempo de máxima producción de las EP era a las 24 h de fermentación.

INDICE GENERAL

	Pag.
ABREVIATURAS USADAS	i
RESUMEN	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
I INTRODUCCION.....	1
II MARCO TEORICO.....	3
1 Estructura química de las pectinas.....	3
1.1 Propiedades y aplicaciones de las pectinas.....	5
2 Pectinasas.....	7
2.1 Pectinesterasas.....	7
2.2 Poligalacturonasas.....	9
2.3 Pectato y pectin liasas.....	10
2.4 Utilidad de las pectinasas.....	12
2.5 Producción.....	16
3 Fermentación.....	18
4 Regulación de la síntesis de pectinasas.....	20
III ANTECEDENTES.....	23
IV JUSTIFICACION.....	26
V HIPOTESIS.....	28
VI OBJETIVOS.....	29
1 Objetivo general.....	29
2 Objetivos particulares.....	29
VII METAS.....	30
VIII MATERIALES Y METODOS.....	31
1 Generales.....	31
1.1 Cepa de <i>Aspergillus niger</i>	31
1.2 Determinación de actividad EP.....	31
1.3 Determinación de la concentración de proteína en el ECE.....	32
1.4 Determinación de biomasa.....	32

2	Producción de EP por FMS utilizando bagazo de caña como soporte.....	33
2.1	FMS utilizando bagazo de caña como soporte.....	33
2.2	Obtención del ECE.....	33
3	Producción de EP por FMS utilizando PUF como soporte.....	34
3.1	Evaluación de PUF como soporte para la producción de EP por FMS.....	34
3.1.1	Obtención del ECE.....	35
3.2	Efecto de la adición de oligoelementos al medio sobre la actividad enzimática obtenida por FMS sobre PUF.....	35
3.3	Efecto del incremento de las esporas inoculadas sobre la actividad EP.....	36
3.4	Experimento factorial fraccionado para incrementar la producción de EP por FMS utilizando PUF como soporte.....	36
3.5	Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la actividad EP.....	38
3.6	Evaluación del efecto que tiene una sola fuente de carbono sobre la producción de EP.....	38
3.7	Evaluación de la K_m y V_{max} de las EP en el ECE.....	38
4	Producción de EP por FML.....	39
4.1	FML para producción de EP.....	39
4.2	Obtención del ECE.....	39
5	Electroforesis.....	39
6	Análisis Estadístico.....	40
IX	RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
1	Producción de EP por FMS utilizando bagazo de caña como soporte.....	41
2	Producción de EP por FMS utilizando PUF como soporte.....	41
2.1	Evaluación de PUF como soporte para la producción de EP por FMS.....	41
2.2	Efecto de la adición de oligoelementos al medio sobre la actividad enzimática obtenida por FMS sobre PUF.....	44
2.3	Efecto del incremento de las esporas inoculadas sobre la actividad EP.....	46
2.4	Diseño factorial fraccionado para incrementar la producción de EP por FMS utilizando PUF como soporte.....	48
2.5	Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la actividad EP.....	53

2.6 Evaluación del efecto que tiene una sola fuente de carbono sobre la producción de EP.....	57
2.7 Evaluación de la K_m y V_{max} de las EP en el ECE.....	64
3 Producción de EP por FML.....	67
4 Electroforesis.....	69
5 Comparación de actividad volumétrica, específica y productividad obtenidas por los tres sistemas de fermentación.....	72
X CONCLUSIONES.....	74
XI BIBLIOGRAFIA.....	76

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1 Algunas enzimas pectinasas, su fuente y algunas propiedades fisicoquímicas.....	8
Tabla 2 Crecimiento y producción de enzimas pécticas de tres cepas diferentes en medio líquido, agitado durante 5 días a 30°C.....	23
Tabla 3 Productividad máxima de las pectinasas producidas por <i>A. niger</i> CH4 en fermentaciones en estado sólido y líquido.....	24
Tabla 4 Valores de K_m aparentes de las pectinasas producidas por <i>A. niger</i> CH4 en FML y FMS.....	25
Tabla 5 Composición del medio utilizado para producir pectinasas por FMS en bagazo de caña.....	34
Tabla 6 Nivel basal y unidades de variación empleadas en el diseño factorial.....	37
Tabla 7 Distribución de los tratamientos de acuerdo con el experimento diseñado.....	37
Tabla 8 Composición del medio de cultivo y condiciones de fermentación para producir EP por FMS utilizando PUF como soporte.....	61
Tabla 9 Máxima productividad y actividad EP producidas por FMS utilizando bagazo de caña y PUF y por FML.....	73

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1	Estructura química de la pectina..... 4
Figura 2	Acción de las pectinesterasas..... 9
Figura 3	Acción de las poligalacturonasas..... 10
Figura 4	Acción de las pectato liasas..... 11
Figura 5	Perfil de proteína en ECE y biomasa (a), actividad EP (b) producidas por FMS utilizando PUF como soporte..... 43
Figura 6	Contenido de proteína en el ECE y biomasa (a), actividad EP (b) producidas por FMS utilizando PUF como soporte en presencia de oligoelementos..... 45
Figura 7	Contenido de proteína en el ECE y biomasa (a), actividad EP (b) producidas por FMS utilizando PUF como soporte en presencia de oligoelementos y doble cantidad de esporas inoculadas al medio..... 47
Figura 8	Proteína en el ECE y biomasa producidas en las fermentaciones del experimento factorial fraccionado utilizado para mejorar la producción de las EP por FMS sobre PUF..... 49
Figura 9	Actividad volumétrica EP producida por FMS sobre PUF resultante del experimento factorial fraccionado..... 50
Figura 10	Actividad específica EP producida por FMS sobre PUF resultante del experimento factorial fraccionado..... 51
Figura 11	Biomasa obtenida por FMS sobre PUF en la evaluación de 4 concentraciones de sacarosa en el medio para producir EP..... 54
Figura 12	Proteína en el ECE obtenida por FMS sobre PUF en la evaluación de 4 concentraciones de sacarosa en el medio para producir EP..... 54
Figura 13	Actividad volumétrica EP obtenida por FMS sobre PUF al evaluar 4 concentraciones de sacarosa en el medio..... 56
Figura 14	Actividad específica EP obtenida por FMS sobre PUF al evaluar 4 concentraciones de sacarosa en el medio..... 57
Figura 15	Contenido de proteína en ECE y biomasa producidas por FMS utilizando PUF como soporte; fermentación con pectina como única fuente de carbono..... 58

Figura 16	Contenido de proteína en ECE y biomasa producidas por FMS utilizando PUF como soporte; fermentación con sacarosa como única fuente de carbono.....	59
Figura 17	Actividad EP producida por FMS utilizando PUF como soporte; fermentación con pectina como única fuente de carbono.....	60
Figura 18	Actividad EP producida por FMS utilizando PUF como soporte; fermentación con sacarosa como única fuente de carbono.....	60
Figura 19	Gráfica comparativa de la actividad EP volumétrica obtenida en diferentes experimentos a 24 h de fermentación.....	62
Figura 20	Gráfica comparativa de la actividad EP específica obtenida en diferentes experimentos a 24 h de fermentación.....	63
Figura 21	Gráfica de velocidad inicial (V_0) en función de la concentración inicial de sustrato (S_0) para las EP producidas por FMS sobre PUF.....	65
Figura 22	Cinética enzimática de las EP bajo el modelo de Michaelis-Menten.....	65
Figura 23	Cinética enzimática de las EP bajo el modelo de Lineweaver-Burk.....	66
Figura 24	Contenido de proteína en ECE y biomasa producidas por FML en un medio con pectina y sacarosa como fuente de carbono.....	68
Figura 25	Contenido de proteína en ECE y biomasa producidas por FML en un medio con pectina como única fuente de carbono	68
Figura 26	Actividad EP obtenida por FML en un medio con pectina como única fuente de carbono.....	69
Figura 27	Patrón electroforético de las proteínas extracelulares producidas por <i>A. niger</i> en FMS sobre PUF.....	71

I. INTRODUCCION.

Las pectinasas son un conjunto de enzimas capaces de hidrolizar a la pectina, la cual es un polisacárido formado principalmente por unidades de ácido D-galacturónico, que puede 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 nivel industrial. El método usual de producción de las pectinasas es por fermentación en medio líquido (FML), en el que se utilizan medios de cultivo sintéticos y medios de cultivo a base 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 *et al.*, 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 y el salvado de trigo (Ghildyal *et al.*, 1981; Qadeer *et al.*, 1985; Budiatman y Lonsane, 1987); sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la influencia de la composición del medio de cultivo embebido en el soporte sólido. La composición del medio de cultivo es un factor importante ya que influye sobre la diversidad de la síntesis y la cantidad producida de estas enzimas.

Los estudios sobre la producción de enzimas en medio sólido utilizando medios de cultivo sintéticos, embebidos sobre un soporte inerte permiten dilucidar el comportamiento de los hongos filamentosos respecto a la

composición del medio de cultivo (Solís-Pereyra *et al.* 1993), la influencia de la actividad de agua (a_w) (Acuña-Argüelles *et al.*, 1994), la liberación de calor, así como la influencia de la transferencia de gases (Oriol *et al.*, 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 *et al.*, 1985).

En esta tesis se muestran los estudios realizados para evaluar la espuma de poliuretano (PUF) como soporte en la FMS para producir exopoligalacturonasas (EP).

II. MARCO TEORICO.

Las enzimas pectinasas se producen en las plantas superiores pero también se sintetizan por algunos microorganismos. Las pectinasas actúan sobre una gran variedad de sustancias pécticas, que se encuentran como polisacáridos formando parte de las paredes celulares de las células de las plantas superiores. Como las sustancias pécticas son elementos estructurales de las capas intermedia y primaria de la pared celular de los vegetales superiores, las alteraciones en su grado de polimerización y esterificación pueden producir cambios en la textura de las frutas y legumbres durante la maduración, durante el almacenamiento o durante su procesado. Las pectinasas nativas de la planta pueden alterar las sustancias pécticas endógenas, y las pectinasas de microorganismos pueden ser las responsables, en gran parte, del deterioro y la putrefacción tras la recolección de ciertas frutas y verduras frescas así como cambios de su textura (Fennema, 1993).

1. ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS PECTINAS.

Las sustancias pécticas (Figura 1) 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 de las paredes celulares de los vegetales, proporcionando firmeza de algunos de ellos.

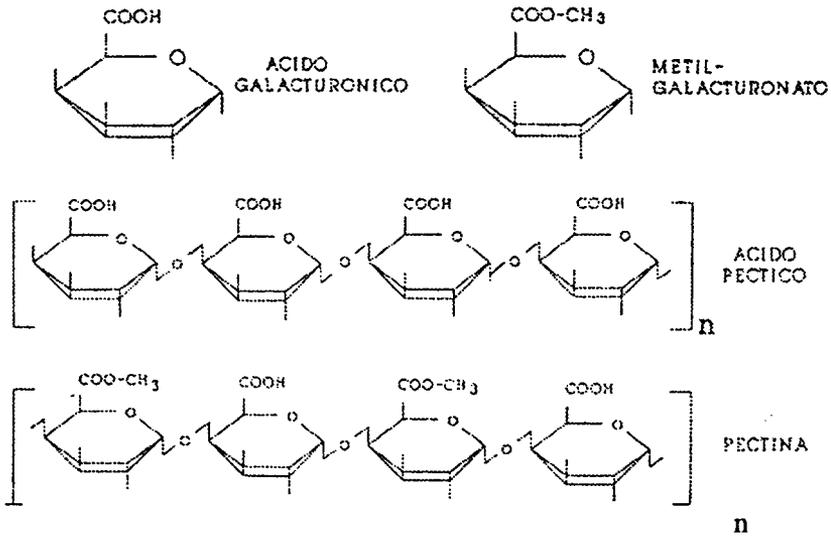


Figura 1. Estructura química de pectina (Fennema, 1993; modificado).

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 sólo 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 (Baduí, 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 aún 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).

1.1. 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 yogurts, así como también se usa como texturizante en helados, salsa, jarabes y refrescos (Minjares, 1992)

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, pues 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°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 está 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 hasta 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. PECTINASAS.

Las pectinasas se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a su forma de actuar sobre el polisacárido, se encuentran las pectinmetilesterasas, las poligalacturonasas (endo y exo), y las pectin y pectato liasas. En la Tabla 1 se aprecian diferentes enzimas pectinasas, su fuente y algunas propiedades fisicoquímicas (Pilnik *et al.*, 1973); como se observa, las pectinesterasas y poligalacturonasas pueden ser de origen vegetal o microbiano, mientras que las pectin y pectato liasas son sintetizadas por microorganismos.

2.1. PECTINESTERASAS.

Las pectinesterasas transforman a la pectina metoxilada en pectina de bajo metoxilo o pectato. Al actuar producen metanol a partir de los grupos carboxilos esterificados (Figura 2; Fennema, 1993). 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 péctica 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 ester metílicos de otros compuestos (Fennema, 1993).

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

Enzima y fuente	Peso molecular	Punto isoelectrico	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 multifementans</i>	400 000		9.0	Complejo con PAL
POLIGALACTURONASAS				
Tomate	44 000		4.5	endo, multiples formas
	84 000			
<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	formas
<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	9.4	9.8	endo, formada por 4 moléculas
	36 000			
<i>Erwinia aroideae</i>	37 000		9.1	endo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42 300	10.3	9.4	endo
<i>Clostridium multifementans</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	

(Pilnik *et al.*, 1973)

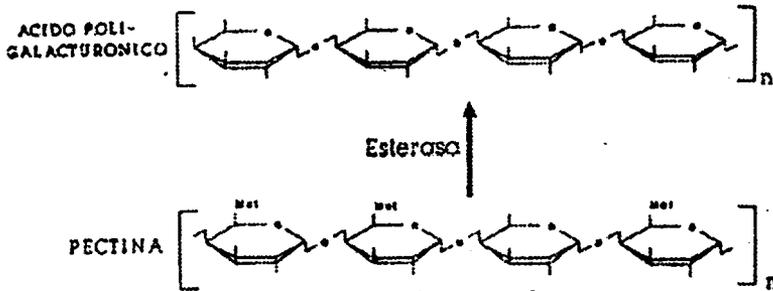


Figura 2. Acción de las pectinesterasas (Fennema, 1993; modificado).

2.2. POLIGALACTURONASAS.

Las poligalacturonasas son enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico contiguo al grupo carboxilo libre (Figura 3; Fennema, 1993); en consecuencia, las pectinas de alto metoxilo se hidrolizan muy lentamente, mientras que las de bajo metoxilo son buen sustrato considerándose al pectato como el mejor.

Las poligalacturonasas son producidas por la mayoría de los hongos, por levaduras y también por algunas bacterias (Rombouts y Pilnik, 1980). Su pH óptimo se estima entre 4.0 y 5.5. Se han reconocido endo y exopoligalacturonasas; las endopoligalacturonasas (*poli (1,4- α -D-galacturónido) glicano hidrolasa*, EC. 3.2.1.15) atacan a la cadena péctica al azar; un pequeño incremento en grupos reductores se manifiesta con un fuerte descenso de la viscosidad de la solución que contiene el sustrato. Las exopoligalacturonasas (*poli (1,4- α -D-galacturónido) galacturono hidrolasa*, EC. 3.2.1.67) atacan del

lado no reductor del polímero formando mono- ó dimeros, trayendo como consecuencia una muy lenta disminución de la viscosidad (Baduí, 1990).

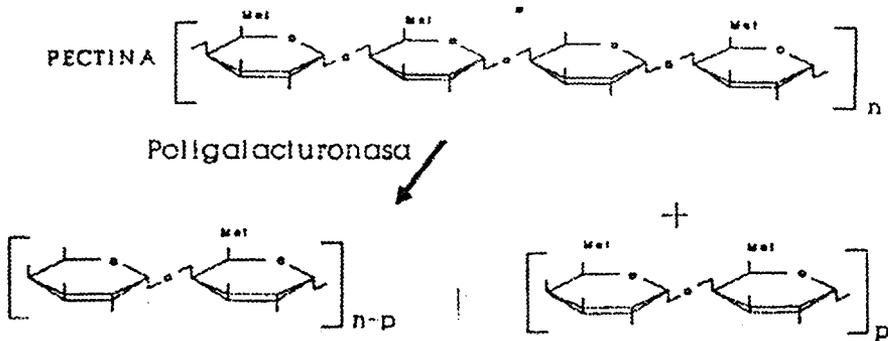


Figura 3. Acción de las poligalacturonasas (Fennema, 1993; modificado).

2.3. PECTATO Y PECTIN LIASAS.

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 (Fig. 4; Fennema, 1993). Al igual que las poligalacturonasas, éstas actúan del lado donde se encuentra más cercano el grupo carboxilo libre, y también se encuentran endo y exopectatoliasas. Para las 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 frutas o su procesamiento (Pilnik *et al.*, 1973).

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; su 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).

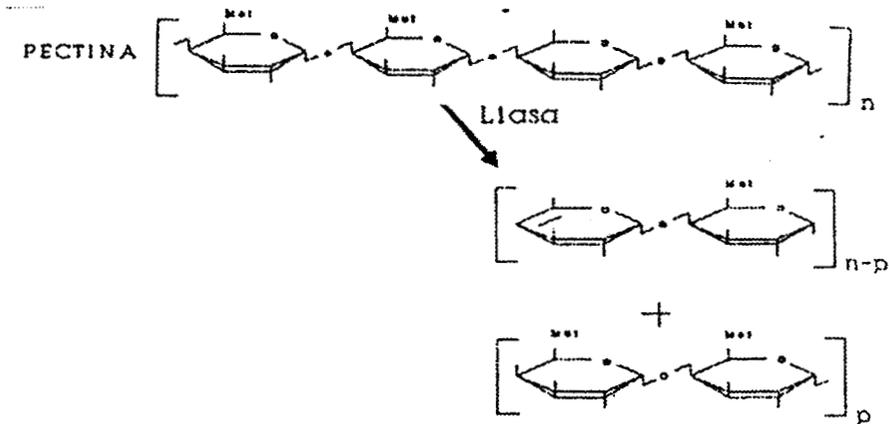


Figura 4. Acción de las pectato liasas (Fennema, 1993; modificado).

2.4. UTILIDAD DE LAS PECTINASAS.

La adición de enzimas pectinolíticas a los jugos de fruta, o bien a las frutas trituradas antes de su prensado, es una práctica general en muchas industrias alimentarias la cual 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:

- Incremento en rendimientos.

Esto es más efectivo, cuando el tratamiento con pectinasas (mezcla de endo y exo poligalacturonasas) se realiza sobre la fruta en el triturador. 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. Con ello, el volumen de jugo "flor" aumenta considerablemente y los orujos rinden mayor jugo prensado. 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 benéficos, por ejemplo: menores pérdidas de jugo en la filtración, obtención de lodos más compactos, etc. (Pilnik *et al.*, 1973).

- 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 -sabemos- 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 exopoligalacturonas, determinan una brillantez muy notable (Velasco, 1968).

- Eliminación de problemas de filtración.

Precisamente, por el hecho de que la pectina convierte a los jugos, mosto, etc., en suspensiones coloidales de alta viscosidad, es que resulta tan 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, es fácil comprender que la filtración se facilite en grado superlativo.

- Extracción mejor y más rápida 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).

- Reducción del tiempo de la fermentación.

La ruta bioquímica que sigue la despectinización, es decir, la liberación de monómeros o dímeros de ácido poligalacturónico principalmente por las exopoligalacturonasas, presenta una influencia sobre el tiempo de la fermentación. Parece ser que los mostos cuando se enriquecen con materiales fermentables (como son las unidades del ácido galacturónico, o bien los polímeros de él no muy grandes) permite una vigorización de las levaduras, las cuales realizan su labor en forma más acelerada. 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 (PM 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, de ésteres y de materiales que comunican el aroma y el bouquet característico al producto final (Neubeck, 1975).

- Consideraciones económicas.

La suma de todas las economías que produce el tratamiento enzimático con pectinasas, comparada con su costo, debe mostrar un saldo favorable al proceso. Recordemos algunas de ellas: aumento en el rendimiento de jugos, mostos, etc. Aquí hemos de considerar: jugo libre, jugo prensado, menores pérdidas por filtración, trasiegos más voluminosos, lodos más compactos, etc. Otros puntos son: la 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).

Por otra parte, la acción de las pectinasas se observa claramente en la elaboración de jugos y mostos concentrados, ello debido a que la pectina presenta una tendencia a gelificarse en presencia de moléculas de azúcar que se encuentran disponibles, las cuales, se sabe son abundantes en los jugos de frutas. A mayor cantidad de azúcares, existe una mayor tendencia de la pectina a formar dichos geles; por lo tanto, a medida que el jugo o mosto pierde agua se incrementa la aparición de tales coloides semisólidos, cuando la concentración de los azúcares alcanza el 65%, se constituyen verdaderas gelatinas de la firmeza característica en los productos comerciales. (Pilnik, *et al.*, 1973). El grado de esterificación del carboxilo de los ácidos galacturónicos de la pectina con metanol, juega un papel importante en este fenómeno. Las pectinas de baja metoxilación forman geles en presencia de iones de calcio, a concentraciones azucaradas muy bajas (Baduí, 1990).

2.5. PRODUCCION.

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. Las empresas dedicadas a su producción se enfrentan con el problema de hacer más eficiente su síntesis, obteniendo preparaciones enzimáticas más puras, más concentradas y de mayor calidad a costos más bajos (Minjares, 1992). Actualmente, la síntesis de enzimas a nivel industrial por vía microbiana, requiere de microorganismos altamente productivos para reducir los costos de producción (Solís-Pereyra *et al.*, 1990). Por otra parte, existen restricciones sobre el uso de microorganismos que producen pectinasas. Estas restricciones son 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 algunos casos son producidas en forma constitutiva (Tsuyumu, 1977; Tsuyumu, 1979).

Las pectinasas fúngicas que se producen comercialmente consisten en mezclas de pectinesterasas, pectin liasas y poligalacturonasas, 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 FML, o FMS. El primer método es más 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 *et al.*, 1991) obtenida a una concentración mayor y es relativamente más económico (Ghildyal *et al.*, 1981; Pandey, 1992).

3. FERMENTACION.

La fermentación es aquel conjunto de reacciones microbianas 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 *et al.*, 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). En ella el sistema está formado por microorganismos inoculados en un medio que consiste de una solución o suspensión acuosa de nutrientes que se agita a fin de obtener un adecuado contacto entre todos los componentes del medio (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 nivel 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 (Minjares, 1992).

La fermentación en medio sólido es “toda aquella en la cual el sustrato no es líquido” (Hesseltine, 1972). La FMS puede ser definida más exactamente 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 pero no excede el nivel de retención máxima de agua de la matriz sólida de manera que se forma una fase gaseosa en los espacios existentes entre las partículas sólidas (Minjares, 1992).

4. REGULACION DE LA SINTESIS DE PECTINASAS.

Aunque los hongos son los principales microorganismos productores de pectinasas a nivel 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 enzima pécticas a un nivel constitutivo sensible a represión catabólica (Leone y Van den Heuvel, 1987). En algunos otros casos, la enzima es inducible (Foda *et al.*, 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 un comportamiento 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 (Foda *et al.*, 1984). El análisis de las condiciones óptimas en el medio de cultivo para la mejor producción de pectinasas con hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, han mostrado que factores como la temperatura, la aireación, el pH y la composición del medio son los factores más importantes, pero que la cantidad de enzima producida a un nivel dado de cada uno de dichos factores varía entre las cepas -incluso de la misma especie- de acuerdo su sensibilidad a las condiciones de cultivo.

En general, se sabe desde ya hace tiempo 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 *et al.*, 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 constitutivo de secreción de enzimas 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 *et al.*, 1984; 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) a baja concentración (Rombouts y Pilnik, 1980). 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, consiste en la inhibición de la síntesis de enzima catabólicas inducibles provocada por la presencia de glucosa en el medio (Herzkowitz, 1977) y es un fenómeno general en los microorganismos.

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 (Maldonado *et al.*, 1989).

Maldonado *et al.*, (1989) encontraron en *Aspergillus niger* evidencias de que el punto de regulación de la pectinesterasa y la poligalacturonasa se encontraba a nivel de transcripción. Minjares (1992), logró obtener mutantes hiperproductoras de pectinasas respecto de la cepa progenitora (*Aspergillus niger* C28B25, seleccionada de entre 248 cepas de zonas cafetaleras del país por su producción de pectinasas), tanto en FML como en FMS, aislando cepas resistentes a un análogo tóxico de glucosa, la 2-desoxiglucoisa, combinado con un depresor de agua, el etilenglicol, para imponer una presión selectiva sobre las esporas de la cepa progenitora tratadas con luz ultravioleta.

III. ANTECEDENTES.

Trejo-Hernández *et al.* en 1991, estudiaron la producción de pectinasas de *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. y *Rhizopus oryzae* por FML; el medio contenía pectina y sacarosa como fuente de carbono, y encontraron los resultados del crecimiento para las tres cepas que se muestran en la Tabla 2.

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 (UI/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</i> sp.	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

(Trejo-Hernández *et al.*, 1991)

Con relación a la producción de pectinasas, se observó que *R. oryzae*, se caracterizó por una baja producción; al contrario para *A. niger* donde su biomasa obtenida fue menor, la producción de pectinasas apareció a partir de las 48 h y fue más importante que la de *R. oryzae*. En la cepa de *Penicillium* sp., se observó que la producción de pectinasas era alta pero apareció mucho más tarde, alrededor de 120 h de cultivo. Lo anterior, hace pensar que la

sacarosa presenta un efecto de represión catabólica de la síntesis de las enzimas pécticas para *Penicillium* sp. Esto no se observó con *A. niger*, dado que la actividad Pectinolítica apareció en 48 h, antes de la utilización completa de dicha fuente de carbono. En consecuencia se seleccionó *A. niger* por su mayor capacidad para sintetizar pectinasas en un medio a base de pectina y sacarosa (Trejo-Hernández *et al.*, 1991).

Acuña-Argüelles *et al.*, (1995) evaluaron las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de tres enzimas pectinolíticas producidas por *Aspergillus niger* por FMS y FML, donde obtuvieron, primeramente altas productividades (la productividad es calculada como: (actividad)(volumen del reactor)⁻¹(tiempo de producción máxima)⁻¹) de endo-, exopoligalacturonasas y pectin liasas con la FMS en comparación con la 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 endopoligalacturonasas y pectin-liasas fueron más altas que las obtenidas por FML (Tabla 4).

Tabla 3. Productividad máxima de las pectinasas producidas por *A. niger* CH4 en fermentaciones en estado sólido y líquido.

Actividad	Productividad (UI mL ⁻¹ h ⁻¹)		Relación de productividad (Sólido/líquido)
	FMS	FML	
Endo-pectinasa	0.06	0.01	6.05
Exo-pectinasa	0.14	0.0002	51.47
Pectinliasa	0.008	0.0002	29.2

(Acuña-Argüelles *et al.*, 1995)

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

Actividad enzimática	Km (mg/mL)	
	FMS	FML
Exo-pectinasa	2.05	5.42
Endo-pectinasa	270.4	69.4
Pectin-liasa	12.8	2.28

(Acuña-Argüelles *et al.*, 1995)

También encontraron a través de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), que el extracto crudo enzimático (ECE) producido por FMS, presentó el mismo número de bandas que el producido por FML, pero con algunas diferencias de posición sobre el gel.

IV. JUSTIFICACION.

Acuña-Argüelles *et al.* (1995) observaron que las pectinasas producidas por FMS utilizando bagazo de caña como soporte presentaron una mayor actividad, una mayor relación de productividad y en especial las exopoligalacturonas (EP) presentaron una K_m menor que las obtenidas por FML. Las exopoligalacturonas producidas por FMS presentaron mayor afinidad por su sustrato, en comparación a las que se producen por FML (Acuña-Argüelles *et al.*, 1995).

A últimas fechas se han ido incrementando las ventajas que tiene la FMS con respecto a la FML, principalmente en la producción de metabolitos de origen fúngico y especialmente en la producción de enzimas. Sin embargo una de las desventajas críticas de la FMS es el uso de desechos de la agricultura, tales como salvado de trigo, bagazo de caña, borra de café, etc., con los cuales se obtienen ECE con muy bajas actividades específicas, pues se producen gran cantidad de otras proteínas de las deseadas. Esas proteínas representan un problema cuando se trata de obtener un producto con alto grado de pureza.

Zhu *et al.* (1994 y 1996) retomaron la idea de Fujishima *et al.* (1972) de utilizar la espuma de poliuretano (PUF) como soporte de las FMS, para la producción de nucleasa P1, donde encontraron que la actividad específica de la nucleasa P1 es 4 veces mayor cuando se produce sobre PUF, en comparación con la producida sobre salvado de trigo y 20 veces mayor en comparación con la FML; además lograron reducir los tiempos de fermentación para la obtención de la enzima.

Observando que las EP presentan afinidades mayores por su sustrato cuando se producen por FMS (ver Tabla 4) y que las técnicas de cuantificación enzimática son menos complicadas en comparación con las técnicas empleadas para cuantificar la actividad de las otras pectinasas, se decidió trabajar en las FMS utilizando PUF como soporte para producir exopoligalacturonas, esperando obtener extractos crudos con actividades específicas mayores que las obtenidas por FML y FMS sobre bagazo de caña.

V. HIPOTESIS.

El cultivar *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido sobre un soporte como espuma de poliuretano que se supone inerte, ocasionará cambios fisiológicos en el hongo que se reflejarán en una fermentación mejor dirigida, hacia la producción de las enzimas exopoligalacturonas, esperando reducir el tiempo de fermentación y aumentar la actividad específica del extracto crudo enzimático, pues la síntesis de metabolitos indeseables se reducirá, en comparación con lo obtenido por otros sistemas como la fermentación en medio líquido o la fermentación en medio sólido utilizando bagazo de caña como soporte.

VI. OBJETIVOS.

1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la espuma de poliuretano como soporte para la fermentación en medio sólido para la producción de un extracto crudo enzimático con actividad de exopoligalacturonasa de *Aspergillus niger*.

2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Establecer las condiciones de fermentación para la producción de enzimas exopoligalacturonas en FMS por *Aspergillus niger*, utilizando PUF como soporte inerte.
2. Realizar la caracterización fisicoquímica parcial del ECE (actividad volumétrica, concentración de proteína y perfil electroforético).

VII. METAS.

1. Evaluación de la concentración del inóculo, concentración de oligoelementos y concentración de sacarosa en el medio para producir exopoligalacturonas por FMS utilizando PUF como soporte y estimar el tiempo de fermentación donde se observe la mayor actividad enzimática.
2. Comparar la actividad volumétrica, actividad específica y productividad de las exopoligalacturonas de *A. niger* C28B25 obtenidas por FML y FMS utilizando como soporte, tanto bagazo de caña como PUF.
3. Determinar el patrón electroforético del ECE y calcular el peso molecular aproximado de los polipéptidos obtenidos en la FMS utilizando PUF como soporte.
4. Contribuir con los resultados obtenidos, para la purificación y caracterización de las enzimas exopoligalacturonas producidas por FMS utilizando como soporte PUF.

VIII. MATERIALES Y METODOS.

1. GENERALES.

1.1. Cepa de *Aspergillus niger*.

La cepa que se utilizó para el desarrollo de este trabajo fue *Aspergillus niger* C28B25 reportada como una cepa sobreproductora de pectinasas que proviene de la colección de mohos UAM-ORSTOM (Antier *et al.*, 1993). La cepa se propagó a 35 °C por 72 h y se mantuvo en agar papa-dextrosa a una temperatura de 4°C para utilizarse en todas las fermentaciones realizadas.

1.2. Determinación de actividad Exopoligalacturonasa.

La actividad exopoligalacturonasa se determinó en cada etapa de las fermentaciones de todos los experimentos por el método del Acido Dinitrosalicílico (DNS) para evaluación del incremento de los azúcares reductores (Miller, 1959), bajo la siguiente metodología:

En cada tubo de reacción se colocó a) 1 mL de sustrato (10 mg/mL de ácido poligalacturónico) en solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, 0.1M, b) 990 µL de solución amortiguadora de acetatos a pH de 4.5 0.1M y c) 10 µL de ECE, y se incubaron a 45°C por 15 min. Al término de este tiempo se agregaron 4 mL del reactivo de DNS. Se preparó una curva de calibración de cero hasta 800 µg de ácido galacturónico, y todos los tubos (los de la curva y los de la determinación de actividad), se introdujeron en un baño María a temperatura de ebullición durante 15 min para desarrollar el color y se leyó la absorbancia a 575 nm.

Una unidad de exopoligalacturonasa se consideró como la cantidad de enzima que libera un micromol de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones de experimentación (Acuña-Argüelles *et al.*, 1995). De acuerdo con este análisis, se obtuvo el valor de la actividad volumétrica. La actividad específica es el cociente de la actividad volumétrica entre la concentración de proteína presente en el ECE.

1.3. Determinación de la concentración de proteína en el ECE.

Se determinó la concentración de proteína en el ECE (libre de células) por el método del colorante ligado a la proteína con el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Protein Essay; Bradford, 1976) en cada etapa de las fermentaciones (FMS sobre PUF y bagazo de caña y FML). A 50 μ L de extracto crudo se le adicionaron 200 μ L del reactivo, todo en una solución amortiguadora 0.1 M de acetatos a pH 4.5; se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar.

1.4. Determinación de biomasa.

La biomasa producida por FML, se retuvo por filtración, se lavó con una solución amortiguadora 0.1 M de acetatos a pH de 4.5, se secó hasta peso constante y se pesó; en el caso de la FMS utilizando PUF, la biomasa se cuantificó por diferencia de peso seco de la espuma antes y después de la fermentación, en este caso, después de que se obtuvo el ECE por presión, la espuma de poliuretano se lavó con agua desionizada y se deshidrató hasta obtener peso constante (Zhu *et al.*, 1994).

2. PRODUCCION DE EXOPOLIGALACTURONAS POR FMS UTILIZANDO BAGAZO DE CAÑA COMO SOPORTE.

2.1. FMS utilizando bagazo de caña como soporte.

La fermentación sólida, se realizó en un medio cuya composición se muestra en la Tabla 5. Todos los nutrientes se disolvieron en 80% del total del agua, se mezclaron con el bagazo de caña de azúcar, el cual fue previamente lavado tres veces con agua a temperatura de ebullición, luego se esterilizaron a 121 °C por 15 min. Después que el medio se enfrió, se inoculó con una suspensión concentrada de esporas de *A. niger* C28B25 (2×10^7 esporas/g de materia seca) de tres días de resiembra. Al inicio de la fermentación, el pH y el contenido de humedad fueron de 4.5 y 70% respectivamente. La fermentación se mantuvo a 35 °C por 72 h, se usaron columnas de vidrio empacadas con una densidad de 0.3 g/cm³ y una velocidad de aireación de 60 mL de aire saturado/min (Acuña-Argüelles *et al.*, 1995).

2.2. Obtención del ECE.

El material fermentado se mezcló con agua destilada en cantidades iguales (p/v) e inmediatamente se prensó a 87 kg/cm² en una prensa hidráulica (Acuña-Argüelles *et al.*, 1995), el extracto se filtró a través de membranas Millipore de 0.8 y después por 0.4 µm de tamaño de poro.

Tabla 5. Composición del medio utilizado para producir pectinasas por FMS en bagazo de caña.

Constituyente	g constituyente/100 g medio
Pectina	1.5
Sacarosa	3.14
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.26
K ₂ HPO ₄	0.65
Urea	0.3
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.02
FeSO ₄	0.029
Agua	70
Bagazo de caña	23.1

(Acuña-Argüelles *et al.*, 1995)

3. PRODUCCION DE EXOPOLIGALACTURONASAS POR FMS UTILIZANDO PUF COMO SOPORTE.

3.1. Evaluación de PUF como soporte para la producción de exopoligalacturonas por FMS.

La FMS utilizando PUF se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL; a cada matraz se le agregó 0.5 g de PUF en forma de cubos (0.5 cm³) (Zhu *et al.*, 1994). Se partió de un medio el cual se reporta en la Tabla 5, al cual se le sustituyó el bagazo de caña por 3.35 g. de PUF y 19.64 mL más de agua, de éste medio se adsorbieron aproximadamente 28 mL por cada gramo de PUF. La actividad de agua (*a_w*) fue de 0.995, medida en un Aqua Lab CX-2 (Labsen Scientific CO).

Se realizó una fermentación preliminar para determinar la viabilidad de producir enzimas con actividad exopoligalacturonasa sobre PUF, para hacerlo se preparó un experimento con el medio y condiciones antes mencionadas, se esterilizó a 121 °C por 15 min, se inoculó con una suspensión de esporas de *Aspergillus niger* C28B25 de 3 días de resiembra a una concentración de 5×10^7 esporas/g de fuente de carbono (Zhu *et al.*, 1996); el pH se ajustó a 4.5, se incubaron a 35 °C y se agitaron manualmente 3 veces al día; la fermentación se monitoreó de las 24 hasta 72 h; se evaluaron: actividad exopoligalacturonasa, concentración de proteína en el ECE y biomasa.

3.1.1. Obtención del ECE.

Al término de la fermentación, el PUF se prensó en un embudo Buckner y el extracto se filtró a través de membranas Millipore de 0.8 y después por 0.4 µm de tamaño de poro, el matraz y la espuma se lavaron con agua en una cantidad igual al volumen de extracto obtenido, y se mezclaron, esto se realizó con la finalidad de solubilizar a toda la proteína presente. Esto se hizo en cada fermentación realizada.

3.2. Efecto de la adición de oligoelementos al medio sobre la actividad enzimática obtenida por FMS sobre PUF.

Se realizó una fermentación bajo las mismas condiciones que la anterior, pero además, se agregaron oligoelementos en una cantidad de 1ml por cada litro de medio de una mezcla compuesta por $MnCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$ a una concentración de 0.001 g/L. La cinética se realizó hasta la 48 h realizando

mediciones cada 12 h Se realizaron las mismas determinaciones que en el experimento anterior.

3.3. Efecto del incremento de las esporas inoculadas sobre la actividad exopoligalacturonasa obtenida por FMS.

En este experimento se inoculó el medio con el doble de esporas (1×10^8 esporas/g de fuente de carbono) que en las anteriores fermentaciones para observar el efecto sobre la producción de las enzimas de interés, las demás variables se mantuvieron constantes.

3.4. Experimento factorial fraccionado para incrementar la producción de exopoligalacturonasas por FMS utilizando PUF como soporte.

Con el fin de incrementar la actividad exopoligalacturonasa obtenida en los experimentos anteriores se diseñó un experimento factorial fraccionado; se identificaron como variables con efecto sobre esta actividad: la cantidad de oligoelementos adicionados al medio, la concentración de sacarosa y la de esporas inoculadas. En la Tabla 6 se muestra el nivel basal, así como las unidades de variación que fueron el 30% mas y menos con respecto a ese nivel basal. En la Tabla 7 se muestra la distribución de los tratamientos.

Tabla 6. Nivel basal y unidades de variación empleadas en el diseño factorial.

Componente	Nivel Basal	Unidades de variación (30%)
Oligoelementos	1ml/L medio	0.3
Sacarosa	31.9 g/L	9.6
Inóculo	1X10 ⁸ esporas/g fuente de carbono	3X10 ⁷

Tabla 7. Distribución de los tratamientos de acuerdo con el experimento diseñado.

Tratamiento	Oligoelementos mL/L	Sacarosa g/L	Inóculo esporas/g fuente de carbono
1	0.7	22.33	7X10 ⁷
2	0.7	22.33	1.3X10 ⁸
3	0.7	41.47	7X10 ⁷
4	0.7	41.47	1.3X10 ⁸
5	1.3	22.33	7X10 ⁷
6	1.3	22.33	1.3X10 ⁸
7	1.3	41.47	7X10 ⁷
8	1.3	41.47	1.3X10 ⁸

La fermentación se realizó a 35 °C por 24 h a pH inicial de 4.5 y se evaluaron la actividad volumétrica y específica como variables respuesta.

3.5. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la actividad exopoligalacturonasa.

Se realizó una fermentación con diferentes concentraciones de sacarosa (40, 60, 80 y 100 g/L) a 3 tiempos de fermentación (24, 36 y 48 h). El pH inicial de la fermentación fue de 4.5 y la temperatura de 35 °C.

3.6. Evaluación del efecto que tiene una sola fuente de carbono sobre la producción de exopoligalacturonasas.

Se realizó una fermentación en la cual se agregó solo pectina y otra con solo sacarosa, a una concentración de 55 g/L, se tomaron 3 tiempos de fermentación (24, 36 y 48 h), se evaluaron actividad volumétrica, concentración de proteína en el ECE, actividad específica y biomasa producida.

3.7. Evaluación de la K_m y V_{max} de las exopoligalacturonasas en el ECE.

Se obtuvo ECE con actividad exopoligalacturonasa, bajo las mejores condiciones de fermentación, y se realizó la cinética enzimática a este extracto. Se establecieron 9 concentraciones de sustrato (1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 y 25 mg de ácido poligalacturónico/mL), donde a 5 tiempos (3, 6, 9, 12 y 15 minutos) se determinó la aparición de ácido galacturónico como producto.

4. PRODUCCION DE EXOPOLIGALACTURONASAS POR FML.

4.1. FML para producción de exopoligalacturonas.

Se realizaron dos fermentaciones en medio líquido, en la primera se empleó el medio utilizado para producción de exopoligalacturonas por FMS utilizando PUF, y en la otra fermentación se utilizó el mismo medio solo que sin sacarosa. La primera fermentación se realizó con el fin de comparar los resultados con los obtenidos por FMS, pues los altos niveles de sacarosa podrían presentar represión catabólica de las enzimas EP en la FML; y la segunda, como contraste y comparación con la FMS.

4.2. Obtención del ECE.

El medio de fermentación se filtró a través de papel Whatman No. 1 para retener la biomasa y después se filtró con membranas Millipore (0.45 μm de tamaño de poro).

5. ELECTROFORESIS.

Se realizaron geles al 9% de acrilamida en presencia de sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), para analizar la composición polipeptídica del ECE obtenido por FMS utilizando PUF como soporte; se aplicó un voltaje constante de 100 V por aproximadamente una hora. Se usaron marcadores de peso molecular conocido. La tinción de los geles se realizó con plata (Kit de tinción de Bio Rad).

6. ANALISIS ESTADISTICOS.

Todos los análisis y determinaciones se hicieron por triplicado. El análisis del diseño factorial fraccionado se llevó a cabo según el método utilizado por Zhu *et al.* (1996). Y las diferencias entre las medias se llevó a cabo por medio de la distribución de T de Student usando como $\rho=0.005$ como nivel estadístico de significancia.

IX. RESULTADOS Y DISCUSION.

1. PRODUCCION DE EXOPOLIGALACTURONASAS POR FMS UTILIZANDO BAGAZO DE CAÑA COMO SOPORTE.

En esta fermentación se evaluaron: la concentración de proteínas, que fue de 0.52 ± 0.02 mg/mL de ECE, y la actividad exopoligalacturonasa volumétrica, que taró un valor de 14.00 ± 0.06 UI/mL de ECE, la actividad específica fue de 26.87 ± 0.10 UI/mg de proteína. La productividad obtenida en esta fermentación fue de 0.19 ± 0.06 Uml⁻¹h⁻¹, que fue similar a la obtenida por Acuña-Argüelles *et al.* (1995) (0.14 Uml⁻¹h⁻¹), por lo que se consideró que las cepas C28B25 de este estudio y la CH4 de Acuña-Argüelles *et al.* (1995) tenían una actividad productora de pectinasas muy parecida.

2. PRODUCCION DE EXOPOLIGALACTURONASAS POR FMS UTILIZANDO PUF COMO SOPORTE.

2.1 Evaluación de PUF como soporte para la producción de exopoligalacturonas por FMS.

Este experimento se realizó de las 24 hasta las 72 h basándose en los experimentos de Acuña-Argüelles *et al.* (1995), donde el tiempo de máxima actividad producida por FMS sobre bagazo de caña fue a las 72 h En esta

fermentación se buscaba evaluar a la PUF como soporte en la FMS para producir exopoligalacturonas, y se encontró que *Aspergillus niger* si puede crecer sobre PUF y que la biomasa se puede cuantificar, como se puede observar en la Figura 5 (a), a las 24 h la cantidad de biomasa fue de 0.56 ± 0.01 g/g PUF, y se incrementó al paso del tiempo hasta 0.88 ± 0.01 g/g PUF a las 72 h de fermentación. Con respecto a la concentración de proteína en el ECE, a las 24 h fue de 0.11 ± 0.00 mg/mL hasta alcanzar el valor de 0.45 ± 0.01 mg/mL a las 72 h, y aparentemente es un valor cercano al que se obtuvo al mismo tiempo de fermentación por FMS sobre bagazo de caña (ver experimento anterior).

Al evaluar la actividad volumétrica en el ECE se encontró a las 24 h 2.84 ± 0.08 UI/mL de ECE y de 2.78 ± 0.10 UI/mL de ECE a las 36 h, no habiendo diferencia significativa entre estos dos resultados ($p > 0.005$), después de este tiempo, la actividad empezó a decrecer como se observa en la Figura 5 (b). En la fermentación realizada sobre bagazo de caña se obtuvo una actividad volumétrica casi 5 veces mayor que sobre PUF. En cambio la actividad específica, que se consideró como una de las variables respuesta de mayor importancia, presentó un valor de 25.02 ± 1.2 UI/mg de proteína a las 24 h, la cual, aparentemente es muy parecida a la obtenida sobre bagazo de caña (26.87 ± 0.10 UI/mg de proteína), pero el tiempo de producción sobre PUF se presentó a las 24 h

De acuerdo a los resultados de actividad exopoligalacturonasa obtenidos en este experimento, se decidió evaluar la fermentación desde las primeras 12 h, pues no se conocía el comportamiento de la fermentación antes de las 24 h.

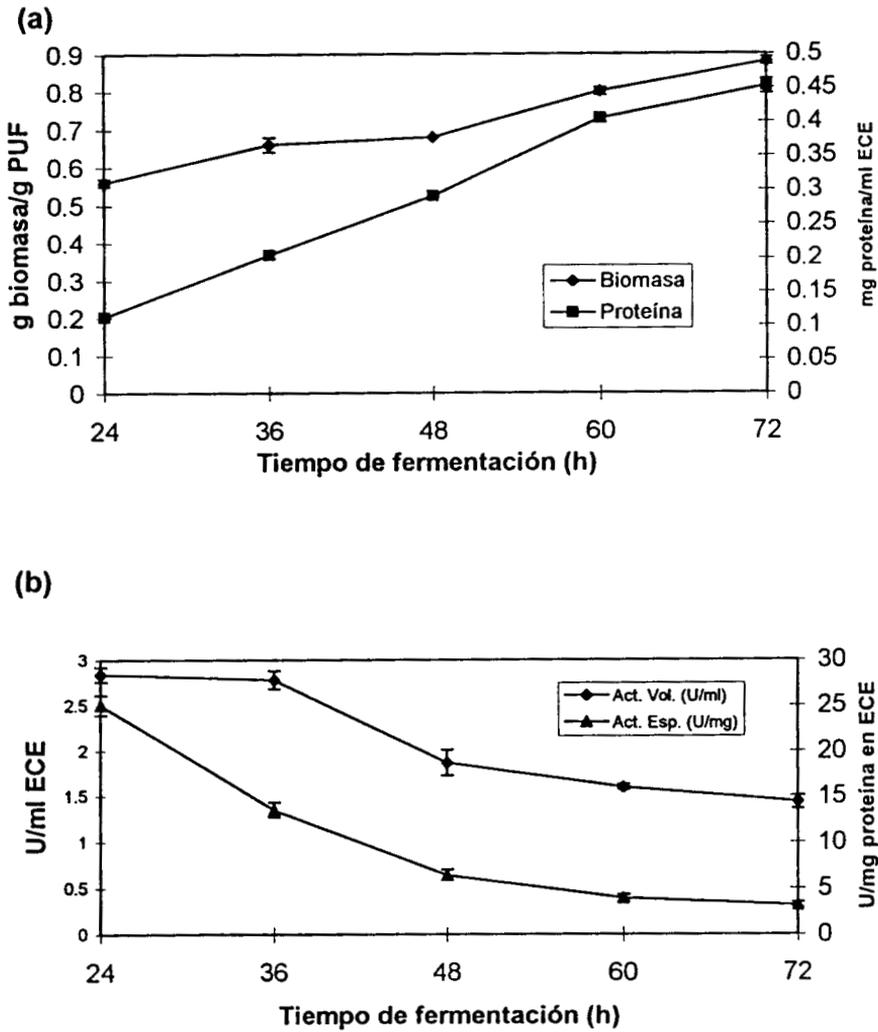


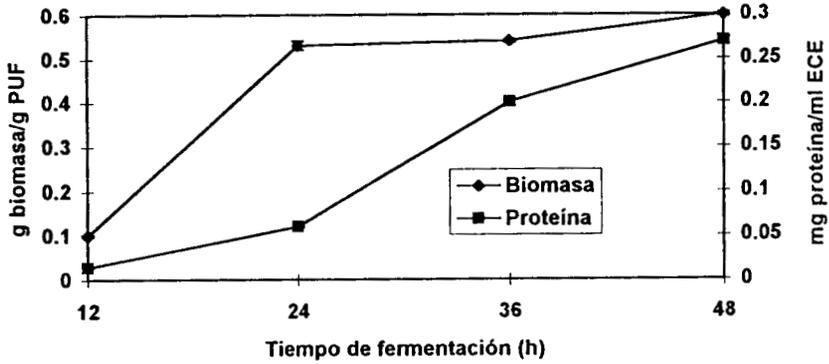
Figura 5. Perfil de proteína en ECE y biomasa (a), actividad exopoligalacturonasa (b) producidas por FMS utilizando PUF como soporte.

2.2 Efecto de la adición de oligoelementos al medio sobre la actividad enzimática.

Esta fermentación se evaluó desde las primeras 12 h hasta las 48 h de fermentación a intervalos de 12 h. En la Figura 6 (a) se muestran los valores obtenidos para la biomasa y proteína producidas en presencia de oligoelementos (ver materiales y métodos); en cuanto a la biomasa se puede apreciar que a las 12 h se obtuvo un valor muy pequeño (0.099 ± 0.00 g/g PUF), y después de las 24 h los valores son muy parecidos a los que se obtuvieron en la primer fermentación (sin oligoelementos); la proteína en el ECE presentó valores muy pequeños, principalmente a las 12 h (0.014 ± 0.00 mg/mL ECE), pero lo interesante en este experimento fue, que a las 24 h se obtuvo aproximadamente la mitad de proteína en comparación con la obtenida en el experimento anterior al mismo tiempo y como se aprecia en la Figura 6 (b), la actividad volumétrica presentó a las 24 h su máximo valor (2.61 ± 0.18 UI/mL de ECE) que aparentemente es muy cercano a la obtenida en el experimento anterior, pero la actividad específica fue de 44.61 ± 3.37 U/mg. de proteína, que es un 78% mayor que la actividad obtenida en el experimento anterior. También se pudo observar que el tiempo de máxima producción de exopoligalacturonasas permanecía a las 24 h.

Con estos resultados se observó que los oligoelementos son necesarios en la fermentación para la síntesis de las exopoligalacturonasas, pues la actividad se incrementó.

(a)



(b)

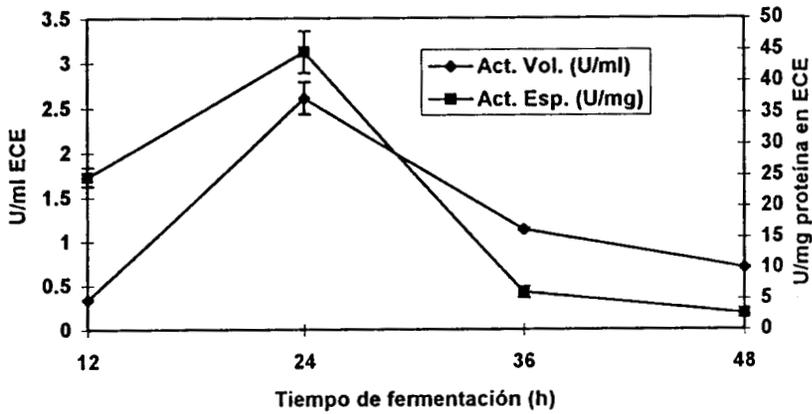


Figura 6. Contenido de proteína en el ECE y biomasa (a), actividad exopoligalacturonasa (b) producidas por FMS utilizando PUF como soporte en presencia de oligoelementos.

2.3. Efecto del incremento de las esporas inoculadas sobre la actividad exopoligalacturonasa obtenida por FMS.

La Figura 7 (a) muestra los resultados obtenidos para la biomasa y concentración de proteína en el ECE en este experimento, se observó que a las 12 h de fermentación la biomasa producida fue aproximadamente el doble en comparación con la obtenida en el experimento anterior, pero después de las 24 h los valores fueron muy similares; en cuanto a la proteína producida, se incrementó a lo largo de la fermentación, pero los valores fueron menores con respecto a los obtenidos en los experimentos anteriores. La actividad volumétrica fue de 5.43 ± 0.24 UI/mL de ECE a las 24 h, y la actividad específica de 80.42 ± 1.13 UI/mg de proteína, y como se puede observar en la Figura 7 (b), el tiempo de máxima actividad se mantuvo a las 24 h de fermentación y tanto la actividad específica como volumétrica se incrementaron aproximadamente al doble comparadas con las obtenidas en el experimento donde se evaluó el efecto de los oligoelementos sobre la actividad exopoligalacturonasa.

Entonces de acuerdo con estos resultados se puede decir que el aumento del doble en el número de esporas inoculadas en presencia de oligoelementos provoca un incremento en la actividad exopoligalacturonasa.

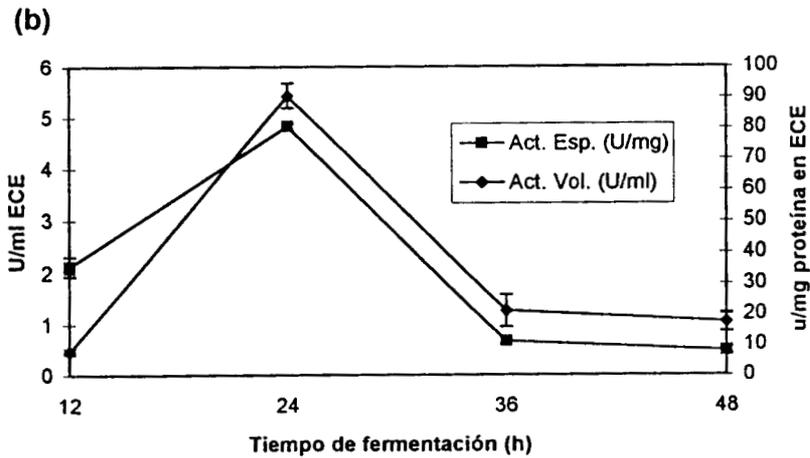
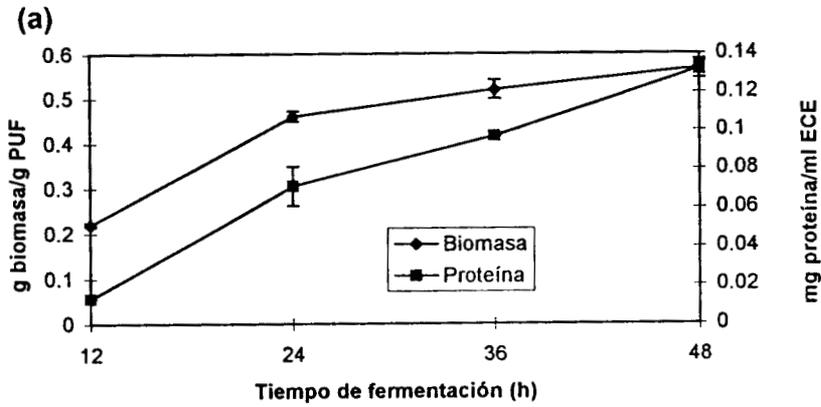


Figura 7. Contenido de proteína en el ECE y biomasa (a), actividad exopoligalacturonasa (b) producidas por FMS utilizando PUF como soporte en presencia de oligolementos y doble cantidad de esporas inoculadas al medio.

2.4. Diseño factorial fraccionado para incrementar la actividad de exopoligalacturonas por FMS utilizando PUF como soporte.

Durante el desarrollo de los experimentos antes descritos se observó que la actividad volumétrica y en especial la específica se incrementaron cuando se adicionaron los oligoelementos y se duplicó el número de esporas inoculadas al medio, de tal manera que se consideraron esas variables para evaluarse dentro de un diseño factorial fraccionado, y observar el efecto que presentarían sobre la actividad exopoligalacturonasa. Se tomaron las condiciones de fermentación del experimento donde se evaluó el efecto del aumento del número de esporas inoculadas al medio como nivel basal, por lo tanto los valores de actividad a compararse fueron: Act. Vol. 5.43 ± 0.24 UI/mL de ECE y Act. Esp. 80.42 ± 1.13 UI/mg de proteína.

En la Figura 8 se puede apreciar que los tratamientos 3, 4, 7 y 8 fueron los que presentaron mayor producción de biomasa, pero menor cantidad de proteína, estos tratamientos tenían en común el nivel superior de sacarosa, lo cual nos muestra que los niveles basales en el número de esporas y la cantidad de oligoelementos eran suficientes para el crecimiento del microorganismo; los valores de proteína en éstos cuatro tratamientos presentaron valores muy semejantes pero menores que los obtenidos en el último experimento (efecto del número de esporas inoculadas sobre la actividad exopoligalacturonasa).

En la Figura 9 se puede observar que la mayor actividad volumétrica la presentaron el tratamiento 4 con 7.6 ± 0.67 UI/mL y el tratamiento 8 con 7.66 ± 0.33 UI/mL, no habiendo diferencia significativa entre ellos ($p > 0.005$),

las variables en común de estos dos tratamientos fueron los niveles superiores de sacarosa y de inóculo, lo cual muestra que las esporas sí tienen un efecto en la producción de enzimas, por otro lado, los oligoelementos no presentaron un efecto marcado, por lo que se consideró que son necesarios pero suficientes en la cantidad inicialmente adicionada (medio basal).

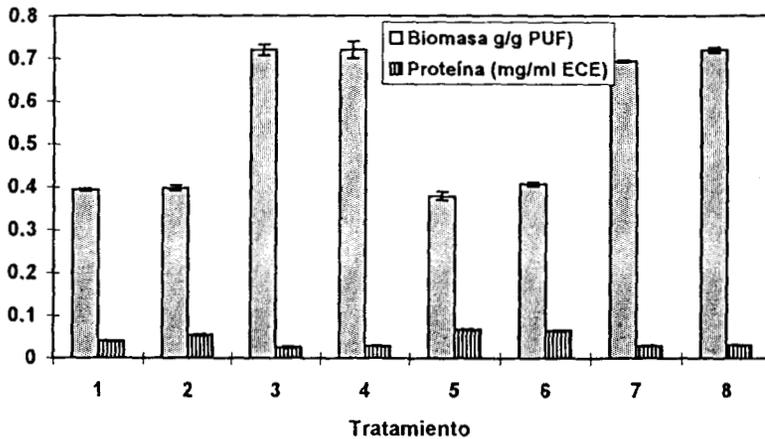


Figura 8. Proteína en el ECE y biomasa producidas en las fermentaciones del experimento factorial fraccionado utilizado para mejorar la producción de las exopoligalacturonas por FMS sobre PUF.

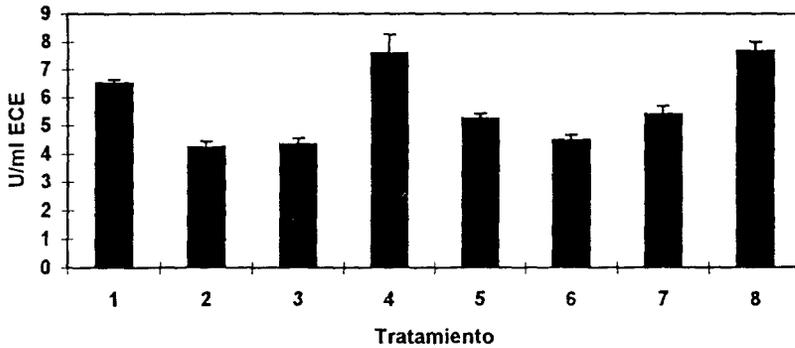


Figura 9. Actividad volumétrica exopoligalacturonasa producida por FMS sobre PUF resultante del experimento factorial fraccionado.

La actividad específica se consideró como la variable respuesta de mayor importancia y los resultados se muestran en la Figura 10 donde se observa que el tratamiento 4 presentó el valor más grande con 258.8 ± 3.35 UI/mg de proteína, en segundo lugar estuvo el tratamiento 8 con 234.7 ± 2.26 UI/mg de proteína, los demás tratamientos estuvieron por debajo de estos valores, con estos resultados se confirma el hecho de que la sacarosa y el número de esporas inoculadas al medio son las variables de mayor efecto sobre la actividad exopoligalacturonasa.

Tomando al tratamiento 4 como el mejor, ya que la actividad específica y volumétrica que presentó fueron los valores mas grandes, se aprecia que la actividad volumétrica se incrementó en un 40% y la actividad específica fue 1.6 veces mayor aproximadamente con respecto al experimento basal, además la actividad específica se aumentó aproximadamente 3 veces en comparación

con la obtenida en el primer experimento con PUF, y 10 veces en comparación con la obtenida por FMS utilizando bagazo de caña como soporte; resultados semejantes obtuvieron Zhu *et al.* en 1996, pues lograron incrementar hasta en 20 veces la actividad específica de la nucleasa P1 en FMS utilizando PUF como soporte en comparación con la obtenida sobre salvado de trigo,

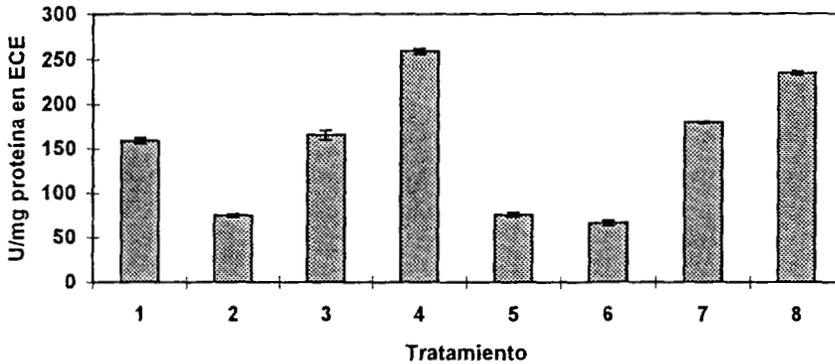


Figura 10. Actividad específica exopoligalacturonasa producida por FMS sobre PUF resultante del experimento factorial fraccionado.

Para evaluar el efecto de cada variable, se calcularon los coeficientes de regresión, tomando la actividad volumétrica y la actividad específica como variables respuesta; si el coeficiente presentó valor positivo significa que tiene un efecto positivo (nivel superior) sobre la variable respuesta y viceversa, por lo que a valores muy cercanos a cero significa que no existe efecto de esa

variable sobre las variables respuesta (Zhu *et al.*, 1996). Se observó en este estudio que la sacarosa fue la variable de mayor efecto sobre la actividad exopoligalacturonasa, pues para la actividad volumétrica el coeficiente fue de 0.54 y para la actividad específica fue de 57.68; los oligoelementos presentaron para la actividad volumétrica un coeficiente de 0.03, que es positivo pero cercano a cero, y para la actividad específica se obtuvo un coeficiente de -7.67 que es un valor negativo y pequeño; en cuanto a la concentración de esporas, el coeficiente calculado para la actividad volumétrica fue de 0.29, y para la actividad específica fue de 10.87, esos valores son positivos pero pequeños en comparación con los coeficientes para sacarosa.

Por lo tanto, la sacarosa fue la variable de mayor efecto sobre la actividad exopoligalacturónica, por lo que se decidió evaluar concentraciones de sacarosa mayores esperando incrementar la actividad exopoligalacturonasa; con respecto a la concentración de esporas se tomó el nivel superior evaluado en el experimento factorial como el mejor, pues su coeficiente fue muy pequeño y además el inóculo está en función de la concentración de sustrato; de acuerdo con el valor de los coeficientes para los oligoelementos que fueron muy cercanos a cero, se decidió utilizar la concentración utilizada en el medio basal.

2.5. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio sobre la actividad exopoligalacturonasa.

De acuerdo con los resultados obtenidos del diseño factorial fraccionado, la sacarosa fue la variable de mayor efecto sobre la actividad exopoligalacturonasa, por lo se le atribuye un efecto de inducción de las poligalacturonas; en este experimento se incrementó la concentración de sacarosa evaluando 4 niveles, esperando incrementar aún más la actividad sin que se presentara un fenómeno de represión catabólica, pues Solís-Pereira *et al.*, (1996), encontró que en FMS sobre bagazo de caña, la actividad de pectinasas de *A. niger* se incrementó cuando los niveles de glucosa inicial en el medio eran de 250 g/L, y a concentraciones mayores la actividad decreció.

La biomasa producida se muestra en la Figura 11, donde se aprecia que a mayor concentración de sacarosa, mayor es la biomasa producida, y en general los valores son mas grandes que los obtenidos en las anteriores fermentaciones, esto por que la sacarosa es un azúcar de muy fácil asimilación para el hongo. En cuanto a la concentración de proteína, en la Figura 12 se observa que para 40 y 60 g/L de sacarosa, aumenta al paso del tiempo, y en el caso de 80 y 100 g/L de sacarosa, permanece más o menos constante y a niveles bajos durante el tiempo que duró la fermentación, el contenido de proteína a las 24 h presentó valores cercanos a los obtenidos en las fermentaciones anteriores, pero a las 36 y 48 h para 40 y 60 g/L de sacarosa los valores se incrementaron mucho.

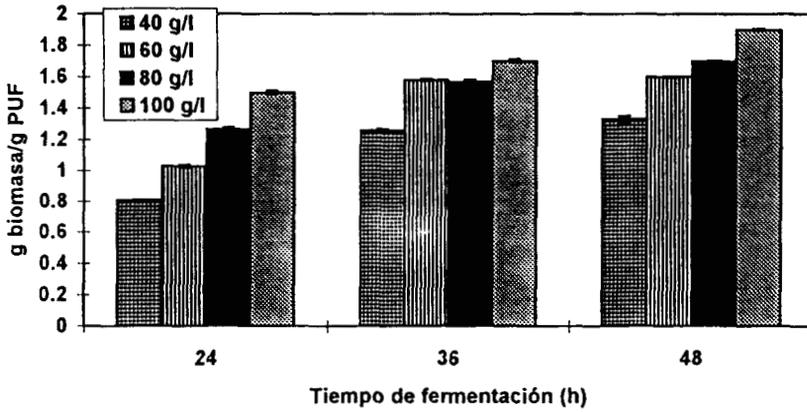


Figura 11. Biomasa obtenida por FMS sobre PUF en la evaluación de 4 concentraciones de sacarosa en el medio para producir exopoligalacturonas.

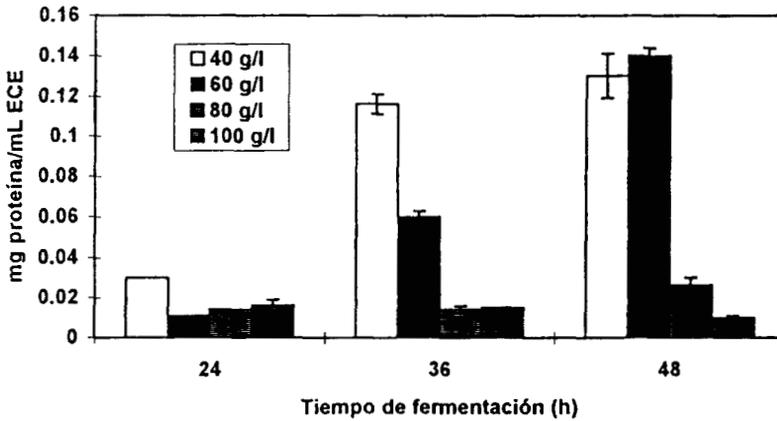


Figura 12. Proteína en el ECE obtenida por FMS sobre PUF en la evaluación de 4 concentraciones de sacarosa en el medio para producir exopoligalacturonas.

En la Figura 13 se muestran los valores de la actividad volumétrica y se observa que sus máximos valores fueron a las 24 h de fermentación con 40 g/L, y fue muy cercano al obtenido en el tratamiento 4 del diseño experimental; con 60 g/L la máxima actividad se presentó a las 36 h de fermentación; con 80 g/L, la actividad se incrementó a lo largo del tiempo de fermentación, pero el máximo valor no alcanzó la actividad obtenida con 40 g/L a las 24 h de fermentación; en el caso del experimento con 100 g/L se presentó una actividad muy baja al inicio de la fermentación y disminuyó al paso del tiempo.

Se puede decir que en la FMS sobre PUF, se presenta un efecto de represión catabólica por sacarosa a concentraciones mayores a 60 g/L en el medio, pues hasta esa concentración la inducción de las enzimas se hizo presente, pero cuando la concentración se aumentó, la actividad disminuyó. En contraste con lo encontrado por Solís- Pereyra *et al.* (1996), ellos observaron que la máxima actividad exopoligalacturonasa por FMS sobre bagazo de caña se presentaba hasta las 60 h con 100 g/L de glucosa, y a concentraciones mayores, la actividad era menor; por lo que se piensa que en la PUF, la difusión de solutos es mas eficiente que en el bagazo de caña. Tomando en cuenta que el incremento de actividad con 60 g/L de sacarosa en comparación con la obtenida con 40 g/L, es de aproximadamente 1 UI/mL, y el tiempo de producción es 12 h mayor en el primer caso con respecto al segundo, se estima que la concentración de sacarosa de 40 g/L a un tiempo de fermentación de 24 h resultan ser las mejores condiciones de producción.

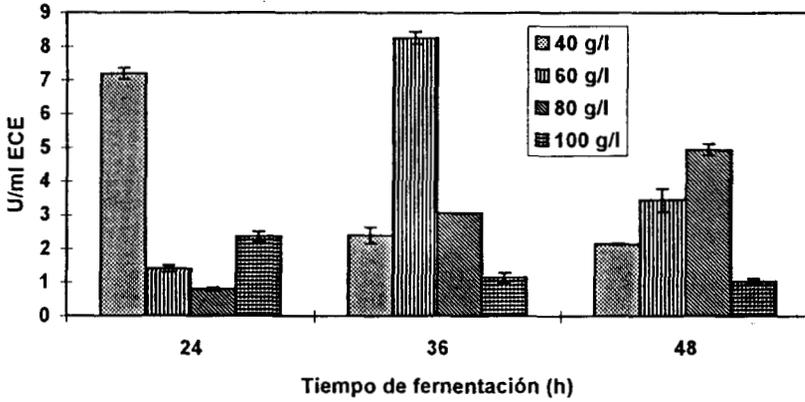


Figura 13. Actividad volumétrica exopoligalacturonasa obtenida por FMS sobre PUF al evaluar 4 concentraciones de sacarosa en el medio.

Como se observa en la Figura 14, la actividad específica mayor se presentó a una concentración de 40g/L de sacarosa a 24 h de fermentación, y el valor es muy cercano al obtenido el tratamiento 4 del diseño factorial, los demás valores fueron menores, por lo que esta concentración de sacarosa parece ser la mejor, ya que maximiza la actividad específica de la EP y se acompaña de un nivel alto de excreción de la enzima en el ECE, con la ventaja de realizarse en un tiempo de fermentación de tan solo 24 horas.

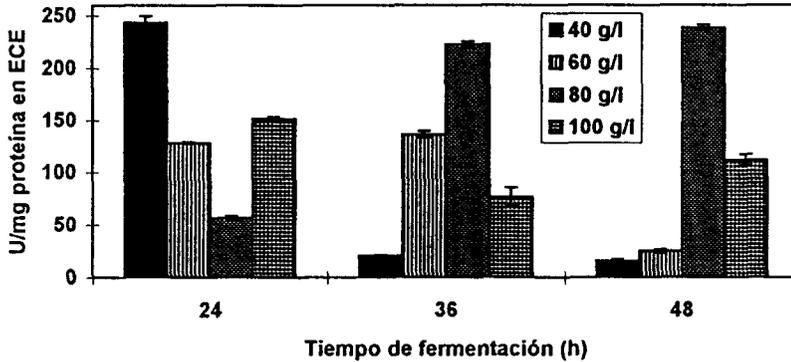


Figura 14. Actividad específica exopoligalacturonasa obtenida por FMS sobre PUF al evaluar 4 concentraciones de sacarosa en el medio.

2.6. Evaluación del efecto que tiene una sola fuente de carbono sobre la producción de exopoligalacturonas.

Se realizaron dos experimentos, uno contenía solo sacarosa y el otro solo pectina como fuentes de carbono, para observar su efecto sobre la actividad exopoligalacturonasa. En la Figura 15 se muestran la biomasa producida y la proteína secretada en una fermentación que contenía pectina como única fuente de carbono, y en la Figura 16 se muestran las mismas variables producidas en una fermentación con sacarosa como única fuente de carbono; se observa que la biomasa producida con sacarosa es aproximadamente el doble que la producida con pectina, pues el primer carbohidrato es de más fácil asimilación; en cuanto a la proteína, el efecto fue

inverso, ya que los valores presentados en el medio con pectina fueron aproximadamente el doble en comparación con los obtenidos con sacarosa, y aproximadamente 33 veces el valor obtenido por el tratamiento 4 del diseño factorial.

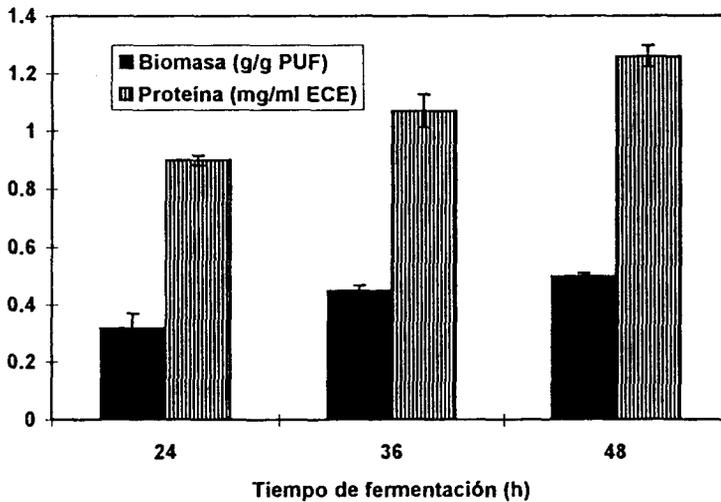


Figura 15. Contenido de proteína en ECE y biomasa producidas por FMS utilizando PUF como soporte; fermentación con pectina como única fuente de carbono.

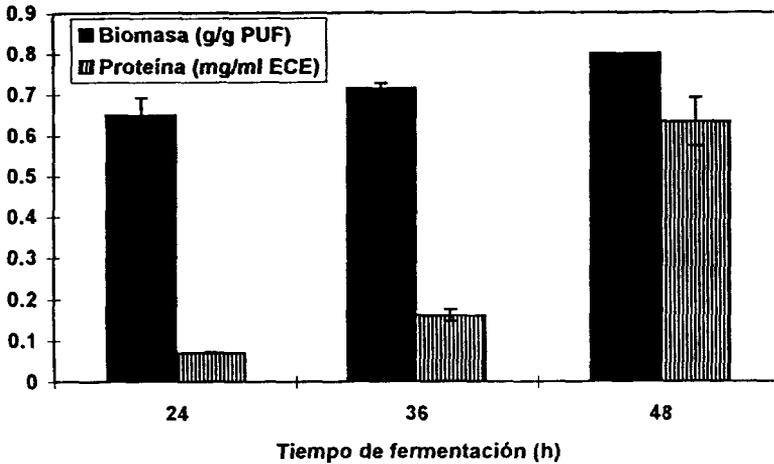


Figura 16. Contenido de proteína en ECE y biomasa producidas por FMS utilizando PUF como soporte; fermentación con sacarosa como única fuente de carbono.

La actividad exopoligalacturonasa obtenida en el medio con pectina se muestra en la Figura 17 y la obtenida con sacarosa se muestra en la Figura 18, se observa que en general las actividades específicas y volumétricas obtenidas son muy pequeñas comparadas con las obtenidas en fermentaciones con ambas fuentes de carbono. Con estos resultados se puede decir que la sacarosa es un inductor indirecto de la síntesis de exopoligalacturonas, pues cuando se adicionan hasta 40 g/L de sacarosa al medio la actividad volumétrica y específica son muy superiores a cuando solo existe pectina en el medio, por otro lado se observó también que en la fermentación donde no existía el inductor directo de las exopoligalacturonas (pectina), sino, solo sacarosa, también se presentó actividad exopoligalacturonasa aunque en valores muy pequeños, lo que muestra que en el microorganismo existe un nivel bajo

constitutivo de secreción de pectinasas, lo cual está de acuerdo con lo que han reportado otros autores (Tsuyumu, 1977; Leone y Van den Heuvel, 1987).

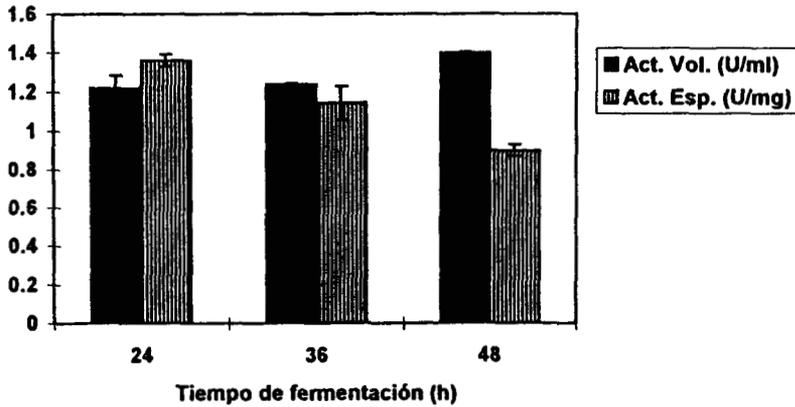


Figura 17. Actividad exopoligalacturonasa producida por FMS utilizando PUF como soporte; fermentación con pectina como única fuente de carbono.

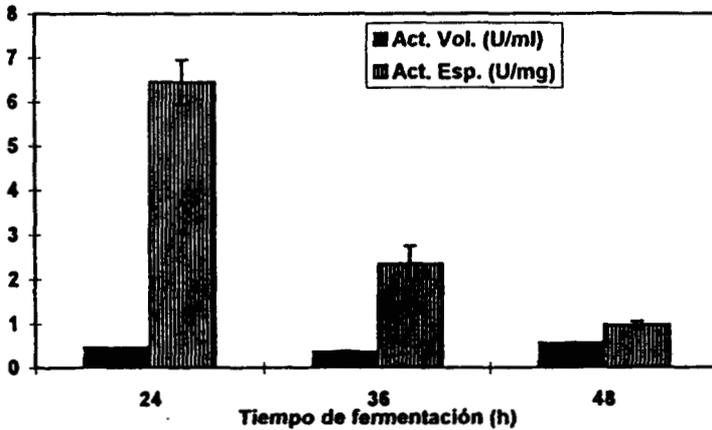


Figura 18. Actividad exopoligalacturonasa producida por FMS utilizando PUF como soporte; fermentación con sacarosa como única fuente de carbono.

Con los resultados obtenidos en todos los experimentos realizados hasta esta parte, se pueden establecer las condiciones de fermentación (Tabla 8), como son, la composición del medio, el pH inicial, temperatura de incubación, tiempo de fermentación y tamaño de inóculo, para producir exopoligalacturonas de *Aspergillus niger* C28B25 por FMS utilizando PUF como soporte.

Tabla 8. Composición del medio de cultivo y condiciones de fermentación para producir exopoligalacturonas por FMS utilizando PUF como soporte.

Constituyente	g /100 g medio
Pectina	1.5
Sacarosa	4.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.26
K ₂ HPO ₄	0.65
Urea	0.3
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.02
FeSO ₄	0.029
MnCl ₂	1x10 ⁻⁴
ZnCl	1x10 ⁻⁴
CuSO ₄	1x10 ⁻⁴
Agua	88.89
PUF	3.35

- a) Tiempo de Fermentación: 24 h.
 b) Temperatura de Fermentación: 35°C
 c) pH inicial: 4.5
 d) Inóculo: 1X10⁸ esporas/g de fuente de carbono.

En la Figura 19 se puede apreciar la actividad volumétrica encontrada a 24 h de fermentación en diferentes experimentos, donde la máxima actividad la presentó el tratamiento 4 del diseño factorial y que fue muy similar a la obtenida en el experimento con 40 g/l de sacarosa de donde se evaluaron diferentes concentraciones de sacarosa. En los últimos dos experimentos que se muestran se logró incrementar aproximadamente 3 veces la actividad con respecto del primer experimento.

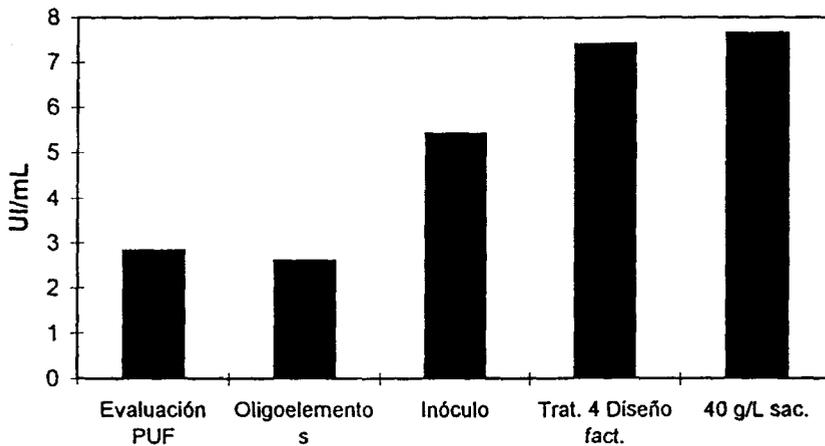


Figura 19. Gráfica comparativa de la actividad exopoligalacturonasa volumétrica obtenida en diferentes experimentos a 24 h de fermentación.

En la Figura 20 se muestra la actividad específica obtenida en diferentes experimentos a 24 h de fermentación, se puede apreciar que con el Tratamiento 4 del diseño factorial, se logró incrementar aproximadamente 10 veces la actividad específica con respecto al primer experimento, y también es notable que el incremento en la concentración de sacarosa favorece la síntesis de las exopoligalacturonas, ya que la principal diferencia entre los últimos valores con respecto de los demás es el incremento de sacarosa en el medio de fermentación.

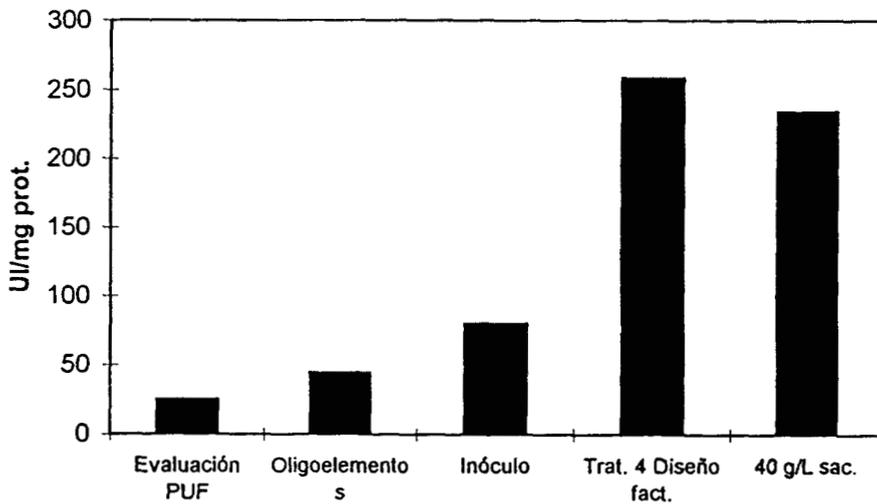


Figura 20. Gráfica comparativa de la actividad exopoligalacturonasa específica obtenida en diferentes experimentos a 24 h de fermentación.

2.7. Evaluación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y velocidad máxima (V_{max}) aparentes de las exopoligalacturonas en el ECE obtenido por FMS utilizando PUF como soporte.

En la Figura 21 se muestra la cinética de la actividad exopoligalacturonasa en el ECE, se observa que a concentraciones mayores de 10 mg/mL de sustrato empieza a disminuir la velocidad inicial, es decir la enzima se inhibe por sustrato; en la Figura 22 se muestra la gráfica de la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato hasta donde se presenta la velocidad máxima (en función de la ecuación de Michaelis-Menten) y en la Figura 23 se muestra la gráfica doblemente recíproca (Lineweaver-Burk) de la ecuación de Michaelis-Menten para la misma reacción enzimática, con la que se pudo calcular el valor de la V_{max} aparente que fue de 50.76 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ de producto y la K_m aparente fue de 1.86 mg/mL de sustrato, que comparada con la obtenida para las exopoligalacturonas producidas por FMS utilizando bagazo de caña como soporte que fue de 2.03 mg/mL por Acuña-Argüelles *et al.* (1995) es muy similar.

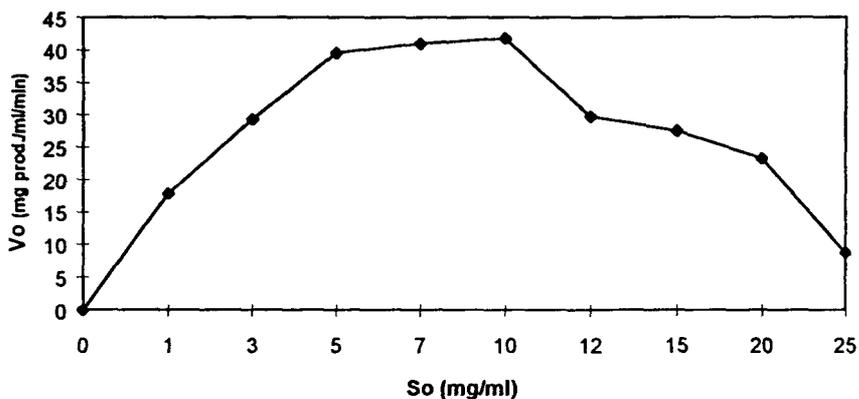


Figura 21. Gráfica de la velocidad inicial (V_o) en función de la concentración de sustrato (S_o), para la reacción enzimática de las exopoligalacturonas producidas por FMS sobre PUF:

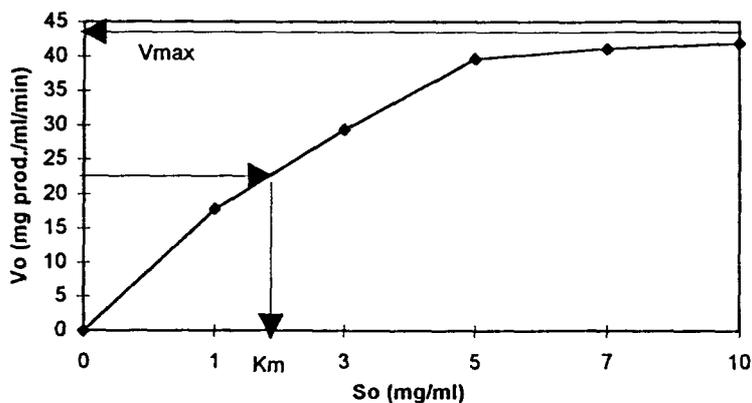


Figura 22. Gráfica de la velocidad inicial (V_o) en función de la concentración de sustrato (S_o) (Michaelis-Menten) para la reacción catalizada por las exopoligalacturonas en el ECE obtenido por FMS utilizando PUF como soporte.

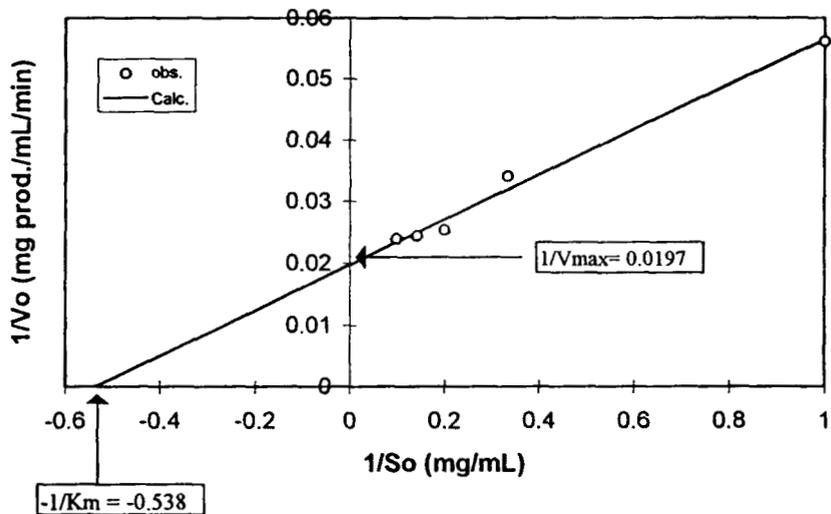


Figura 23. Gráfica doblemente recíproca (Lineweaver-Burk) de $1/V_o$ en función de $1/S_o$ para la reacción catalizada por las exopoligalacturonas en el ECE obtenido por FMS utilizando PUF como soporte.

3. PRODUCCION DE EXOPOLIGALACTURONASAS POR FML.

Se realizaron dos fermentaciones, una en la que se utilizó el medio que se reporta en la Tabla 8 excepto el PUF, y otra donde además se eliminó la sacarosa; se evaluaron la biomasa producida, la actividad volumétrica y concentración de proteína en el ECE, y se calculó la actividad específica.

En la Figura 24 se puede apreciar el perfil de proteína y biomasa producidas en la fermentación cuyo medio fue igual al utilizado en la FMS utilizando PUF como soporte, la biomasa se incrementó a lo largo del tiempo, pero la proteína excretada disminuyó. En la Figura 25 se muestra la biomasa y proteína producida en la FML con pectina como única fuente de carbono donde se observa que la biomasa presentó un valor inicial y un valor máximo a las 72 h mayor en comparación con la anterior fermentación. La proteína presentó un incremento a lo largo de la fermentación, y el máximo valor obtenido fue a las 96 h. Las diferencias en cuanto a la proteína secretada, posiblemente se deba a que en la primer fermentación exista la síntesis de proteasas, y en la segunda no, o los niveles de proteasas secretadas sea mucho menor.

Con respecto a la actividad exopoligalacturonasas, en el medio con pectina y sacarosa se presentó el fenómeno de represión catabólica para la síntesis de estas enzimas por presencia de altas concentraciones de sacarosa; Solí-Pereira *et al.* (1993) encontraron que la producción de las exopoligalacturonasas por FML en presencia de sacarosa (por arriba de 5 g/L) era mucho menor comparada con la fermentación en donde solo existía pectina o con la que tenía pectina y ácido galacturónico; en este experimento, la actividad exopoligalacturonasa fue nula en

todos los tiempos de fermentación. En el otro experimento, donde se eliminó la sacarosa al medio de fermentación, la actividad exopoligalacturonasa presentó valores muy pequeños, los cuales aparecieron hasta las 72 h de fermentación, como se puede observar en la Figura 26.

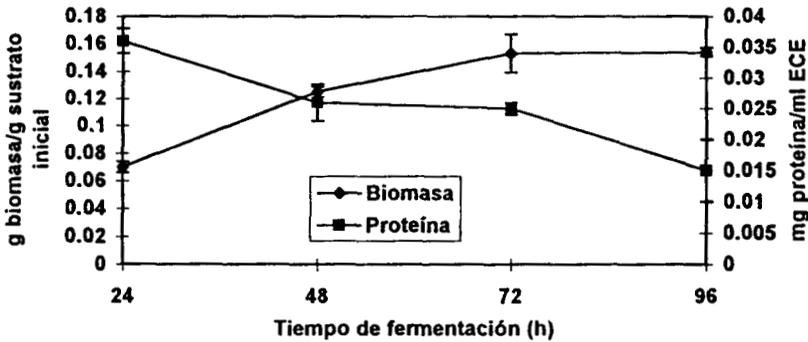


Figura 24. Contenido de proteína en ECE y biomasa producidas por FML en un medio con pectina y sacarosa como fuente de carbono.

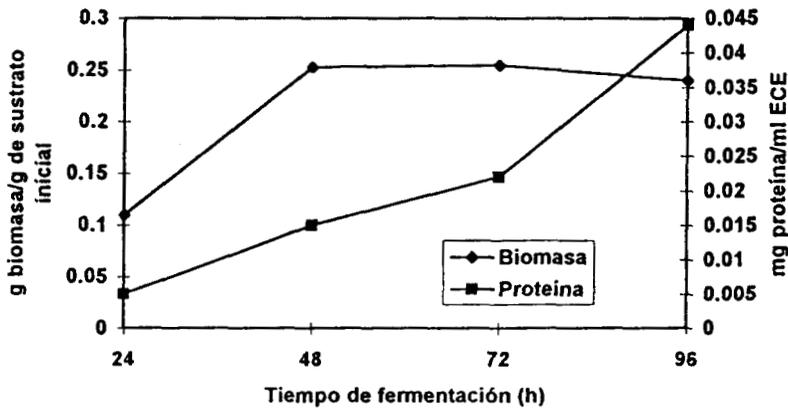


Figura 25. Contenido de proteína en ECE y biomasa producidas por FML en un medio con pectina como única fuente de carbono.

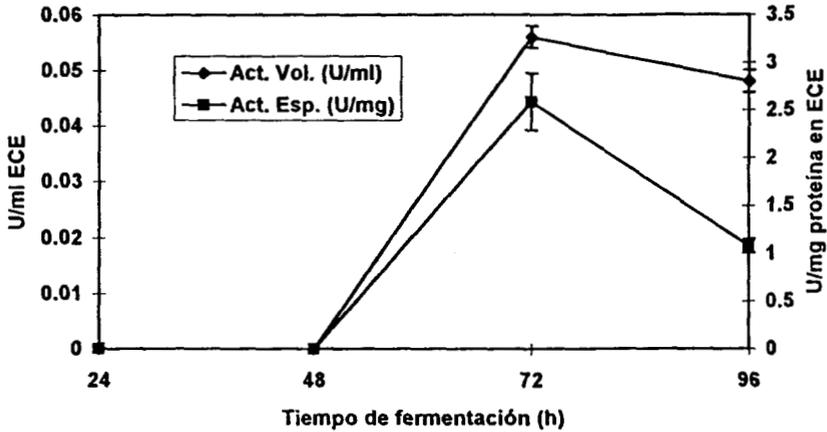


Figura 26. Actividad exopoligalacturonasa obtenida por FML en un medio con pectina como única fuente de carbono.

4. ELECTROFORESIS.

En la figura 27 se presenta el perfil electroforético del ECE con actividad de EP, que se obtuvo por FMS utilizado PUF como soporte. En este perfil se observaron cuatro principales bandas de un conjunto de aproximadamente diez bandas. Los pesos moleculares aproximados que se calcularon por comparación a los marcadores que se utilizaron son para: Ei de 168 KDa; Eii de 84 KDa ; Eiii 49 KDa; Eiv 39 KDa. Acuña-Argüelles *et al.* en 1995 presentaron el perfil electroforético de los polipéptidos del ECE con actividad de pectinasas, obtenida por FMS pero en este caso utilizando bagazo

de caña como soporte, mostrando una serie de bandas correspondiente a los polipéptidos en un rango de pesos moleculares desde 36 hasta 66 KDa.

En el caso del presente trabajo se puede apreciar que los pesos moleculares de los polipéptidos que se observaron cubren además del rango de pesos moleculares reportados por Acuña-Argüelles *et al.* (1995) mayores pesos moleculares, en este caso 168 KDa, por Ei y 84 KDa para Eii. Aun cuando se han considerado cuatro principales polipéptidos en el ECE obtenido por el método arriba mencionado, es necesario para un trabajo posterior evaluar cual o cuales de ellas presentan actividad poligalacturonasa y de éstas, posteriormente con técnicas complementarias diferenciar aquellas que presenten actividad exopoligalacturonasa.

Hasta donde se analizó el ECE y considerando que a las 24 h de la fermentación se obtuvo el ECE con mayor actividad enzimática, se pudo apreciar de una manera muy clara que la composición proteínica del ECE obtenida por FMS en soporte de PUF fue menos complejo, es decir que el número de bandas observadas son menos, que el que presentaron Acuña-Argüelles *et al.* (1995) para la FMS sobre el bagazo de caña, lo cual indica que las exopoligalacturonasas producidas por FMS sobre PUF serán menos complicadas de purificar.

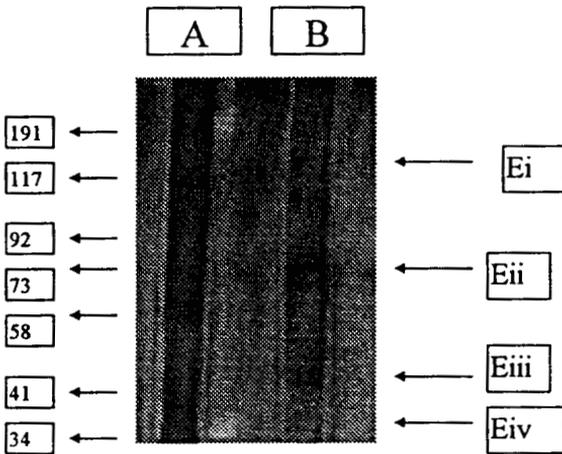


Figura 27. Patrón electroforético de las proteínas extracelulares producidas por *Aspergillus niger* y analizadas en SDS-PAGE. (A) Marcador de peso molecular (KDa.). (B) ECE obtenido por FMS sobre PUF.

5. COMPARACION DE LAS MAXIMAS ACTIVIDADES VOLUMETRICAS, ESPECIFICAS Y DE LA PRODUCTIVIDAD OBTENIDAS POR LOS TRES SISTEMAS DE FERMENTACION.

Se trabajó con tres sistemas de fermentación, la FML que es un sistema tradicional de producción de metabolitos, la FMS utilizando bagazo de caña que es un sistema que a últimas fechas ha tomado gran importancia por las altas productividades en la obtención de metabolitos, y la FMS utilizando PUF como soporte que es el sistema en estudio, buscando tener ventajas sobre los otros dos sistemas.

Con los resultados de este estudio se puede hacer una comparación entre los tres sistemas a nivel de actividad volumétrica, actividad específica y productividades de las exopoligalacturonasas, obtenidas en las mejores condiciones de fermentación conocidas. En la Tabla 9 se muestran los datos comparativos, donde se aprecia que la FMS utilizando PUF como soporte resultó ser el sistema más eficiente ya que fue aproximadamente un 63% más productivo que el sistema de FMS utilizando bagazo de caña como soporte, y 400 veces más comparado con la FML. La actividad volumétrica obtenida por FMS sobre PUF fue aproximadamente de la mitad en comparación con la obtenida por FMS sobre bagazo de caña, pero de 135 veces mayor comparada con la obtenida por FML; y en el caso de la actividad específica cuando se produce por FMS sobre PUF fue de aproximadamente 10 veces mayor en comparación con la obtenida por FMS sobre bagazo de caña y de 100 veces mayor comparada con la obtenida por FML.

Tabla 9. Máxima productividad y actividad exopoligalacturonasa producidas por FMS utilizando bagazo de caña y PUF y por FML.

Fermentación	Act. Vol. (UI/mL ECE)	Act. Esp. (UI/mg prot.)	Productividad (UI mL ⁻¹ h ⁻¹)
FML	0.056	2.586	0.00077
FMS sobre Bagazo de caña	14.00	26.87	0.194
FMS sobre PUF	7.60	258.8	0.316

X. CONCLUSIONES.

1. Los oligoelementos son necesarios para la producción de exopoligalacturonasas por FMS utilizando como soporte la PUF, y es suficiente agregar 1 mL de la mezcla compuesta por MnCl_2 , CuSO_4 , ZnSO_4 a una concentración de 0.001 g/L por cada litro de medio.
2. Se observó que la mayor actividad se obtuvo con una concentración de sacarosa de 40 g/L en el medio, ya que a concentraciones mayores, los tiempos de máxima actividad se incrementaron, y la cantidad de esporas inoculadas fue de 1×10^8 esporas/g de fuente de carbono.
3. Cuando la concentración de sacarosa se incrementó hasta 100 g/L en el medio, la actividad volumétrica disminuyó hasta una tercera parte aproximadamente en comparación con la obtenida con 40 g/L, pero con 60 g/L de sacarosa la actividad fue mayor a las 36 h, pero el incremento de actividad que es del 14% no justifica 12 horas más de fermentación, por lo que con 40 g/L de sacarosa a 24 h de fermentación se presenta la mayor productividad.
4. Se observó que la sacarosa es indispensable en la fermentación para la producción de exopoligalacturonasas, además de la pectina, pues en los experimentos donde se agregó una sola fuente de carbono, la actividad disminuyó considerablemente.
5. La FMS utilizando PUF como soporte resultó ser más eficiente que la FMS utilizando bagazo de caña, ya que la actividad específica obtenida por el primer

sistema de fermentación fue aproximadamente 10 veces mayor que la obtenida con la segunda, y aproximadamente 100 veces mayor que la obtenida por FML; además los tiempos de producción se disminuyeron a 24 h.

6. El PUF es un soporte que ayuda a dirigir la producción de exopoligalacturonasas por *Aspergillus niger* en FMS, obteniendo ECE con elevada actividad específica en tiempos cortos, y con un número pequeño de polipéptidos presentes en el ECE, por lo que resulta ser un sistema de fermentación más eficiente que la FML y FMS utilizando bagazo de caña como soporte.

7. En cuanto a la biomasa producida, se observó que después de las 24 h de fermentación permaneció mas o menos constante en la mayoría de los experimentos y en los demás se incremento muy poco, pues después de éste tiempo el hongo empezaba a esporular, por lo que se concluyó que los experimentos posteriores a éstos se deberán realizar tomando muestras a intervalos de tiempos menores hasta 36 h de fermentación, para tratar de tener bien establecida una cinética de crecimiento del hongo junto con las de consumo de carbohidratos y producción de la enzima y de la proteína total.

8. La espuma de poliuretano es un material que se puede utilizar como soporte para las fermentaciones en medio sólido para producir exopoligalacturonasas, y podría ser utilizado para producir otros metabolitos como es el caso de la producción de ácido fumárico (Petruccioli *et al.*, 1996).

Por último se concluye que los objetivos planteados para el desarrollo de este trabajo de investigación se cumplieron logrando verificar la hipótesis planteada.

XI. BIBLIOGRAFIA.

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

Aguilar G. y Huitron, C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. Enzyme Microb. Technol. 9:690-696.

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 Microb. Technol. 15:254-260.

Baduí D.S. (1990). Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana. Segunda edición, México D.F. pp. 105-109.

Bailey M.J. y Pessa E. (1990). Strain and process for production of polygalacturonase. Enzyme Microb. Technol. 12: 266-271.

Bradford M.M. (1976). 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. pp. 118-123.

Budiatman S. and B.K. Lonsane. (1987). Cassava fibrous waste residue; a substrate to wheat bran in solid-state fermentation. *Biotechnol. Letters.* 9 (8): 597-600.

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

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

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

Fujishima T., Uchida K. and Yoshino H. (1972). Enzyme production by molds in sponge culture. J. Ferment. Technol. 50, 724-730.

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 Technol.* 18:248-251.

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

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

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. pp. 425-476.

Kotzekidou P. (1991). Production of polygalacturonase by *Byssoclamys fulva*. *J. Industrial Microb.* 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. pp 203-205.

Leone G. and Van den Heuvel J. (1987). Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes by *Botritis cinerea*. *Can. J. Bot.* 65:2133-2141.

Maldonado M.C., Strasser A.M. and 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.A. (1992). Obtención de mutantes de *Aspergillus niger* C28B25 hiperproductores de pectinasaspor fermentación en medio sólido de la pulpa de café. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. pp. 6-10, 24, 86-94.

Neubek C.E. (1975). Fruits, fruits products and wines. In *Enzymes in Food Processing*. Ed. by G. Reed. Academic Press, Inc., London. pp. 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. pp. 1-115.

Pandey A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. Process Biochemistry. 27: 109-117.

Petruccioli M., Angiani E., and Federici F. (1996). Semi-continuous fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized in polyurethane sponge. Process Biochemistry. 31 (5):463-469.

Pilnik W., Rombouts F.M., and Voragen A.G.J. (1973). On the clasification of pectin depolymerases activity of pectin depolymerases on glycol esters of pectate as a new classification criterion. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 2:122-128

Potter N. (1978). La ciencia de los alimentos. Edutex S.A., México. pp. 566-568.

Qadeer M.A., Iqbal J., Aziz S.K., and Hassan H. (1985). Solid substrate fermentation for pectinase production by *Aspergillus foetidus*. Pakistan J. Sci. Ind. Res. 28: 179-181.

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

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. Pp. 193.

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

Solís-Pereyra S., Flores M.E., Huitrón C. (1990). Isolation of endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. Biotechnol. Letters. 12 (10): 751-756.

Solís-Pereyra S., Favela-Torres E., Viniestra-González G., 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., Viniestra-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.

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

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. Bacteriol. 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. pp.123-125.

Zhu Y., Knol W., Smits J.P. y Bol J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. Biotechnol. 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.