

Tesis de Posgrado

Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos

Sanchez, Virginia E.

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sanchez, Virginia E.. (1999). Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3218_Sanchez.pdf

Cita tipo Chicago:

Sanchez, Virginia E.. "Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3218_Sanchez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias*

*Producción de proteasas fúngicas
por fermentación en estado sólido
para su aplicación en la industria de alimentos*

*Autor: Lic. Virginia E. Sanchez
Director: Dra. Ana M.R. Pilosof*

*Tesis para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
1999*



*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias*

*Fungal protease production
for food application,
by solid state fermentation*

*Author: Lic. Virginia E. Sanchez
Director: Dra. Ana M.R. Pilosof*

*Doctoral Thesis
Universidad de Buenos Aires
1999*

RESUMEN

Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos

Se evaluó la utilización de la fermentación en estado sólido para producción de proteasas por *Aspergillus*. A través de una selección entre 210 cepas sobre placas de agar leche en condiciones relevantes para la FES, se seleccionó a *Aspergillus niger 91* como la más adecuada para estudios futuros.

Se ensayó el efecto de diferentes sustratos naturales. La mejor producción de proteasa se obtuvo por fermentación de una mezcla de soja : afrechillo de arroz (7:3), con una relación carbohidrato/proteína de 0,8 y una proporción reducida de partículas de soja superiores a 3,35 mm. La adición de carbohidratos y fuentes de nitrógeno y proteína no tuvo efecto significativo.

Se realizó un estudio cinético de la FES evaluando el efecto de parámetros ambientales (contenido de agua inicial - actividad de agua, pH y temperatura). La proteasa producida mostró un modelo mixto, de asociación parcial al crecimiento; se describió la cinética de producción de biomasa, consumo de sustrato, proteasa y conidios con una ecuación logística. En las condiciones óptimas (40% H₀, A_w 0,969, pH₀ 6, 37°C), *Aspergillus niger 91* produjo 10000 UP/g SS₀ (15800 UP/g msk), siendo esto varias veces superior a otros sistemas de fermentación. La relación lineal encontrada entre la pérdida de peso seco y tanto la biomasa como la proteasa facilita la estimación de éstas a través de un parámetro fácilmente medible.

Se encontró una correlación entre la producción de proteasa y conidios y su asociación con un patrón común en la evolución del pH.

Debido a la secreción diferencial de dos proteasas al medio se observaron variaciones en la actividad proteolítica y la estabilidad térmica de los extractos enzimáticos de acuerdo al tiempo de fermentación.

Palabras clave: fermentación en estado sólido, proteasa,
Aspergillus niger, cinética, conidio.

ABSTRACT

Fungal protease production for food application, by solid state fermentation

The feasibility of using solid state fermentation for the production of protease by *Aspergillus* fungi was evaluated. *Aspergillus niger* 91 was selected as being the most suitable for future studies, by screening among 210 strains on milk agar plates under relevant conditions for solid state fermentation.

The effect of different natural substrates was tested. The best was obtained by fermenting a soybean : rice bran mixture (7:3), with a carbohydrate/protein around 0,8 and a reduced proportion of soybean particle size bigger than 3,35 mm. The addition of carbohydrates, nitrogen and protein sources had no significant influence on the protease yield.

A kinetic study of solid state fermentation was conducted evaluating the effect of environmental parameters (initial water content - water activity, pH and temperature). The protease formed exhibited a mixed - growth associated pattern, and biomass, substrate consumption, protease and conidial kinetics were described with a logistic equation. At optimal conditions (40% H₀, A_w 0,969, pH₀ 6, 37°C), *Aspergillus niger* 91 produced 10000 PU/g SS₀ (15800 PU/g dwk), several times higher than other fermentation systems. A linear relationship was found between the dry matter weight loss and both biomass and protease production allowing their estimation through an easily measurable parameter.

A correlation between protease and conidial production and its connection with a pH evolution common pattern was described.

Due to differential secretion of two proteases, variations in the proteolytic activity pattern and different thermal properties of fermentation extracts were found during fungal growth.

Key words: solid state fermentation, protease, *Aspergillus niger*, kinetic, conidia.

A mis padres

Agradecimientos

A Ana Pilosof por su guía y colaboración en el desarrollo de esta Tesis, por su honestidad, afecto personal y la libertad que genera en su grupo de trabajo. Y en particular en mis largos y difíciles tiempos de escritura por su tolerancia y respeto.

A Marta Huergo por permitirme un lugar de aprendizaje en el Laboratorio de Microbiología y por su afecto e interés durante estos años.

A mis compañeros de los Laboratorios de Microbiología Industrial, Tecnología de Alimentos y PINMATE :

Mauricio Terebiznik, Patricia Cerrutti, Patricia Lodato, Lucas González, María Elena Chaparro, María del Carmen Castro, Silvia Peschiera, Sara Ipiña, Teresa Bocca, Viviana Taragano, Dina Carp, Nora Bombara, Vanesa Zylberman, Rosa Baeza, Beatriz Elizalde, Pilar Buera, Carolina Schebor, Leila Burin, Florencia Mazzobre, Silvia Cardona, Mónica Haros, Ana Rojas, Pablo Bonelli

Por la interacción intelectual y personal que nos permite crecer, por la colaboración espontánea, por los buenos (y no tanto) momentos compartidos, y por los empujones recibidos en los últimos tiempos.

A María Delia, Elvira, Miriam, María Elena, Nelly, Esmilda y Olga, porque cada una desde su lugar hace la vida en este pabellón más agradable.

Al CONICET y la UBA por las becas y subsidios otorgados.

A Alejandro, Gladys, Carina, Sofia y Cleo, por soportar mis tenebrosos tiempos de ignorancia informática, por las alegrías y tristezas vividas, por la compañía permanente, por un futuro mejor para todos.

Al resto de mi familia y mis amigos de siempre, porque no importan los tiempos, las distancias ni los caminos elegidos para seguir compartiéndonos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	1
1.1. Características generales de la FES	3
1.2. Historia, aplicaciones actuales y perspectivas	7
1.3. Variables de proceso en FES	14
2. PROTEASAS	18
2.1. Orígenes y perspectiva actual	18
2.2. Clasificación y propiedades	21
2.2.1. Serin proteasas	25
2.2.2. Cistein proteasas	25
2.2.3. Métalo proteasas	26
2.2.4. Aspártico proteasas	26
2.3. Funciones	28
2.4. Métodos de producción	30
2.4.1. Fermentación en Estado Sólido	31
2.4.2. Fermentación sumergida	32
2.5. Aplicaciones industriales	33
2.5.1. Detergentes	35
2.5.2. Cueros	36
2.5.3. Alimentos y Bebidas	37
3. ASPERGILLUS: DOMINIO ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS	44

OBJETIVOS	47
-----------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE CEPAS PROTEOLÍTICAS	48
1.1. Aislamiento de hongos	48
1.2. Screening primario	48
1.3. Screening secundario	49
1.3.1. Efecto de la temperatura	49
1.3.2. Efecto de la glucosa	49
1.3.3. Efecto de la actividad de agua	49
1.4. Identificación taxonómica de la cepa 91 aislada	50
2. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	50
2.1. Sistema de fermentación	50
2.2. Inóculo y preservación de las cepas	51
2.3. Sustrato	51
2.4. Contenido de agua (H%)	52
2.5. Peso húmedo y peso seco	52
2.6. Actividad de agua (Aw)	52
2.7. Isotherma de sorción del sustrato soja:afrechillo de arroz	52
2.8. pH inicial del sustrato y seguimiento del pH durante la fermentación	52
2.9. Obtención del extracto crudo de fermentación	53
2.10. Adición de diferentes metabolitos al sustrato inicial	53
2.10.1. Fuentes de carbono	53
2.10.2. Fuentes de nitrógeno	53
2.10.3. Fuentes externas de proteína	54
2.10.4. Cloruro de sodio	54
2.11. Estimación de biomasa fúngica	54
2.11.1. Determinación de glucosamina	54
2.11.2. Determinación del factor de conversión de glucosamina a biomasa	55

2.12. Recuento de conidios	56
2.13. Fermentación en medio líquido	56
3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	56
3.1. Proteasa ácida	56
3.1.1. Método de Tsujita y Endo (1976) modificado	56
3.1.2. Método de Anson (1938) modificado	57
3.2. Glucoamilasa	58
4. DETERMINACIÓN DE OTROS METABOLITOS en el extracto de fermentación	58
4.1. Proteínas	59
4.2. Azúcares reductores	59
4.3. Glucosa	59
5. CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DEL EXTRACTO PROTEOLÍTICO	59
5.1. Caracterización del extracto crudo por la variación de su actividad	59
5.1.1. Actividad a distintas temperaturas	59
5.1.2. Actividad residual a diferentes temperaturas	59
5.1.3. Actividad a distintos pH	60
5.1.4. Actividad residual a distintos pH	60
5.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	60
5.3. Ultrafiltración	61
5.4. Cromatografía de intercambio aniónico	61
5.5. Cromatografía de filtración molecular	61
5.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida	62
6. TRATAMIENTO DE DATOS	63

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

Selección e identificación de una cepa para producción de proteasas en FES 64

1. SELECCIÓN DE UNA CEPA PARA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS EN FES	65
1.1. Selección primaria sobre placas de agar leche	65
1.2. Selección secundaria	66
1.2.1. Efecto de la temperatura	66
1.2.2. Efecto de la glucosa	67
1.2.3. Efecto de la actividad de agua	68
1.3. Selección final en FES del microorganismo adecuado	71
2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA CEPA 91	72

CAPÍTULO II

Selección del sustrato para la FES 74

1. ELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO	75
1.1. Efecto del tipo de sustrato	75
1.2. Efecto del tamaño de partícula del sustrato	78
1.3. Isoterma de sorción del sustrato soja:afrechillo de arroz (7:3)	80
1.4. Efecto del modo de cultivo	82

2. SUPLEMENTACIÓN DEL SUSTRATO	85
2.1. Adición de fuentes de carbono	85
2.2. Adición de fuentes de nitrógeno	88
2.3. Adición de fuentes externas de proteína	90

CAPÍTULO III

Caracterización de la FES

<i>Efecto de las variables de fermentación</i>	94
--	----

1. ESTIMACIÓN DE BIOMASA EN FES	95
2. CINÉTICA Y MODELADO DE LA FES	100
2.1. Efecto del contenido de agua inicial	102
2.2. Efecto del pH inicial	109
2.3. Efecto de la temperatura de fermentación	114
3. EVOLUCIÓN DEL PESO SECO Y CONSUMO DE SUSTRATO	120
4. ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD TOTAL DE LA FES	131
5. EVOLUCIÓN DEL PH DE LA FES Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES DE PROCESO	135
5.1. Evolución del pH en la FES	135
5.2. Relación entre conidiación, producción de proteasa y pH de la fermentación	139
5.3. Consideraciones acerca de la Regulación por pH	144
6. AGUA	149
7. EFECTO COMBINADO DE VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl Y DEL CONTENIDO DE AGUA INICIAL DEL SUSTRATO SOBRE LA MÁXIMA PRODUCCIÓN DE PROTEASA Y CONIDIOS	160

CAPÍTULO IV

Caracterización del extracto proteolítico de *Aspergillus niger* 91 producido por FES

	165
1. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO	166
1.1. Temperatura óptima y estabilidad	167
1.2. pH óptimo y estabilidad	177
2. PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL EXTRACTO	180

CONCLUSIONES	192
---------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	195
---------------------	-----

*INTRODUCCIÓN
Y
OBJETIVOS*

1. Fermentación en Estado Sólido

Los procesos conocidos como fermentación en estado sólido (FES) o bien en sustrato sólido comprenden aquellas fermentaciones en las cuales el crecimiento del microorganismo ocurre sobre un material sólido y en ausencia de agua libre de tal modo que dicho material actúa simultáneamente como fuente de nutrientes y soporte del crecimiento del microorganismo (Terebiznik, 1998).

La **Tabla 1.1** muestra las principales diferencias entre una fermentación en sustrato sólido y una fermentación en medio líquido (Mitchell, 1992d). Las diferencias entre ambas metodologías surgen fundamentalmente de la disponibilidad del agua, la relación de ésta con el sustrato y del tipo de sustrato empleado.

En general la metodología empleada en el desarrollo de un proceso de FES es sencilla y puede ser resumida en los siguientes puntos (Lonsane, 1985) :

- Preparación del sustrato sólido: usualmente con un pre-tratamiento para disminuir el tamaño de la partícula o aumentar la disponibilidad de nutrientes para el microorganismo. En esta etapa se pueden agregar nutrientes adicionales y el pH puede ser ajustado.
- Cocción del sustrato: El sustrato por lo general se esteriliza o por lo menos se pasteuriza. Este procedimiento además, causa la absorción de agua por parte de las partículas del sólido.
- Preparación del inóculo, ya sea por técnicas tradicionales (cultivos mixtos provenientes de una fermentación anterior) o por técnicas de cultivos puros.
- Inoculación del sustrato sólido ya humidificado.
- Incubación en contenedores apropiados.
- Recolección de los sólidos fermentados.
- Secado de los sólidos fermentados o extracción del producto.
- Purificación del extracto y posterior procesamiento.

Tabla 1.1: Principales diferencias entre la fermentación en sustrato sólido y en medio líquido.

Fermentación en sustrato sólido	Fermentación en medio líquido
El medio de cultivo no fluye. La profundidad del medio de fermentación es pequeña, excepto en algunos biorreactores. Se utiliza un único sustrato, por lo general insoluble. El mismo, es la fuente de carbono, nitrógeno, minerales y energía. El sustrato sólido absorbe agua y se humedece para permitir el acceso a los nutrientes. La cantidad de agua es la suficiente para permitir un crecimiento y metabolismo óptimo del microorganismo y por lo tanto constituye una proporción pequeña del volumen total del medio de fermentación. El sistema involucra tres fases: sólida, líquida y gaseosa. La fermentación no se realiza en condiciones asépticas. No requiere un control riguroso de las variables de fermentación durante el proceso salvo la remoción del calor, la oxigenación y la humedad. La relación inóculo/medio es alta. El oxígeno para el crecimiento y metabolismo proviene principalmente de la fase gaseosa y en menor medida del oxígeno disuelto en la fase acuosa. La aireación provee el oxígeno y remueve el calor metabólico y los productos gaseosos. Por lo general el medio no requiere agitación. El crecimiento fúngico involucra la penetración de las hifas en las partículas de sustrato sólido. Las bacterias y levaduras crecen adheridos a las partículas sólidas. El medio al ser cosechado es un sólido húmedo que contiene a los productos de la fermentación muy concentrados.	El medio de cultivo fluye. La profundidad del medio de fermentación es altamente significativa. Se utilizan diferentes sustancias solubles cada una de las cuales provee carbono, nitrógeno, etc. Los nutrientes están homogéneamente distribuidos en el medio y están siempre disponibles. El agua es el componente mayoritario del medio de fermentación. Involucra, principalmente, dos fases: líquida y gaseosa. Todo el sistema está en condiciones asépticas. Es generalmente esencial el control de todas las variables de fermentación. La relación inóculo/medio es baja. El oxígeno disponible se encuentra disuelto en la fase acuosa. La aireación provee el oxígeno en la fase acuosa y remueve los productos gaseosos pero la remoción de calor se logra por enfriamiento con agua. La agitación es esencial para homogeneizar excepto en fermentaciones anaeróbicas. El crecimiento fúngico ocurre bajo la forma de micelio o de "pellets" de micelio uniformemente distribuidos. Las bacterias y levaduras crecen uniformemente distribuidos en el líquido agitado. El medio es líquido y los productos de la fermentación están más diluídos.

1.1. Características generales de la FES

La productividad de un sistema de fermentación en estado sólido se ve afectada por diversos factores. El factor más importante es el contenido de agua del sustrato. El agua es necesaria fundamentalmente para el desarrollo del microorganismo y su disponibilidad en el sustrato es la principal diferencia entre este tipo de procesos y las fermentaciones en medio líquido. El agua presente en un sistema de FES, se encuentra embebida en la matriz sólida (Cannel, 1980). El agua libre (agua no embebida en el sustrato) aparece una vez que la capacidad de absorción del sustrato sólido es excedida. No toda el agua contenida en el sustrato está disponible para el desarrollo de las funciones biológicas de los microorganismos. El parámetro actividad de agua (A_w) describe en forma más apropiada que el contenido de agua, o humedad del sustrato, el agua disponible para los microorganismos (Battaglino, 1991; Sarrete, 1992). Este parámetro está definido como el cociente entre la presión de vapor del agua del sustrato y la presión de vapor del agua pura para una misma temperatura y en un sistema en equilibrio, $A_w = \%HRe/100$ (HRe = humedad relativa de la atmósfera circundante al sustrato).

La baja cantidad de agua con que se llevan a cabo los procesos de FES, da lugar a las siguientes características (Mitchell, 1992d) :

- La actividad de agua de los sustratos sólidos puede ser significativamente inferior a 0,99. Esto tiende a favorecer el crecimiento de hongos filamentosos, muchos de los cuales tienen un desarrollo óptimo entre actividades de agua de 0,93 y 0,98. Para la mayoría de las bacterias y levaduras el crecimiento es óptimo a una actividad de agua alrededor de 0,99. Esta característica de la FES limita el tipo de microorganismo a utilizar en el proceso. De este modo, alrededor del 50% de los microorganismos utilizados en las aplicaciones de FES reportadas en los últimos 20 años fueron hongos filamentosos, 30% levaduras, 15% actinomicetes y el 5% restante bacterias (Gutiérrez-Rojas, 1995).
- La transferencia de calor tiende a ser restringida en FES, esto lleva a que en procesos realizados en gran escala, la temperatura del sustrato fermentado se eleve hasta valores que comprometen el desarrollo del microorganismo. El enfriamiento por evaporación es probablemente, el método más efectivo de remoción de calor en la FES, aunque esto reduce aún más el agua presente.

- Los sustratos son más concentrados en FES que en las fermentaciones en medio líquido. En estas últimas, el agua típicamente comprende el 90-99% del total de la masa, mientras que en FES solamente 10-85%. La concentración de sustratos solubles y productos puede alcanzar altos niveles, exacerbando efectos inhibitorios y represivos.

Los sustratos empleados en FES son generalmente materiales de origen agropecuario no refinados y por ende, son estructural y nutricionalmente complejos. Esta heterogeneidad dificulta la caracterización de la FES e interfiere con la reproducibilidad de las mediciones que se efectúan sobre ella. La presencia de mezclas de componentes de alto y bajo peso molecular puede llevar a complejos patrones de inducción, represión e inhibición en la regulación de metabolismo microbiano (Mudgett, 1986).

La estructura básica de los sustratos sólidos está conformada por macromoléculas. Estas son la fuente de carbono, nitrógeno y energía para el desarrollo microbiano. La utilización de las macromoléculas requiere la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas por parte del microorganismo.

La naturaleza sólida de los sustratos empleados en FES determina las siguientes características (Mitchell, 1992d) :

- La masa del sustrato no está distribuida uniformemente en el espacio, y existen espacios inter-partículas vinculados en forma continua con la fase gaseosa externa. En procesos del tipo “slurry”, estos espacios se encuentran sólo en contacto con la fase acuosa.
- Algunos sistemas de medición usados para el monitoreo de las variables de la fermentación en medio líquido no pueden ser usados porque el contacto necesario con el sustrato en FES no puede ser garantizado.
- El manejo de sólidos requiere un equipamiento especial.
- El flujo de sólidos es complejo. Mezclar sólidos durante el cultivo requiere reactores y agitadores especiales diseñados para evitar que el sustrato se compacte y el micelio se rompa.
- La mezcla del sustrato no puede lograrse en escalas inferiores al tamaño de la partícula sin provocar su destrucción. Por lo tanto en el interior de las partículas sólidas, la transferencia de masa ocurre por difusión.
- Dado que la matriz sólida limita la transferencia de oxígeno, el crecimiento microbiano está en gran parte restringido a la superficie de los sustratos sólidos. A

raíz de ello, los efectos del microorganismo en el sustrato se concentran en la superficie lo cual lleva a gradientes de concentración de sustratos, productos metabólicos, y pH dentro de las partículas sólidas.

Diversos autores han señalado las ventajas y desventajas de la FES con respecto a la fermentación en medio líquido (Aidoo, 1982; Mudgett 1986; Carrizales, 1986; Hesseltine, 1987; Mitchell, 1992d) En general las ventajas están asociadas a las características de simpleza, bajos costos y alta productividad de la FES. Mientras que las desventajas se relacionan con la falta de conocimiento científico de este tipo de procesos (como consecuencia de la dificultad de control y monitoreo de las variables del mismo) así como la falta de conocimientos y desarrollo tecnológico que permitan el manejo de estos procesos en gran escala.

Las ventajas de la FES con respecto a la fermentación en medio líquido, pueden ser resumidas en los siguientes puntos (Mudgett, 1986; Mitchell, 1992d) :

- Si bien pueden agregarse nutrientes suplementarios, por lo general los sustratos sólidos son simples y suelen requerir solamente la adición de agua. En general los pretratamientos aplicados al sustrato son sencillos (precocción con el agua de humectación, ruptura de la superficie del sustrato, molienda del sustrato) y se realizan con el solo objeto de incrementar la accesibilidad de éste por parte del microorganismo. A diferencia de esto en la fermentación en medio líquido se debe lograr la extracción de los nutrientes y su solubilización en la fase líquida.
- Los reactores pueden ser relativamente pequeños en relación al rendimiento del producto, dado que se usa poca agua y el sustrato está concentrado. Esto implica menor inversión de capital.
- Se pueden utilizar esporas como inóculo y por lo tanto no se requieren etapas previas que involucren grandes volúmenes y tanques para su desarrollo.
- La baja humedad y/o actividad de agua reduce el problema de contaminación especialmente en el caso de bacterias. A esto se suma la posibilidad de utilizar inóculos mucho más concentrados que en la fermentación en medio líquido, por lo cual las posibles contaminaciones se ven desplazadas, permite que los procesos de FES se desarrollen en condiciones de menor asepsia que los procesos en medio líquido.
- Las condiciones para el crecimiento de hongos son similares a las de su hábitat natural. Este punto justifica el hecho de que los hongos filamentosos se desarrollen en forma altamente satisfactoria en FES.

- La aireación es facilitada por espacios entre partículas y por la difusión del oxígeno en el agua que humecta a las partículas de sustrato. Debido a ello y a diferencia de lo que ocurre en medio líquido, no es necesario la aplicación de aireación forzada a alta presión ni mecanismos que agiten violentamente al lecho fermentado.
- Los rendimientos en la producción de metabolitos, pueden ser más altos que en medio líquido y suelen ser reproducibles.
- Los sólidos fermentados pueden ser extraídos inmediatamente por la adición directa de solventes o almacenados congelados hasta su extracción.
- Los procesos de purificación de los productos se ven simplificados por la mayor concentración de éstos en el líquido de extracción.

Las desventajas que presenta la FES frente a la fermentación en medio líquido pueden ser resumidas en las siguientes consideraciones (Mitchell, 1992d) :

- Si bien han sido realizadas FES con bacterias, la FES está restringida a microorganismos que pueden crecer en sistemas de humedad y/o actividad de agua reducida.
- La remoción de calor metabólico es un problema central, especialmente cuando el proceso se realiza en gran escala.
- La naturaleza sólida del sustrato dificulta la medición y control de los parámetros de la fermentación.
- La determinación de la biomasa que es fundamental para la caracterización del desarrollo microbiano no se puede hacer en forma directa ya que el microorganismo se encuentra íntimamente asociado con el sustrato.
- Muchos de los aspectos importantes, básicos y de naturaleza ingenieril, no están muy desarrollados o comprendidos en FES:
 - * Modo de crecimiento de los hongos en el interior de un sustrato compuesto por partículas de forma irregular.
 - * Cinética de crecimiento.
 - * Información cuantitativa para el diseño de reactores, criterios de salto de escala y optimización de procesos.
- Debido a que los microorganismos en FES presentan velocidades de crecimiento menores a las registradas en medio líquido, los tiempos de cultivo pueden ser mayores.

1.2. Historia, aplicaciones actuales y perspectivas

La FES fue probablemente el método más antiguo que utilizó el hombre para obtener beneficios de los microorganismos (Hesseltine, 1987). Existen innumerables procesos tanto de producción y/o de preservación de alimentos fermentados que se remontan a cientos de años en la Antigüedad y que actualmente perduran. El uso de salsa de soja y koji en Japón y el sudeste de Asia, se remonta a 1000 años antes de la era cristiana (a.C.) y hasta 3000 años a.C. en el caso de China (Pandey, 1992). Los microorganismos que actúan en estos procesos fermentativos son contaminantes naturales no patogénicos de los alimentos. Los mismos son responsables de la generación de cambios en la textura, aroma, color y propiedades nutricionales en el alimento fermentado. Estos cambios cualitativos de los alimentos mediante procesos de FES, han beneficiado a distintos grupos étnicos alrededor de todo el mundo (Paredes-Lopez, 1988). La **Tabla 1.2** muestra algunos de estos alimentos producidos tradicionalmente por FES y sus características.

La mayoría de los procesos de FES citados son llevados a cabo en unidades de pequeña escala: hogares, pequeños establecimientos agrícolas, etc. Sin embargo, algunos de ellos han sido llevados a escala industrial. Entre ellos el proceso de koji (fermentación de distintos granos por parte de hongos del género *Aspergillus* y que habitualmente es utilizado como sinónimo de FES) a partir del cual se producen anualmente en Japón millones de litros de salsa de soja y sake así como cientos de toneladas de miso (Carrizales, 1986).

El koji ha sido utilizado en forma empírica y durante centurias como una fuente de enzimas en la elaboración de la mayoría de los alimentos fermentados producidos en Asia. Las exoenzimas presentes en estos preparados incluyen: α -amilasa, maltasa, isomaltasa, invertasa, fitasa, β -amilasa, lipasa, fosfatasa, glucoamilasa, deaminasa, celulasas y proteasas. Otra modalidad de koji utilizada desde la antigüedad es el inóculo koji que como su nombre lo indica, actúa como cultivo “starter” de procesos fermentativos (Lonsane, 1992c).

Tabla 1.2: Alimentos tradicionales producidos por FES (Paredes-Lopez, 1988)

Sustrato	Producto	Comentarios	Microorganismos	Origen geográfico
soja y trigo	shoyu	aderezo líquido	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>bacterias y levaduras</i>	Malasia
soja	sufu	tofu fermentado	<i>Actinomucor elegans</i> <i>Mucor spp</i> <i>Rhizopus spp</i>	China
	hamma-nato	pasta salina	<i>Aspergillus oryzae</i>	Japón
	tauco	pasta salina amarilla	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>bacterias y levaduras</i>	Indonesia
	tempeh mata kedele	torta de cascarilla de soja	<i>Rhizopus spp</i>	Indonesia
	tempeh gembus	utiliza residuos de tofu como sustrato	<i>Rhizopus spp</i>	Indonesia
	tempeh kedele	torta de porotos de soja	<i>Rhizopus spp.</i>	Indonesia
soja y arroz	miso	aderezo en pasta	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Saccharomyces rouxii</i>	China Japón
maíz	Kaanga	fermentación de la mazorca entera	<i>bacterias y levaduras</i>	Nueva Zelandia
	Chicha	masa fermentada diluida para hacerla bebible	<i>Aspergillus spp</i> <i>Penicillium ssp</i> <i>levaduras y bacterias</i>	Perú
trigo	pan leudado		<i>Torulopsis spp</i> <i>Lactobacillus spp</i> <i>Saccharomyces spp</i>	Egipto (probable)
coco	tempeh bongkrek	coco prensado como sustrato	<i>Rhizopus spp</i>	Indonesia
maní	Oncom	maní prensado como sustrato	<i>Rhizopus spp</i>	Indonesia
mandioca (cassava)	tapé ketella	torta agri dulce fermentada	<i>Amylomyces rouxii</i>	Sudeste Asiático
arroz	ang-kak	polvo rojo utilizado como colorante	<i>Monascus purpureus</i>	China

El koji es preparado tradicionalmente en bandejas en las que se distribuye el sustrato cuidando que la profundidad no sea superior a 7 cm, lo que permite una buena disipación del calor metabólico y aireación del cultivo. Las bandejas se disponen en

hileras con cierta separación entre sí facilitando la circulación de aire. La temperatura se mantiene entre 25 y 30 °C y la humedad entre 80 y 90%, condiciones fáciles de lograr en una región de clima tropical (Carrizales, 1986).

Los preparados de koji enzimáticos que se agregan a los alimentos, consisten en el sustrato fermentado (que incluye la biomasa generada), exoenzimas y demás metabolitos microbianos que proporcionan aromas y pigmentos. De esta forma, no se realiza extracción alguna de enzimas a partir del koji, siendo su uso análogo al de la malta en la producción de bebidas alcohólicas.

La producción de koji como fuente de enzimas fue la base para el desarrollo de la tecnología de FES para producción y extracción de enzimas específicas a partir de sustratos sólidos de bajo costo. En el año 1896, Takamine produjo y comercializó el preparado enzimático con propiedades diastásicas llamado Takadiastasa. Más tarde introdujo este procedimiento en Occidente donde fue utilizado para reemplazar la malta de cebada en la producción de alcohol por fermentación de granos y papas. Hasta aproximadamente el año 1940, se obtuvieron distintos tipos de productos por FES (enzimas, antibióticos, alimentos) y a su vez el proceso fue enriquecido con distintos aportes tecnológicos como nuevos diseños de fermentadores. En la actualidad se producen en Japón a nivel industrial diversas enzimas de origen fúngico como celulasas, lipasas, amilasas pectinasas y proteasas. Las enzimas se producen en sistemas de fermentación derivados de la fermentación en bandejas utilizado en koji. Al sistema tradicional de bandeja se le adicionaron controles de humedad y temperatura mediante el empleo de cámaras con aire acondicionado y humidificado. Además se implementaron mecanismos que permiten la agitación o rotación del sustrato fermentado pudiéndose de esta forma mejorar la aireación y disipación de calor metabólico lo cual permite utilizar un mayor espesor de lecho de sustrato.

En Occidente a partir de los años 40 y 50 la industria de la fermentación abandona los procesos de FES y se centra en el desarrollo y utilización de la fermentación en medio líquido. Ya en la década del 60, debido a la necesidad de obtener cantidades importantes de micotoxinas, se renueva el interés en la FES. Esto ocurre como consecuencia de la gran producción de estos metabolitos obtenida por FES con respecto al rendimiento alcanzado por la fermentación en medio líquido. El abandono de los procesos de FES

por parte de los países occidentales, es considerado por Lonsane (1992b) como un error histórico. El autor fundamenta esta conclusión en la ventaja comparativa del desarrollo de las fermentaciones industriales en Japón con respecto a Occidente, así como en los conocimientos alcanzados en los últimos años sobre la FES que permitieron llevar a cabo en diversos centros de investigación de todo el mundo procesos de producción económicos y prácticos de diversos metabolitos, aplicando esta tecnología aún en el caso de fermentaciones mediadas por levaduras y bacterias.

Tabla 1.3: Principales aplicaciones de procesos de FES en diferentes sectores económicos (Raimbault, 1997).

Sector Económico	Aplicación	Ejemplos
Industria Agro-Alimenticia	Fermentaciones tradicionales de alimentos	koji, shoyu, miso, tempeh, sake, quesos fermentados (quesos azules)
	Producción de Mushroom e inóculo	<i>Agaricus, Pleurotus, Lentinus</i>
	Bioconversión de subproductos	bagazo de caña de azúcar, pulpa de café, compost, ensilado, detoxificación
	Aditivos alimenticios	saborizantes, esencias, aromas, colorantes, ácidos orgánicos
Agricultura	Biocontrol - Bioinsecticida	<i>Beauveria, Metarhizium, Trichoderma</i>
	Estimulación del crecimiento vegetal	<i>Trichoderma, Rhizobium</i> , hormonas (ácido giberélico)
	Micorrizas	<i>Tuber spp, Tricholoma</i> , producción de inóculo
Fermentación Industrial	Producción de enzimas	amilasas, celulasas, proteasas, pectinasas, xilanasas, lipasas
	Producción de antibióticos	penicilina, tetraciclina
	Producción de ácidos orgánicos	ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico
	Producción de etanol	<i>Schwanniomyces sp</i> (en sustratos amiláceos)
	Metabolitos fúngicos	alcaloides, micotoxinas, hormonas

La **Tabla 1.3** presenta una lista de procesos de FES actualmente desarrollados en los sectores económicos de agro-industria, agricultura y fermentación industrial. La mayoría de estos procesos se comercializan en países del Sudeste Asiático, Africa y

Latinoamérica, sin embargo el interés sobre los mismos también ha resurgido en los últimos 10 años en Occidente y Europa.

En función de esto, un tercio de la producción de enzimas de Japón, que es realizada a través de la obtención de koji por FES ha sido modernizada para producir ácidos orgánicos (entre otros) también en gran escala. La manufactura se ha sofisticado gradualmente con salas de fermentación de lecho fijo, tambores rotatorios, y cámaras automatizadas de acero inoxidable o bandejas con microprocesadores, sensores electrónicos, carga, descarga, y agitación servomecánica y reactores con capacidad de hasta 20 toneladas pueden ser contruidos por ingeniería local (Raimbault, 1997).

Fuera de Japón, en India, empresas de importancia en el mercado de enzimas desarrollan parte de su producción por FES. Biocon ha creado una unidad (Biochemizyme India) en Bangalore, dedicada totalmente a exportación y que en 1990 fue comisionada para manufacturar enzimas microbianas por FES (Biocon, 1999). Maps Ltd. una empresa que en 1974 se inicia en la producción de amilasas, proteasas y celulasas tanto por fermentación líquida como sólida, comenzó en 1995-96 un proceso de expansión que involucra inversiones para aumentar siete veces su equipamiento en el área de FES y sólo una para fermentación sumergida, lo que indica la proyección futura de este tipo de tecnología (Maps, 1999).

Procesos de koji, compost, producción de mushrooms y su inóculo (sobre granos estériles) han sido entre otros modernizados, adaptados a condiciones locales y escalados en Europa, Estados Unidos, Cuba, México y otros países occidentales.

En Francia varias firmas comercializan productos obtenidos por o para FES: pectinasas producidas sobre pulpa de remolacha (Lyven SA), conidiosporas de *Trichoderma* para ser usadas como biopesticida (Letellier), y un fermentador compuesto por 16 columnas comercializado internacionalmente por Gauthier, constituyen buenos ejemplos de ello. Asimismo la producción de quesos azules ha sido modernizada con mejoras en el áreas mecánica, la producción de esporas fúngicas y el control de las condiciones ambientales de los quesos (Raimbault, 1997).

Existe muy poca información disponible en lo que respecta a los aspectos económicos de los procesos de FES. Este hecho es consecuencia de la confidencialidad con que manejan este tipo de información las empresas productoras de metabolitos. Una

comparación económica detallada de la producción de glucoamilasa por FES con respecto a la producción en medio líquido fue reportada por Ghildyal (1985). Este autor encontró que en medio sólido se produce diez veces más enzima que en medio líquido. La inversión total de capital así como los costos de producción para una planta de 150 m³ de capacidad para la producción de esta enzima por FES, fueron estimados en un 18 y un 58% menores que los costos necesarios para una planta de fermentación en medio líquido con la misma capacidad. La gran ventaja de la FES radica en que la inversión necesaria para maquinaria, equipos y infraestructura edilicia es del orden del 10% de lo necesario para la fermentación en medio líquido.

Las distintas aplicaciones de la FES pueden dividirse desde un punto de vista económico en: aplicaciones de carácter socioeconómico y aplicaciones comerciales (Mitchell, 1992d). Las aplicaciones socioeconómicas de la FES ofrecen la posibilidad de una mejora significativa en las condiciones de vida de comunidades en vías de desarrollo mediante el empleo de metodologías de bajos requerimientos tecnológicos. De hecho, muchos de los procesos de FES que caen dentro de esta categoría y que actualmente están en uso, fueron desarrollados en este tipo de comunidades donde forman parte de la cultura tradicional. Estos procesos comúnmente permiten el aprovechamiento de residuos agropecuarios o domésticos o bien mejoran la calidad nutricional de harinas, preservan la calidad de productos agropecuarios o transforman subproductos de este origen en alimentos apropiados para humanos y ganado.

Ejemplos típicos de aplicaciones socio económicas de la FES son la producción de tempeh (mediante hongos del género *Rhizopus* se fermenta soja precocida lo cual lleva a un enriquecimiento de ésta en niacina, riboflavina, ácido pantoténico y vitamina B6), compost (tratamiento aeróbico de residuos que permite la degradación microbiana de desechos tóxicos para luego ser empleados como abono o relleno de suelos, o bien la producción anaeróbica de metano) y el ensilaje (proceso anaeróbico por el cual los productos agrícolas son fermentados por microflora productora de ácido láctico lo que disminuye su pH y ayuda a su preservación).

Las aplicaciones de carácter comercial de la FES incluyen la producción de enzimas y alimentos fermentados en gran escala. Con respecto a la producción de enzimas por FES, como ya fue discutido, estos procesos deben competir en muchos casos y

especialmente en los países de Occidente con la fermentación en medio líquido. La posibilidad de desarrollo de nuevos procesos de FES es amplio y se basa fundamentalmente en las ventajas comparativas que esta modalidad de fermentación presenta sobre la fermentación líquida, así como en lograr una eficiente explotación comercial de los procesos tradicionales o de interés socio económico. Los diferentes campos en los que se podría aplicar la FES de acuerdo a sus potencialidades y nuevos estudios realizados, podrían resumirse de la siguiente forma (Mitchell, 1992d) :

- La utilización de FES en procesos de producción de metabolitos fúngicos que habitualmente se producen en medio líquido.
- La posibilidad del empleo de FES no sólo en procesos que involucren la utilización de hongos filamentosos si no también bacterias y levaduras (para las cuales se han registrado buenos rendimientos de producción).
- La posibilidad de obtención de metabolitos que dependen de la diferenciación celular del micelio la cual habitualmente está suprimida o restringida en la fermentación en medio líquido.
- La transferencia de aplicaciones socioeconómicas de la FES a países industrializados. Esto permitiría la cooperación e intercambio entre regiones pobres y desarrolladas, además permitiría explotar mercados para alimentos fermentados en países desarrollados lo que a su vez redundaría en mejoras tecnológicas en los procesos de elaboración tradicional.
- La aplicación de procesos tradicionales en el enriquecimiento proteico de alimentos, especialmente productos agropecuarios con alto contenido de almidón o celulósico. Estos pueden ser utilizados para consumo directo humano o bien como forraje.
- La producción de metano a través de la digestión anaeróbica de desechos humanos, animales o residuos sólidos en general.
- La producción por FES de grandes cantidades de inóculo requeridas para la biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos del suelo, como pesticidas y herbicidas por medio de microorganismos.

En el caso de la producción de enzimas industriales el mayor potencial de la FES radica fundamentalmente en la reducción significativa de los costos de producción tanto para enzimas fúngicas como potencialmente para bacterianas y de levaduras. Por otro lado, las características de la FES en cuanto a su simpleza, bajo nivel de requerimiento tecnológico y de inversión de capital, permiten pensar en el desarrollo de pequeñas

unidades de producción de enzimas, asociadas a establecimientos agropecuarios aprovechando distintos desechos de este origen como sustrato para la obtención de un producto de valor agregado relativamente alto.

Una de las mayores limitaciones para la optimización de procesos en fermentación sólida, tanto en los que se refiere a la producción de enzimas como para el resto de las aplicaciones actuales y potenciales de la FES, es la falta de comprensión del sistema a raíz de las dificultades que presenta su estudio. Por ende es necesario la generación de conocimiento en lo que hace a los aspectos básicos del proceso, tanto físicos (propiedades básicas del sustrato sólido, fenómenos de transporte inter e intrapartícula, transferencia de calor) como biológicos (interrelación del microorganismo con el sustrato, agua, crecimiento, pH, inducción, represión) y el aspecto técnico (como modelado matemático, agitación, extracción de productos, cinética de crecimiento y de aparición de productos), que permitan el desarrollo de una ingeniería apropiada para estos sistemas. La misma tendría que permitir la mecanización así como la automatización de los procesos y el control eficiente de parámetros del sistema (Lonsane, 1992b).

1.3. Variables de proceso en FES

El estudio de la cinética de los procesos de FES, en cuanto a la caracterización de la producción de biomasa, el consumo de sustrato, agua, etc. no ha recibido el mismo grado de atención que el dado a la fermentación en medio líquido. La causa de ello es la dificultad asociada a la medición de los distintos parámetros que describen este tipo de fermentación.

La heterogeneidad de los medios empleados los cuales son nutricional y estructuralmente complejos (Pandey, 1992) unido a la falta de agua libre que caracteriza a estos sistemas y la heterogeneidad del sustrato a lo largo del tiempo, como consecuencia de su consumo por parte del microorganismo (Mitchell, 1992b), facilita la generación de gradientes y dificulta la medición y el control de variables durante el desarrollo de la FES.

Mitchell (1992b) sostiene que el bajo nivel de conocimiento de la cinética de crecimiento en FES proviene fundamentalmente de tres factores: la complejidad de la interacción micelio-sustrato, la heterogeneidad intrínseca del sustrato y la imposibilidad de obtener una medición directa de la biomasa.

Una buena definición que facilita la comprensión de este tipo de sistema fermentativo fue dada por Auria (1993), quien considera a la FES como un sistema de cuatro fases: una fase gaseosa continua que usualmente fluye a través de un lecho sólido, un lecho sólido compuesto por un soporte insoluble que a su vez contiene una solución acuosa con nutrientes solubilizados (la solución se encuentra fuertemente absorbida al sólido no observándose drenaje de la misma) y la cuarta fase es el microorganismo que crece dentro del soporte, en su superficie o bien en su espacio libre intraparticular.

En FES, la biomasa está asociada al sustrato de tal forma que la separación física para su cuantificación no es factible. Se recurre entonces al empleo de técnicas indirectas de medición. Estas técnicas se basan en la correlación entre el enriquecimiento del medio de cultivo con metabolitos provenientes de la biomasa (glucosamina, proteínas, ergosterol, DNA, ATP) y el desarrollo de la misma.

De lo expuesto arriba, es de entender que el problema a resolver para lograr un mejor entendimiento de estos sistemas, pasa por la caracterización de la cinética de producción de biomasa así como el desarrollo de modelos matemáticos los cuales son necesarios para predecir y optimizar este tipo de procesos (Mitchell, 1992b).

En un proceso de FES se puede considerar como variables críticas, en cuanto a su control y monitoreo, al intercambio de calor, humedad, A_w , aireación, y pH (Pandey, 1992; Prior, 1992). Estas variables afectan en gran medida el desarrollo de la fermentación en cuanto a crecimiento, consumo de sustrato y producción de metabolitos de interés.

La relación agua-masa seca cambia constantemente durante la FES, debido a la alteración estructural del sistema, liberación de productos en reacciones enzimáticas y producción de agua debido al metabolismo celular afectando por ello los resultados de la fermentación (Grajek, 1987). Sin embargo el efecto del contenido agua es indicado en forma más acertada por la actividad de agua A_w , que da idea del agua disponible para el microorganismo en el sistema (Battaglino, 1991).

Los valores óptimos de humedad para el crecimiento y utilización del sustrato varían entre 40% y 70% dependiendo del organismo y del sustrato utilizado en el proceso. Por ejemplo, el crecimiento de *Aspergillus niger* en sustratos amiláceos como cassava (Raimbault, 1980) y salvado de trigo (Nishio, 1979) alcanzó un valor óptimo con niveles de humedad considerablemente menores que los observados en sustratos como pulpa de café (Peñaloza, 1985) o bagazo de caña de azúcar (Roussos, 1989), probablemente debido a la mayor capacidad de retención de agua de éstos últimos sustratos. El A_w óptimo para el crecimiento de los hongos generalmente utilizados en FES es como mínimo 0,96 mientras que el valor de A_w límite para el crecimiento es generalmente mayor a 0,9. Esto sugiere que los hongos utilizados en procesos de FES no son especialmente xerofílicos (A_w limitante para el crecimiento: 0,62). Los valores óptimos de A_w para la esporulación de *Trichoderma viride* y *Penicillium roqueforti* son menores que los valores óptimos para el crecimiento (Gervais, 1988) por lo tanto el mantenimiento del A_w en niveles óptimos para el crecimiento permite desarrollar biomasa fúngica evitando la esporulación.

El desarrollo de la biomasa en el lecho de fermentación puede dar lugar (como consecuencia del limitado nivel de transferencia de calor que posee el sustrato) a un gradiente de temperatura. La FES, debido a su alta densidad de sustrato por unidad de volumen genera en el sistema mayor cantidad de calor por unidad de volumen que un cultivo líquido pudiéndose elevar la temperatura, si no es controlada, a magnitudes que frenen el crecimiento microbiano o bien que afecten la integridad del metabolito de interés (Prior, 1992).

El pH de la fermentación puede afectar tanto al crecimiento del microorganismo como a la producción y estabilidad del metabolito que se desee obtener. El estudio y control del pH durante la fermentación se ve dificultado por la generación de gradientes característicos de la FES. En este tipo de sistemas, es posible fijar un valor de pH inicial para lograr un rendimiento óptimo pero, más allá de esta condición inicial, el pH del medio evolucionará durante la fermentación en respuesta a las actividades metabólicas del microorganismo, la fuente de nitrógeno utilizada y el grado de crecimiento alcanzado por el cultivo. El control de esta variable en FES mediante soluciones de álcali o ácidos resulta poco efectiva. Un cierto grado de control del pH en FES puede

lograrse empleando diferentes proporciones de sales de amonio y urea (Raimbault, 1980) pero en general se prefiere que el microorganismo a utilizar se caracterice por un rango de pH óptimo amplio (Mitchell, 1988).

La importancia de la aireación en FES radica principalmente en:

- * Mantenimiento de condiciones aeróbicas.
- * Desorción de anhídrido carbónico.
- * Regulación de la temperatura del sustrato.
- * Regulación de los niveles de humedad.

El reactor más simple para FES es la bandeja. Este sistema está basado en el método tradicional de fermentación Koji (Aidoo, 1982). Las características básicas de este sistema según Mitchell (1992e) son:

- * Una capa relativamente fina de sustrato es esparcida en un área horizontal considerable.
- * No existe aireación forzada, ésta se ve facilitada por orificios en la base del contenedor y por el poco espesor del lecho del sustrato.
- * No se realiza mezclado del lecho fermentado.
- * La temperatura y la humedad pueden variar con la ambiental o bien ser controladas.

Las desventajas de este sistema según el mismo autor están dadas por la falta de automatización del proceso y por la gran área necesaria para la realización de un proceso en gran escala. Sin embargo este tipo de sistema es sumamente sencillo y fácilmente escalable pudiendo citarse ejemplos de reactores de este tipo que ya han sido utilizados en forma exitosa para la producción comercial de metabolitos (Lonsane, 1992b).

Un problema de la FES que es minimizado con el sistema de fermentación en bandeja es el aumento de la temperatura en un lecho fermentativo de espesor considerable como lo ya descripto. El pequeño espesor del lecho del sustrato utilizado en este caso permite también evitar sistemas de aireación forzada, Si bien desde el punto de vista económico esto es algo conveniente, el no contar con gases efluentes implica la falta de una herramienta importante para el seguimiento y estudio de la fermentación.

La falta de control de humedad, mas allá de la condición inicial del sustrato, representa un problema en este tipo de sistemas. El contenido de agua así como el A_w de la FES cambiarán (como consecuencia del desarrollo de la biomasa y evaporación) con respecto a la condición óptima inicial pudiendo ser esto la causa de una disminución del crecimiento fúngico o del rendimiento de la producción de un metabolito.

2. Proteasas

2.1. Orígenes y perspectiva actual

La producción y el procesamiento de proteínas ha constituido siempre una parte importante de las actividades humanas. Si bien el objetivo primario es lograr un adecuado suplemento de aminoácidos esenciales en los alimentos, también juegan un importante rol en otras áreas como la vestimenta, detergentes y otros.

Si bien tradicionalmente las enzimas de uso comercial han sido obtenidas de plantas y animales, dichas fuentes están siendo reemplazadas desde hace tiempo por razones tecnológicas y económicas por los microorganismos.

A partir de lo reportado por Aunstrup (1980) y Novo Nordisk (1999a) puede hacerse una breve reseña del desarrollo del uso industrial de proteasas.

La historia moderna de la tecnología de enzimas comienza realmente en 1874 cuando el químico danés Christian Hansen obtuvo cuajo de estómagos secos de ternera por extracción con solución salina, siendo ésta la primera preparación enzimática de pureza relativamente alta, usada con un fin industrial.

Previo a este evento tuvo lugar un largo proceso en el que las enzimas eran utilizadas por el hombre directamente en la forma de vegetales ricos en enzimas o de microorganismos usados con diferentes objetivos como la elaboración de cerveza, pan o la producción de alcohol. Referencias han sido encontradas sobre el empleo de enzimas en la producción de quesos en la Antigüedad, así en los poemas épicos griegos La Ilíada y La Odisea (800 a.C.) se sugiere la utilización de estómagos de corderos o cabritos (los que contienen la misma enzima que el estómago de ternero) en dicho proceso. Con el mismo objetivo fue también reportado el empleo de la savia de higo, la que contiene una proteasa llamada ficina.

En 1890 el científico japonés Takamine inició en Estados Unidos la producción de enzimas microbianas a escala industrial aplicando antiguas tecnologías tradicionales orientales. La preparación enzimática Takadiastasa obtenida por fermentación sólida de *Aspergillus oryzae* sobre arroz o salvado de trigo humedecido, contenía principalmente α -amilasa, pero también una cantidad considerable de proteasas por lo que fue

prontamente recomendado para aplicaciones proteolíticas y aún hoy es utilizada como auxiliar en la digestión.

En 1913 Boidin y Effront patentaron el proceso de producción de enzimas de *Bacillus subtilis* cultivado estáticamente como una película superficial sobre un caldo de granos macerados. De modo similar a Takadiastasa, el extracto contenía principalmente α -amilasa y actividad proteolítica significativa, y fue utilizado inicialmente para sustituir a la malta o las amilasas pancreáticas que en la industria textil actuaban removiendo el almidón aplicado sobre la trama para evitar el deshilachado durante el proceso de tejido. Como agente proteolítico fue usado en las curtiembres para suavizar cueros y depilado de la piel de carnero.

El proceso de ablandamiento de cueros y pieles previo al curtido elimina proteínas no esenciales para su resistencia y que impedirían una textura suave. Para esto se utilizaba tradicionalmente excremento de perros y palomas, hasta que investigaciones del químico alemán Otto Röhm que pensaba que la efectividad del mismo se basaba en la existencia residual de enzimas digestivas, permitieron su sustitución por un extracto de páncreas.

Paralelamente Röhm patentó en 1913 el primer detergente con enzimas que eliminara manchas de proteína en la ropa, intento que sólo sería efectivo 50 años después. Esta preparación contenía carbonato de sodio que ayudaba a disolver efectivamente la suciedad de la ropa, y enzimas pancreáticas (tripsina) cuyo efecto a un valor de pH de 10 era muy limitado.

El inicio de la Segunda Guerra Mundial reavivó el interés sobre la penicilina descubierta en 1928, y la necesidad de una producción a escala industrial impulsó el desarrollo de la tecnología de fermentación sumergida, la que fue adoptada durante la década del 50 por la industria de enzimas para obtener proteasas.

La escasez de recursos durante la guerra acrecentó el interés en agentes enzimáticos para remojo. En 1945 se testeó un nuevo producto desarrollado en Suiza por el Dr. Jaag, basado principalmente en proteasa pancreática, ajustándose el resto de los componentes de modo que el pH en la solución estuviera en el rango de acción de la enzima; sin embargo no tuvo gran suceso. En 1959 el Dr. Jaag sustituyó la tripsina pancreática por una proteasa de *Bacillus subtilis*, no siendo aún la preparación ideal. Pero un año

después se introdujo otra proteasa producida por *Bacillus licheniformis*: la Subtilisina Carlsberg que era poco afectada por los otros componentes del polvo de lavar y era activa a las temperaturas deseadas.

El suceso causado por esta preparación llevó a que en 1969 casi el 50% de los detergentes de Europa y Estados Unidos contuvieran enzimas proteolíticas. Este crecimiento explosivo fue frenado momentáneamente a principios de los años 70 ante el descubrimiento de alergias en trabajadores de fábricas de detergentes causadas por las enzimas. Sin embargo una investigación de la Academia Nacional de Ciencias (U.S.A.) determinó que el uso de enzimas en detergentes era inocuo para el consumidor y finalmente la utilización de granulados enzimáticos libres de polvo disminuyó el problema en las fábricas.

La proteasa animal más importante es el cuajo de ternero, utilizada en la manufactura de queso. Debido a su alto costo se han buscado sustitutos microbianos que coagulen la leche pero que también den un sabor aceptable al queso.

Arima en 1960 encontró una proteasa de *Mucor pusillus* que reunía estas características, la que se comenzó a producir industrialmente en Japón en 1970 en fermentación sólida. En 1965 Aunstrup encontró que *Mucor miehei* producía una enzima similar obtenida con buen rendimiento por cultivo sumergido en la industria a partir de 1972. Ambas enzimas son ampliamente usadas en la industria láctea produciendo en las condiciones adecuadas quesos de igual calidad que el cuajo.

La disponibilidad de información acerca del desarrollo del mercado de enzimas es limitada y generalmente está basada en proyecciones. En 1970 se registraron \$40-\$50 millones en ventas mundiales de enzimas; en 1977 se alcanzaron \$180 millones (estimado por Gist Brocades); en 1981/82 puede haber llegado a \$310 millones; y estimados profesionales para 1988 llegan a \$571 millones (Uhlig, 1998).

En la **Figura 2.1** se muestra una estimación del mercado mundial clasificada por tipo de enzima, realizada por Wainwright (1992). De acuerdo a esto y como hace más de 15 años, las proteasas son las enzimas industriales más importantes y abarcan valores próximos al 60 % del mercado (Godfrey, 1983), siendo de origen microbiano los dos tercios de las proteasas producidas comercialmente (Kalisz, 1988).

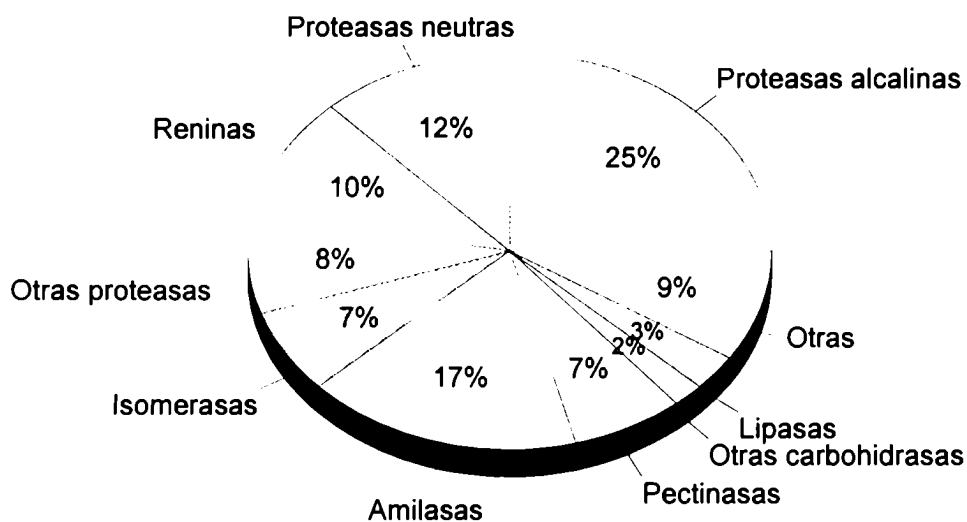


Figura 2.1: Mercado mundial aproximado de enzimas.
(adaptado de Wainwright, 1992)

Si bien las aplicaciones originales de las proteasas aún se mantienen, muchas otras han surgido (que serán descritas más adelante), correlacionándose la aparición de productos con la búsqueda de enzimas con propiedades nuevas y más eficientes.

2.2. Clasificación y propiedades

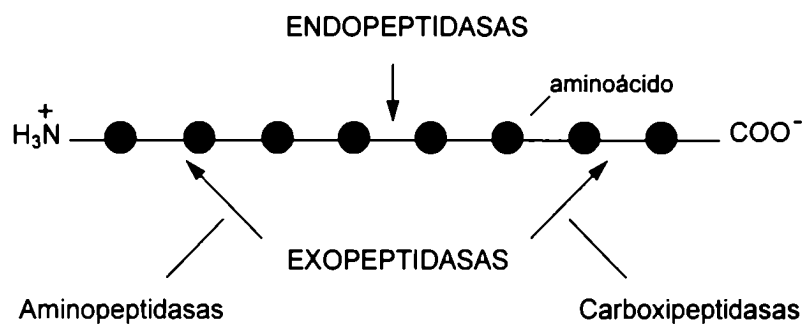


Figura 2.2: Clasificación de proteasas de acuerdo a su acción catalítica.

Las proteasas son enzimas capaces de clivar proteínas en pequeños péptidos y aminoácidos.

Son clasificadas de acuerdo a su fuente (animal, vegetal o microbiana), a su acción catalítica (endopeptidasa o exopeptidasa), y a la naturaleza de su sitio catalítico (Adler-Nissen, 1993).

En la **Figura 2.2** se observan los tipos de ataque de la proteasa al polipéptido (adaptado de Boyce, 1986). Las endopeptidasas clivan la cadena polipeptídica en su interior, en uniones particularmente susceptibles y son subclasificadas según su mecanismo catalítico.

Las exopeptidasas hidrolizan un aminoácido o dipéptido por vez, del extremo N terminal (aminopeptidasa) o C terminal (carboxipeptidasa) y tienen una importancia secundaria ya que no pueden completar la digestión rápidamente. Las aminopeptidasas están ampliamente distribuidas, pero su disponibilidad como productos comerciales es escasa ya que son intracelulares o están unidas a membrana, lo que incrementa su costo de obtención. Las carboxipeptidasas están presentes como componentes minoritarios de preparaciones comerciales que contienen endoproteasas, particularmente en hongos y enzimas del tracto digestivo (pancreatina); también son subdivididas de acuerdo a la naturaleza de su sitio catalítico (Adler-Nissen, 1993).

La elección del tipo de enzima en un proceso dependerá entonces de los requerimientos acerca de los productos de hidrólisis, los que determinarán las propiedades del producto. A partir del análisis de sus propiedades in vitro, las proteasas pueden ser clasificadas de varios modos, por ejemplo basándose en el rango de pH en el que son activas (ácidas, neutras o alcalinas), o en su capacidad para hidrolizar proteínas específicas (queratinasa, elastasa, collagenasa, etc.), o bien en su similitud con otras enzimas ya caracterizadas (tripsina, quimotripsina, pepsina, catepsina, quimosina). Hartley (1960) propuso la clasificación más satisfactoria fundamentada en su mecanismo catalítico y la que constituyó la base para la clasificación dada por la Enzyme Commission (EC) que se muestra en la **Tabla 2.1** (Löffler, 1986). De acuerdo a esto hay cuatro tipos de proteasas: serín, cisteín, metalo y aspártico que pueden ser distinguidas entre sí por su sensibilidad a varios inhibidores.

Tabla 2.1: Clasificación de proteasas basada en su sensibilidad a inhibidores.

Tipo	Inhibidores	Ejemplos
Serin proteasas EC 3.4.21	Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) Diisopropilfluorofosfato (DIFP)	Tripsina Quimotripsina Elastasa
Cistein proteasas EC 3.4.22	Metales pesados p-clorobenzoato Iodoacetamida N-etil maleimida L-tosil-amido-2 feniletil-clorometil cetona (TPCK) ^a Antipaina ^a Leupeptina ^a	Papaína Catepsina
Métalo proteasas EC 3.4.24	Agentes quelantes Etilendiamintetraacetato (EDTA) o-fenantrolina 8-hidroxiquinolina	Carboxipeptidasa A Colagenasa Termolisina
Aspártico proteasas EC 3.4.23	Pepstatin Diazoacetil norleucina metil ester Epoxi (p-nitrofenoxi) propano	Pepsina Quimosina Renina

^a También pueden inhibir algunas serin proteasas (North, 1982).

En un principio se creía que las proteasas tenían amplia especificidad hacia su sustrato. Sin embargo Morihara (1974) observó que la mayoría de las proteasas microbianas podían exhibir fuerte especificidad hacia sustratos sintéticos o bien hacia la cadena B de insulina. Dicha especificidad fue determinada por los residuos de aminoácidos cercanos al punto de corte (especificidad primaria) y en algunos casos la misma fue también determinada por los residuos de aminoácidos que estaban lejos del punto de corte (especificidad secundaria). Por lo tanto como se observa en la **Tabla 2.2**, fue posible clasificar las proteasas teniendo en cuenta no sólo su sensibilidad a inhibidores sino también su especificidad primaria.

Las características correspondientes a cada grupo de proteasas, adicionales a las ya presentadas en las **Tablas 2.1 y 2.2** fueron resumidas por Kalisz (1988) y se indican a continuación.

Tabla 2.2: Clasificación de proteasas microbianas basada en su especificidad.

Tipo	Especificidad primaria	Ejemplos
Serin proteasas		
Tipo Tripsina	Aminoácidos con residuo básico en el lado carboxilo del punto de corte	<i>Streptomyces griseus</i> <i>S. fradiae</i> <i>S. erythreus</i>
Alcalina	Aminoácidos con residuo aromático o hidrofóbico en el lado carboxilo del punto de corte	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>S. griseus</i> , <i>S. rectus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
Myxobacter-γ-lítica	Aminoácidos con pequeños residuos alifáticos en el lado carboxilo del punto de corte	<i>Sporangium sp.</i>
Estafilococal	Aminoácidos con residuos de ácidos aspártico o glutámico en el lado carboxilo del punto de corte	<i>Staphylococcus aureus</i>
Cistein proteasas		
Clostripaína	Aminoácidos con residuos básicos en el lado carboxilo del punto de corte	<i>Clostridium hystolyticum</i>
Estreptococal	Amplia	<i>Streptococci Grupo A</i>
Métalo proteasas		
Neutra	Aminoácidos con residuos hidrofóbicos o voluminosos en el lado amino del punto de corte	<i>Bacillus subtilis</i> <i>B. thermoproteolyticus</i> <i>B. cereus</i> <i>B. megaterium</i> <i>S. griseus</i> <i>A. oryzae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>C. hystolyticum</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>
Alcalina	Amplia	<i>Serratia sp.</i>
Myxobacter proteasa I	Aminoácidos con residuos de bajo peso molecular en uno o ambos lados del punto de corte	<i>Sporangium sp.</i>
Myxobacter proteasa II	Aminoácidos con residuo lisina en el lado amino del punto de corte	<i>Myxobacter AL-I</i>
Aspártico proteasas	Aminoácidos con residuos aromáticos o hidrofóbicos a ambos lados del punto de corte	<i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> <i>Penicillium notatum</i> <i>Rhizopus chinensis</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Endothia parasitica</i> <i>Candida albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Rhodotorula glutinis</i>

2.2.1. Serin proteasas

Es el grupo más ampliamente distribuido entre las enzimas proteolíticas tanto de origen microbiano como animal.

Presentan un residuo de serina reactivo en el sitio activo y algunas de ellas tienen también un residuo de cisteína cercano al mismo, que si bien aparentemente no participa en el mecanismo catalítico, la unión de esta cisteína con un residuo voluminoso puede interferir con la asociación al sustrato (North, 1982).

Son generalmente activas a pHs neutros y alcalinos, con un óptimo entre pHs 7 y 11. Tienen amplia especificidad de sustrato, incluyendo considerable actividad esterolítica hacia muchos sustratos éster. Presentan en general bajo peso molecular: 18500-35000 Da con algunas excepciones, como la serin proteasa de *Blakeslea trispora* con 126000 Da (Govind, 1981).

Se subdividen en cuatro grupos de acuerdo a su especificidad de corte contra la cadena B de insulina (**Tabla 2.2**). La mayoría de sus puntos isoeléctricos se encuentran entre 4,4 y 6,2 , presentando sin embargo valores cercanos a 9 las pertenecientes a los grupos Tripsina y Alcalinas.

En general el rango de mayor termoestabilidad de estas enzimas está entre 50 y 60 °C (Adler-Nissen, 1993).

2.2.2. Cistein proteasas

Las enzimas más representativas de este grupo, por su utilidad en la industria de alimentos provienen de fuentes vegetales: papaína de papaya, bromelaína de ananá y piña y ficina de higo (Adler-Nissen, 1993).

Reportes de su existencia en hongos son muy limitados y en estos casos las hay tanto intra como extracelulares. La mayoría de estas enzimas son activas entre pHs 5 y 8 (Kalisz, 1988).

Dada la existencia de un tiol (SH) reactivo de cisteína en su sitio activo, son inactivadas por agentes oxidantes y por exposición al aire; algunas de ellas son estimuladas por agentes reductores. Se dividen en dos grupos de acuerdo a su especificidad de corte (**Tabla 2.2**).

Los pesos moleculares reportados oscilan entre 20000 y 50000 Da y los puntos isoelectricos entre 4,8 y 8,8 (Kalisz, 1988; Adler-Nissen, 1993).

2.2.3. Metaloproteasas

Estas enzimas de características variadas abarcan en conjunto un amplio rango de pH óptimo entre 5 y 9 y son sensibles a agentes quelantes. Muchas de estas proteasas inhibidas por EDTA pueden ser reactivadas por iones como cinc, calcio y cobalto.

Están ampliamente distribuidas, pero sólo unas pocas han sido reportadas en hongos. La mayoría de las metaloproteasas bacterianas o fúngicas contienen átomos de cinc reactivo en su sitio activo variando en una proporción de 0,2 a 4. Mientras el cinc es necesario para la actividad, la mayoría requiere calcio para estabilizar la molécula.

Los pesos moleculares reportados oscilan entre 17000 y 60000 Da (Kalisz, 1988).

Si bien Morihara (1974) las subdividió originalmente en cuatro grupos (**Tabla 2.2**), una clasificación posterior reconoció una categoría adicional de acuerdo a la especificidad de corte y al pH de acción (North, 1982). De este modo se dividen en:

- Ácidas: producidas por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, con bajos pHs óptimos, 5 y 6, y los menores pesos moleculares.
- Neutras: con pH óptimo próximo a 7 y termoestabilidad variable entre 50°C como límite para la Neutrasa de *Bacillus amyloliquefaciens* y temperaturas superiores a 80°C para la termolisina de *Bacillus stearothermophilus*.
- Alcalinas: con pHs óptimos entre 7 y 9 y los pesos moleculares mayores.
- Myxobacter Proteinasa I: con pH óptimo 9, bajo peso molecular y capacidad lítica sobre las paredes celulares de bacterias Gram ⁺.
- Myxobacter Proteinasa II: con pH óptimo entre 8,5 y 9 con amplia estabilidad al pH (3-9), bajo peso molecular y prolongada estabilidad a 50°C.

2.2.4. Aspártico proteasas

Están ampliamente distribuidas en hongos y en menor proporción en bacterias.

Se caracterizan por tener actividad máxima a bajos pHs, entre 2,5 y 4. La mayoría tiene pesos moleculares entre 30000 y 45000 Da, y sus puntos isoelectricos entre pHs 3,4 y 4,6.

Tienen una misma especificidad de corte (**Tabla 2.2**) y el sitio catalítico involucra dos residuos de ácido aspártico (Kalisz, 1988).

Muchas de estas proteasas fúngicas son inestables por encima de pH neutro. Las especies fúngicas que las producen frecuentemente acidifican el medio y dada la estabilidad de estas enzimas no son encontradas en cultivos creciendo a pH neutro o alcalino (North, 1982).

De acuerdo al tipo de actividad se dividen en:

- tipo Pepsina: exhiben propiedades físicas y químicas similares a la pepsina gástrica animal, baja actividad esterolítica. Son extracelulares y están presentes en hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, y *Neurospora*.
- tipo Renina: si bien comparten también propiedades con la pepsina, tienen la capacidad de coagular la leche de modo similar a la renina animal (quimosina). Se encuentran en *Endothia*, *Mucor* y *Aspergillus*.

Análisis iniciales por secuencia de aminoácidos y cristalografía de rayos X revelaron un considerable grado de homología entre las proteasas aspárticas fúngicas y las de mamíferos como pepsina y quimosina, sugiriendo la existencia de un gen ancestral común (North, 1982).

Rawlings (1995) divide a las proteasas aspárticas en once familias de acuerdo a estas homologías. Dos de ellas involucran mayoritariamente los productos de hongos industriales: Pepsina y Scytilidopepsina.

Todos los miembros de la Familia Pepsina (A1) han sido encontrados en eucariotas. Aquí se incluyen entre otras, la pepsina y quimosina gástrica animal, la catepsina D lisosomal animal, proteasas de levaduras, reninas de *Mucor* y aspergillopepsina I de *Aspergillus*.

Son sintetizadas en un precursor con péptido señal. La molécula presenta dos lóbulos homólogos (estructura similar) con una hendidura central, indicando la existencia de una enzima ancestral generada por duplicación y posterior fusión génica. Cada lóbulo contribuye con un ácido aspártico para formar el par necesario en el sitio activo.

Cada gen que genera un lóbulo está formado por nueve exones e intrones, pero su distribución en los lóbulos homólogos es poco similar lo que indica que la inserción de los intrones en el gen ancestral fue posterior a la duplicación que formó los dos lóbulos. Dentro de la Familia Pepsina hay conservación de puentes disulfuro, de sitios de glicosilación y de la capacidad de inhibición por pepstatina.

La Familia Scytalidopepsina (U18) involucra a un grupo de proteasas insensibles a pepstatina y con mayor termoestabilidad que las correspondientes a la Familia Pepsina. Proviene de varios hongos (*Aspergillus*, *Scytalidium*) y bacterias (*Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*).

La scytalidopepsina B de *Scytalidium* y la aspergillopepsina II de *Aspergillus* muestran secuencias homólogas. En los correspondientes sitios activos tienen un residuo de glutamina que reemplaza al ácido aspártico de las pepsinas. Son enzimas secretorias sintetizadas a partir de un precursor cuyo gen no posee intrones.

2.3. Funciones

Las enzimas proteolíticas producidas intra y extracelularmente juegan un rol importante en los procesos metabólicos y regulatorios de plantas, animales y microorganismos procariotas y eucariotas. Algunas de las funciones en las que están involucradas son (Kalisz, 1988):

- **Recambio de proteínas**

Este es un proceso continuo y similar en todas las células vivientes, con diferentes tasas de recambio para cada proteína y fracción subcelular. Permite eliminar proteínas anormales (mutantes) y es esencial para la adaptación de las células a nuevas condiciones ambientales. La proteólisis de polipéptidos sin valor, provee a la célula de una reserva de aminoácidos como precursores para la resíntesis de proteínas. En condiciones de hambre de nutrientes, donde se requieren proteínas con nuevas funciones, las mismas pueden ser entonces sintetizadas con poco cambio neto del contenido de proteínas de la célula.

- **Esporulación**

Condiciones de hambreado o carencia de nutrientes inducen la formación de esporas bacterianas, ascosporas de levaduras y fructificación en hongos, procesos todos que involucran intenso recambio de proteínas. Los procesos proteolíticos juegan importante papel en la transición del crecimiento vegetativo a la formación de esporas en bacterias y levaduras. Tanto proteasas intra como extracelulares son necesarias en la esporulación de *Bacillus*, viéndose también en *Aspergillus* una correlación entre secreción de proteasa y conidiación (Kalisz, 1988).

- Germinación

Durante la germinación de esporas las proteasas hacen disponibles los aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevas enzimas y para proveer la fuente de nitrógeno para la síntesis de nucleótidos. La espora durmiente carece de la mayoría de aminoácidos libres y es incapaz de sintetizarlos de novo debido a la ausencia de las enzimas correspondientes.

- Modificación enzimática

Esta función involucra procesos de activación de precursores inactivos a formas activas por acción proteolítica e inactivación enzimática por pérdida irreversible de actividad catalítica in vivo por proteólisis, en respuesta a cambios fisiológicos y ambientales. Así enzimas anabólicas no necesarias durante la fase estacionaria son inactivadas durante o previo a la esporulación haciendo disponibles péptidos y aminoácidos para este proceso.

- Maduración de proteínas y secreción

Muchas proteínas son sintetizadas como precursores y seguidamente procesadas por proteólisis limitada obteniéndose así el producto maduro. Los eventos de maduración en los que existe proteólisis son: remoción de la N-formilmetionina o metionina del polipéptido naciente, remoción del péptido señal de proteínas que atraviesan membranas celulares, clivaje del producto de traducción de un mRNA policistrónico para dar varias cadenas y conversión de proproteínas en productos biológicamente activos.

- Nutrición y patogénesis

Las proteasas extracelulares están involucradas en la degradación de proteínas exógenas a péptidos y aminoácidos previo a su absorción por la célula. Generalmente

tienen amplia especificidad de sustrato y pueden degradar la mayoría de las proteínas no estructurales como albúmina, insulina, caseína o hemoglobina.

La patogenicidad de muchos microorganismos se correlaciona con su actividad proteolítica extracelular ya que estas enzimas pueden causar infecciones, hidrolizar proteínas estructurales y de tejido conectivo, clivar la inmunoglobulina IgA responsable de la defensa de mucosas, y utilizar proteínas del huésped para su nutrición.

2.4. Métodos de producción

Si bien diferentes fuentes vegetales, animales y microbianas pueden ser usadas para la producción de enzimas industriales, existe una preferencia hacia la obtención de enzimas a partir de microorganismos debido a la limitada disponibilidad de tejidos de animales y plantas y a ventajas tales como la pureza, economía, consistencia, facilidad en la modificación del proceso, disponibilidad de sustratos baratos y tecnología para un escalado sencillo de la producción (Lonsane, 1992c).

Considerando otro aspecto dentro de la producción de enzimas, la obtención de enzimas exocelulares tiene mayores ventajas sobre las intracelulares: mayor estabilidad ante variaciones de temperatura, fuerza iónica y pH, debido a que son liberadas al medio en el ambiente de crecimiento del microorganismo; existe la posibilidad de reciclaje del microorganismo, reduciendo costos y tiempos de producción; y los métodos de separación del producto y purificación son más simples y económicos (Ferrero, 1995).

Los métodos de fermentación usados para la producción de proteasas microbianas son similares a los utilizados para otros productos de fermentación. La fermentación en estado sólido es aún usada principalmente para producir proteasas de *Aspergillus* y *Mucor*, mientras que por fermentación sumergida se obtienen fundamentalmente proteasas de *Mucor miehei*, *Endothia parasitica* y *Bacillus* (Aunstrup, 1980). En general los procesos de FES constituyen la técnica dominante en Asia y Africa, mientras que los de cultivo sumergido son mayormente practicados en los países más industrializados (Lonsane, 1992c).

2.4.1. Fermentación en Estado Sólido

La fermentación se realiza en bandejas con un espesor de sustrato entre 1 y 10 cm, o en tambores rotatorios que facilitan la aireación del sustrato. El microorganismo crece sobre el medio sólido humedecido constituido preferentemente por salvado de trigo o arroz u otros residuos agroindustriales con agua y en algunos casos otros aditivos, esterilizado habitualmente por vapor e inoculado con esporas. Para la obtención de buenos rendimientos en proteasa resulta de importancia mantener una alta relación de nitrógeno inorgánico a carbono (Kalisz, 1988).

Como en todo sistema de FES es dificultoso el control del pH y la suplementación con componentes del medio durante el crecimiento del microorganismo. Sin embargo la alta tasa de aireación obtenible (por flujo de aire húmedo) y la baja concentración de agua permite obtener de un mismo hongo un rango más amplio de enzimas o con propiedades más favorables que por fermentación sumergida (Kalisz, 1988).

Así la renina producida por *Mucor pusillus* es siempre obtenida por FES no sólo por su mayor rendimiento sino por poseer menor actividad lipolítica y proteolítica, las que son causa de indeseable rancidez y sabor amargo respectivamente, en el proceso de maduración del queso (Lonsane, 1992c).

Aspergillus oryzae produce en medio sólido proteasas ácidas, neutras y alcalinas (Battaglino, 1991), mientras que en medio líquido sólo una serin proteasa, asimismo existen diferencias en la glicosilación de estas enzimas relacionado con el tipo de fermentación por el que fueron obtenidas y teniendo ésto implicancias sobre su estabilidad (Tsujita, 1976).

También se obtuvo producción de distintas proteasas por FES con cepas de *Rhizopus*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* algunas con aplicación comercial y secretadas al medio conjuntamente con otras enzimas como α -amilasas, glucoamilasas, celulasas y pectinasas que son eliminadas generalmente del producto final (Lonsane, 1992c).

Sin embargo hay poca información disponible acerca de la cinética del proceso y la interacción de las distintas variables en FES, lo que vuelve de interés su estudio.

Finalmente la proteasa es usualmente recuperada por extracción del sustrato fermentado con agua o buffer de pH adecuado, filtración y purificación por los métodos habituales,

para finalmente ser comercializada en forma líquida o sólida por precipitación con solventes o secado spray (Kalisz, 1988).

2.4.2. Fermentación sumergida

El equipamiento tradicional usado para la producción de enzimas consiste en altos tanques cilíndricos de acero inoxidable de 10 a 100 toneladas de capacidad, con fuertes agitadores mecánicos y aireadores (Kalisz, 1988).

Muchos de los componentes del medio de cultivo son productos agrícolas baratos de provisión continua y calidad uniforme. El medio es relativamente concentrado (10-15 % de sólidos secos), con alto contenido de proteínas y se evita comunmente que la concentración de aminoácidos libres sea elevada pues esto frecuentemente inhibe la formación de proteasas (Aunstrup, 1980). La esterilización es en general un proceso alta temperatura/corto tiempo.

El consumo de carbohidratos durante la fermentación es alto, pero compuestos como glucosa que tienden a reprimir la producción de la enzima son mantenidos al mínimo o agregados por alimentación a distintos tiempos, o bien son reemplazados por carbohidratos de lenta metabolización como lactosa o almidón. Al final de la fermentación los sólidos secos y la viscosidad deben ser bajos, la masa de células fácilmente separable y los carbohidratos y aminoácidos libres mínimos (Kalisz, 1988).

Las enzimas extracelulares son producidas en cultivos por lote en ciclos de 30-150 horas. Muchos de estos procesos requieren alta demanda de oxígeno, aireación y agitación vigorosas. Los procesos por lote son económicamente más atractivos debido a la relativa ineficiencia en la utilización del medio en el cultivo continuo. El proceso es a menudo finalizado cuando se alcanza la máxima productividad (g/l.h), que no siempre coincide con la máxima producción pero que permite obtener un medio de fácil recuperación enzimática (Aunstrup, 1980).

Dentro del género *Bacillus* se buscan mutantes asporogénicos que no detengan la producción de la enzima y otros que no liberen productos indeseables al medio. *Bacillus licheniformis* además de producir la subtilisina Carlsberg, una serin proteasa, libera también α -amilasa y α -glucosidasa que son hidrolizadas por la proteasa quedando casi como único producto al final del cultivo con un rendimiento superior al 10% respecto

del contenido inicial de proteína. Estas cepas no deben producir el antibiótico bacitracina, pues es inhibidor competitivo de la proteasa, ni tampoco D-glutamilpolipéptido que aumenta la viscosidad del medio.

La subtilisina Novo (serin proteasa) es producida por *Bacillus amyloliquefaciens* junto con otras enzimas extracelulares: α -amilasa, β -glucanasa, hemicelulasa y una metaloproteasa. Todas las restantes enzimas son inestables excepto la α -amilasa que permanece en el producto final (Kalisz, 1988).

La renina microbiana de *Mucor miehei* es producida conjuntamente con amilasa, celulasa, lipasa y esterasa, pero como la lipasa es fundamental en el metabolismo del microorganismo no puede ser evitada por el uso de un mutante defectivo, y las dos últimas enzimas deben ser removidas recién en el producto final por sus efectos indeseables. Por otra parte la renina de *Endothia parasitica* también producida en cultivo sumergido debe ser recuperada rápidamente, a baja temperatura y en ausencia de oxígeno debido a su inestabilidad (Kalisz, 1988).

Las enzimas son comercializadas en forma líquida o en granulados libres de polvo conteniendo entre 1 a 5 % de enzima activa.

2.5. Aplicaciones industriales

Numerosos procesos industriales involucran degradación de proteínas. Esto puede ser llevado a cabo por manipulación química y física, involucrando generalmente tratamientos con sustancias químicas agresivas, pHs y/o temperaturas extremas. De modo alternativo las proteasas pueden cumplir la misma función con las siguientes ventajas respecto de estos métodos (Löffler, 1986):

- Tienen especificidad de acción, previniendo potenciales reacciones colaterales.
- Son activas en condiciones suaves, evitando así pHs y temperaturas extremos y sus consecuencias.
- Tienen alta actividad catalítica, requiriendo menor energía de proceso.
- Son normalmente inactivadas después del uso por el proceso posterior, haciendo innecesaria su remoción.

Sin embargo también presentan algunas desventajas:

- Muchas proteasas no son suficientemente estables o activas en las condiciones de pH, temperatura y concentración de sustrato, presentes normalmente en sistemas de alimentos.
- Generalmente no son reusadas por la dificultad de separarlas de los sustratos y productos después de su utilización.
- No siempre se logra una distribución homogénea de la enzima en el sistema a actuar lo que puede llevar a su pérdida en una fase donde no es necesaria su actividad.

Tabla 2.3: Distribución del Mercado Mundial para enzimas

Aplicación	Mercado mundial (%)
Procesamiento de almidón, dextrinas, glucosa	4,9
Jarabe de alta fructosa	14
Cervecería	3,5
Procesamiento de frutas	2,9
Vinos	2
Harinas y panadería	5
Renina animal	4,5
Renina microbiana	6
Maduración de quesos y saborizantes	0,6
Confituras	0,3
Ensilado y alimento animal	2,3
Papel y textiles	1,1
Cueros	10
Detergentes, proteasas, lipasas y celulasas	42,9

Si bien se han propuesto tecnologías de inmovilización de proteasas que permitirían disminuir estas desventajas, su aplicación en la industria aún es dificultosa. Por otra parte el mejoramiento de propiedades de enzimas nativas como perfil de pH, estabilidad térmica, actividad catalítica, especificidad de sustrato y tipo de reacción es logrado a través de la ingeniería de proteínas. Avances en técnicas de DNA recombinante, mutagénesis de sitio dirigido, síntesis química de fragmentos de DNA, técnicas de análisis de la estructura protéica (que permiten la visualización de los aminoácidos que

deben ser alterados), la introducción de los cambios necesarios en el gen correspondiente y su clonado y expresión en un sistema vector-huésped adecuado, también permiten la “creación” de nuevas proteínas con propiedades mejoradas para aplicaciones comerciales (Kalisz, 1988).

A partir de una estimación realizada por Uhlig (1998) en la **Tabla 2.3** se muestra la distribución del total de ventas mundiales de enzimas calculado en U.S.\$700 millones en sus principales áreas de aplicación o formulaciones.

En una fracción mayoritaria del total de estas aplicaciones están involucradas distintos tipos de proteasas según se describe a continuación.

2.5.1. Detergentes

Dentro del mercado de enzimas para detergentes las proteasas ocupan una posición dominante, acaparando el 60 % de las ventas de enzimas para detergentes de lavandería y 50 % de las correspondientes a detergentes de vajilla (Hansen, 1997a).

De acuerdo a las características generales de los detergentes, la enzima ideal para estos debe ser estable a pHs 9-10,5, tener buena estabilidad ante la temperatura, ser compatible con agentes oxidantes, quelantes y surfactantes, y ser efectiva para la remoción de manchas a una baja concentración (0,4-0,8 %) en la solución de detergente (Kalisz, 1988). Las proteasas alcalinas de *Bacillus* cumplen con estos requerimientos mientras que la gran mayoría del resto no lo hacen.

En el lavado el alto pH y temperatura, la acción de los surfactantes y los agentes secuestrantes disuelven o dispersan la mayor parte de la suciedad, y los agentes blanqueantes descomponen las manchas no disueltas. Este proceso causa sin embargo la coagulación de la proteína sobre la tela, reteniendo a su vez tierra, lípidos y carbohidratos. Por lo tanto la función de las proteasas es hidrolizar de las telas las manchas protéicas de césped, sangre, huevo, leche, carne, pescado, secreciones del cuerpo y partículas de la piel, y de la vajilla las capas protéicas como huevo o salsas de carne, formando así péptidos que se disuelven en el líquido del lavado.

Los requerimientos del mercado ha llevado a la búsqueda de nuevas proteasas o la modificación de las existentes por ingeniería genética y de proteínas de modo que sean

estables y eficientemente activas ante las altas temperaturas (60-70°C) y pHs (hasta 12) que se usan en los lavaderos industriales e institucionales, y los blanqueadores (percarbonato y perborato) que se suelen adicionar fundamentalmente en Europa a los detergentes de lavandería y vajilla.

Sin embargo existe en la actualidad una tendencia hacia el lavado a temperaturas inferiores por ahorro de energía y por el mayor uso de fibras sintéticas que no pueden someterse a altas temperaturas. Así en Europa la ropa es lavada mayoritariamente en máquinas a 40°C, mientras que en Japón, resto de Asia, Australia, Africa y parte de Latinoamérica el lavado es en frío. Para compensar la menor eficiencia del lavado a estas temperaturas se debió incrementar principalmente la adición de proteasas a los detergentes (conjuntamente con amilasas, lipasas y celulasas) y además desarrollar nuevas proteasas con alta actividad entre 10-20°C (Hansen, 1997b y 1998a).

2.5.2. Cueros

Si bien la industria del cuero se basa en lo artesanal y tradicional, la competencia creciente en calidad y productividad y por otra parte las presiones existentes principalmente en Occidente sobre la preservación del medio ambiente, la han llevado a incrementar la utilización de enzimas.

El procesamiento en la curtiembre involucra los siguientes pasos (Kalisz, 1988; Hansen, 1997c y 1998b y c):

- Remojo: Las pieles son saladas y secadas para evitar su degradación por microorganismos. Luego son rehidratadas en un proceso que es favorecido por el uso de proteasas alcalinas de *Bacillus* (pH 8-9) que degradan proteínas no colágenas lo que mejora la absorción de agua reduciendo el tiempo de remojo y facilitando la remoción de polvo.
- Depilado y deslanado: El modo convencional para remover el pelo y abrir la fibra es generando condiciones alcalinas extremas (pH 12-13) en un proceso de “quemado”, con cal y sulfuro de sodio, proceso simple y barato pero que genera acumulación de sulfhídrico en los efluentes y un problema de tratamiento de los mismos. La adición de enzimas alcalinas de *Bacillus* reduce la utilización de estos compuestos hasta en un 50%

previniendo la polución del agua, disminuye el tiempo de proceso, destruye pigmentos indeseables, y logra una superficie más limpia y suave.

- Suavizado y desgrasado: En esta etapa se degradan parcialmente las fibras protéicas, volviendo la piel suave, elástica y capacitándola a recibir el teñido con un grano aceptable. Se puede realizar en dos fases, una alcalina (pH 7-13) y otra ácida (pH 2,5-7). Para esto se utilizan conjuntamente lipasas y proteasas de *Aspergillus*, *Bacillus* y *Rhizomucor* activas en el rango de pH correspondiente. Ambas actúan de modo sinérgico, las proteasas aumentando la flexibilidad y las lipasas desgrasando la piel, reduciendo así el uso de solventes o surfactantes que deterioran el ambiente. Así se logra uniformar la calidad del cuero, volviéndolo suave, liso, con un grano bien definido que mejora la tinción, da apariencia límpida y mejorando también la producción de cueros impermeables.

2.5.3. Alimentos y Bebidas

Alimentos tradicionales orientales

Las proteasas fúngicas han sido utilizadas por centurias en Oriente para la preparación de salsa de soja y otros productos derivados de soja, trigo o arroz.

Para la obtención de salsa de soja (*shoyu*) los porotos de soja (o copos desgrasados de soja) humedecidos y autoclavados son mezclados con trigo tostado e inoculados con cepas de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus sojae* que por fermentación por 2-3 días a 30°C y 40% H₀ formarán el koji al que se agrega la salmuera (17-23% NaCl). Esta mezcla llamada *moromi* es incubada hasta 10 meses con levaduras y lactobacilli para ser hidrolizada por las enzimas microbianas. Luego es filtrada a presión dando la salsa cruda que es pasteurizada y envasada. Las proteasas secretadas por las cepas de *Aspergillus* juegan un importante rol en la calidad y sabor de la salsa, siendo éste dependiente del ácido glutámico formado. Las enzimas proteolíticas liberan del sustrato glutamina que es convertida por una glutaminasa del hongo a ácido glutámico. Por lo tanto cepas con alta actividad de ambas enzimas son seleccionadas para el proceso (Ueki, 1994a y b).

También para la formación del cuajo en la elaboración del queso de soja (*tofu*) y la crema derivada de éste (*sufu*) se usan proteasas vegetales (bromelaína) o se inocula con bacterias u hongos (*Actinomucor elgans*) secretores de este tipo de enzimas (Kalisz, 1988).

El vino de arroz rojo (*sake*) es un producto económico de la fermentación alcohólica de arroz rojo aromático crudo. Este es partido, humedecido, adicionado con un agente sacarificante (glucoamilasa fúngica, o koji de arroz fermentado con *Aspergillus kawachii*), inoculado con levaduras para ser fermentado a 30°C y finalmente filtrado para la recuperación del vino (Teramoto, 1994a). La naturaleza de los componentes de la masa fermentada está íntimamente relacionada con las características del *sake* resultante, por lo que hidrólisis de proteínas, sacarificación del almidón y las condiciones de fermentación están interrelacionadas. De acuerdo con esto la adición de proteasa ácida de *Aspergillus niger* a la fermentación mejora la calidad del vino, aumenta la tasa de fermentación (por un efecto sinérgico con las otras enzimas hidrolíticas), refuerza los componentes aromáticos (liberando aminoácidos), y mejora su sabor y calidad organoléptica (Teramoto, 1994b; Ueda, 1995).

Productos lácteos

El principal uso de enzimas en la industria láctea se encuentra en la coagulación de la leche para hacer queso (Brown, 1993).

Existen alrededor de 400 variedades de quesos dependientes del tipo de leche usada (de vaca, oveja, cabra, o búfalo), la preparación del cuajo, y la presencia de ciertos microorganismos (Kalisz, 1988).

La leche usada en la fabricación de quesos contiene microorganismos y enzimas microbianas (proteasas y lipasas) que sobreviven al proceso de pasteurización. A pesar de esto se agregan bacterias lácticas (streptococci, leuconostocs, lactobacilli) que convierten la lactosa a ácido láctico asistiendo en la formación y saborización del cuajo. Para la formación del cuajo se adiciona rennet que es un extracto acuoso del estómago de terneros lactantes que contiene el mayor agente coagulante: la proteasa renina o quimosina y en menor proporción pepsina con mayor actividad hidrolítica. También quimosina bovina recombinante clonada en *Escherichia coli* o en *Saccharomyces cerevisiae* o bien reninas de origen microbiano provenientes de *Mucor miehei*, *Mucor*

pusillus var. *Lindt* y *Endothia parasitica* son utilizadas con resultados semejantes. Estas enzimas clivan la κ -caseína que estabiliza las micelas de caseína, dejando así una fracción insoluble, la paracaseína. El cuajo así formado es cortado, salado y madurado (Brown, 1993).

Durante la maduración en cámaras a 2-16°C, los microorganismos y enzimas en el cuajo hidrolizan lípidos, proteínas y otros compuestos, modificando la matriz protéica y las propiedades reológicas del queso y liberando aminoácidos que intervienen en la formación del aroma y sabor característico. Además de las proteasas ya mencionadas en este proceso pueden participar también las secretadas por hongos inoculados como *Penicillium* (exopeptidasas, metalo y aspártico proteasas) o bien adicionadas en formulaciones o encapsuladas para acelerar la maduración (Carretero, 1994; Chrzanowska, 1995).

Las reninas también son adicionadas a mezclas de helados para aumentar su viscosidad, eliminar la necesidad de estabilizante y mejorar su fusión. Asimismo pequeñas cantidades de pepsina son utilizadas para incrementar la viscosidad de la leche evaporada (Brown, 1993).

Durante más de 50 años las proteasas han sido usadas para producir fórmulas de leche infantil a partir de leche de vaca, ya que las proteínas no degradadas de la misma pueden inducir sensibilización en los niños al alimentarse. De este modo a mayor porcentaje de proteína degradada menor es el riesgo de inducir reacciones alérgicas y se incrementa al mismo tiempo el valor nutricional de la leche infantil (Novo Nordisk, 1999c).

Panificación

La harina de trigo es la materia prima fundamental en los procesos de panadería. Si bien su mayor constituyente es el almidón, las proteínas de la harina son las que determinan las propiedades de la masa ya que forman una red con puentes disulfuro: el gluten. De la fuerza del gluten dependerán los tiempos de mezclado de la masa y características del pan como volumen, simetría, textura y compresibilidad, debiendo ser todos optimizados dada la automatización actual de los procesos.

Dados los niveles poco efectivos de enzimas naturales en la harina, amilasas y proteasas exógenas son adicionadas a la misma para mejorar la producción. Así proteasas de *Aspergillus oryzae* (preferentemente neutras) con actividad específica y limitada, son

aplicadas a la manufactura del pan u otro productos horneados pues hidroliza enlaces peptídicos facilitando el realineamiento de las moléculas en la dirección del flujo lo que conduce a tiempos menores de mezclado (menor consumo de energía), mejora la elasticidad y textura del gluten y las propiedades de manipuleo. Este debilitamiento parcial de la masa, permite mayor expansión del gas producido por la levadura, obteniéndose panes con mayor volumen y buena estructura de miga. Aproximadamente dos tercios del pan blanco en USA es producido con adición de proteasas fúngicas (Sproessler, 1993).

También proteasas bacterianas y papaína son agregadas en la producción de galletitas tipo cracker, las que hidrolizan la estructura del gluten, de modo que la masa pierda sus propiedades elásticas (no se retraiga), sea fácil de amasar y guarde su forma aún en el horneado (Sproessler, 1993).

Bebidas alcohólicas

La elaboración de cerveza comienza en la preparación del mosto, una mezcla de granos (principalmente malta) y agua caliente. La malta actúa como fuente de enzimas para la degradación del almidón y proteínas en azúcares simples, péptidos y aminoácidos a ser utilizados por las levaduras para producir alcohol, CO₂, y saborizantes. En el mosto se desarrolla entonces inicialmente una fase proteolítica (40-50°C) con endo y exopeptidasas y seguidamente una fase sacarificante (60-70°C) con amilasas (Power, 1993).

Sin embargo el malteado de granos es un método relativamente caro para obtener enzimas, por lo que la malta puede ser parcialmente reemplazada por otros cereales sin maltear como cebada, maíz, arroz, o sorgo y la adición de enzimas industriales. De este modo para proveer a las levaduras del nitrógeno soluble necesario se agregan proteasas neutras de *Bacillus subtilis* y amilasas de *Bacillus*, *Aspergillus* y *Rhizopus* con mayor termoestabilidad que las de la malta para la sacarificación. En países africanos la cerveza es elaborada completamente sin malta a base de cebada, en este caso el contenido de proteínas del mosto es muy alto lo que lentifica la filtración hecho que también es solucionado con la adición de proteasas juntamente con β -glucanasas para degradación de β -glucanos y pentosanos que aumentan la viscosidad (Jones, 1994; Hansen, 1997a; Novo Nordisk, 1999b).

A pesar de que la cerveza es filtrada en frío hasta su clarificación, una vez envasada distribuida y refrigerada nuevamente por el consumidor puede generar cierta turbidez por formación de complejos entre péptidos y polifenoles. Este efecto es indeseable dada su semejanza visual con el crecimiento microbiano por lo que distintas proteasas han sido utilizadas tradicionalmente para evitarlo como bromelaína, pepsina y papaína y también algunos sustitutos microbianos de *Aspergillus* o *Streptomyces* (Power, 1993).

En la producción de cerveza bajas calorías la adición de glucoamilasa es acompañada por la presencia de proteasa ácida de *Aspergillus niger*. La actividad de esta proteasa es beneficiosa cuando se utilizan cepas de levadura que forman flóculos y tienden a depositarse en el fondo del fermentador, ya que rompe las adherencias entre las células y permite que las levaduras no decanten tan rápidamente y completen totalmente la fermentación. Sin embargo esta enzima debe ser adicionada cuidadosamente ya que en exceso puede producir una pobre formación de espuma en el producto final por degradación de las proteínas que la constituyen (Power, 1993).

En la elaboración de vinos, también cierta turbidez por precipitación de proteínas de la uva puede producirse luego del envasado. Para evitar esto se utiliza bentonita como agente adsorbente de dichas proteínas, pero su acción no es muy selectiva y también remueve del vino compuestos deseables lo que afecta su calidad organoléptica, por lo que se propone como tecnología de reemplazo la utilización de proteasas microbianas (Villettaz, 1993).

Hidrólisis de proteínas

Las proteasas juegan un importante rol en la tiernización de carnes. Esta es llevada a cabo por proteasas endógenas (catepsina lisosomal y metaloproteasas) y exógenas como papaína, ficina, bromelaína, o proteasas fúngicas de *Aspergillus* que sean activas a pH ácido (4-5), baja temperatura, e inactivadas a 50°C. La tiernización se logra por inmersión en una solución de la enzima o por su dispersión en polvo sobre la carne y en general se vuelve efectiva durante la cocción (Kalisz, 1988).

Restos de huesos, carne, y vísceras, pueden ser molidos, sometidos a la acción de proteasas microbianas para lograr hidrolizados solubles o saborizantes de carne. Las mezclas de endo y exoproteasas logran menor olor en el proceso, mayor grado de hidrólisis y mejor sabor por la liberación de aminoácidos. Los hidrolizados resultantes

pueden ser incorporados en productos cárnicos enlatados, sopas y alimentos para mascotas (Hansen, 1998d).

También a partir de células rojas de la sangre hidrolizadas y decoloradas por acción de estas proteasas y con la incorporación posterior del plasma que tiene excelentes propiedades de emulsificación, se logra un producto que puede ser incorporado también a salsas o pasteles de carne (Kalisz, 1988).

Hidrolizados de gelatina producidos por proteólisis son incorporados como suplemento nutricional para gente que necesita dosis extra de proteína. La ventaja de la gelatina por sobre otros hidrolizados (de caseína, soja, trigo o carne), es que rara vez desarrolla sabor amargo al incrementarse el grado de hidrólisis (Novo Nordisk, 1999c).

Proteasas neutras y alcalinas de *Bacillus* son utilizadas para solubilizar concentrados de proteína de pescado de alto valor nutritivo pero insolubles en agua por el método de extracción con solventes usado. También por la acción de estas enzimas sobre la carne de pescado se logran hidrolizados con buenas propiedades de emulsificación, dispersión de agua, y organolépticas, que pueden incorporarse a filetes de pescado sin disminuir su calidad (Kalisz, 1988).

Nuevos ingredientes - Modificación de propiedades funcionales

Las fuentes no convencionales de proteína pueden ser modificadas por hidrólisis protéica parcial para mejorar sus propiedades funcionales con respecto a su uso particular en un sistema de alimentos, teniendo como meta la calidad de nuevos productos.

Las proteínas de soja son unas de las más utilizadas como ingredientes funcionales, son relativamente baratas, generalmente disponibles y sus hidrolizados fueron introducidos durante la Segunda Guerra Mundial como remplazo de la clara de huevo en la industria confitera (Adler-Nissen, 1993).

La obtención del hidrolizado de proteína de soja es un proceso controlado en el que el sustrato es preparado por un lavado ácido, alcalinizado e hidrolizado hasta un grado definido por proteasas alcalinas de *Bacillus*; luego la enzima es inactivada con ácido, separados los componentes por centrifugación, pasaje por carbón activado y ultrafiltrado por membrana. Así se obtiene un hidrolizado 100% soluble (aún en el pl de las proteínas de soja), con un equilibrio entre el máximo grado de hidrólisis y la mínima existencia de

péptidos amargos, que puede actuar como agente emulsificante y viscosante al ser agregado a bebidas de bajas calorías. Puede ser también utilizado en alimentos dietéticos especiales con patrones de alimentación afectados y como reemplazo de lácteos (Kalisz, 1988; Adler-Nissen, 1993).

3. *Aspergillus*: dominio actual y perspectivas futuras

Desde el inicio de la explotación industrial de enzimas microbianas en el mundo occidental hace 100 años con la patente de Takamine sobre la producción de α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, el género *Aspergillus* ha mantenido una posición dominante en este ámbito.

Como muestra la **Tabla 3.1** *Aspergillus* es la mayor fuente de enzimas para la producción de alimentos y bebidas, siendo utilizadas en aplicaciones como procesamiento de almidón, elaboración de queso, clarificación de jugos, cervecería, acondicionamiento de masa, modificación de vinos, preservación de alimentos y producción de té instantáneo. Sin embargo hay áreas en las que naturalmente no es favorecido como productor, como enzimas con requerimientos para pHs alcalinos (detergentes), o temperaturas superiores a 60°C (licuefacción de almidón), enzimas celulolíticas u oxidorreductasas activas sobre lignina para las que *Trichoderma* y los basidiomicetes son respectivamente líderes (Oxenboll, 1994).

Varios atributos hacen al género *Aspergillus* y en especial a las especies *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* destacables dentro de la inmensa biodiversidad microbiológica (Oxenboll, 1994):

- Abarca los principales agentes de descomposición y decaimiento, poseyendo así la capacidad de producir un amplio rango de enzimas que teniendo en cuenta las múltiples posibles uniones a un sustrato, su naturaleza heterogénea y su gran variabilidad se estiman en alrededor de 100 tipos diferentes.
- El manipuleo de sus cultivos dentro de un ámbito industrial es sencillo. Los cultivos de *Aspergillus* crecen rápidamente sobre sustratos baratos y secretan sus enzimas al medio lo que facilita su recuperación. Asimismo la abundancia de conidios facilita la preservación y funcionamiento de las cepas, lo que también indica que frecuentemente las mismas son aisladas de muestras del medio ambiente.
- Tanto *Aspergillus oryzae* como *Aspergillus niger* han sido utilizados por largo tiempo, y generalmente sus enzimas han sido aceptadas por la FDA (Food and Drug Administration) siendo reconocidas como seguras (GRAS).

Tabla 3.1: Principales aplicaciones industriales de enzimas microbianas y los géneros que las producen.

Aplicación	Enzima	Fuente
Detergentes	Proteasa Amilasa Lipasa Celulasa	<i>Bacillus</i> <i>Bacillus</i> <i>Humicola, Pseudomonas</i> <i>Bacillus, Humicola</i>
Industria de almidón	Amilasa Glucoamilasa Glucosa isomerasa	<i>Bacillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Bacillus, Streptomyces</i>
Lácteos	Proteasa Lipasa Lactasa Sulfhidrilooxidasa	<i>Rhizomucor</i> <i>Aspergillus</i> <i>Klyveromices, Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i>
Vino y jugos	Pectinasa Celulasa Celobiasa Glucosa oxidasa Polifenol oxidasa	<i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus, Trichoderma</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Trametes</i>
Industria de destilación	Amilasa Glucoamilasa	<i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i>
Cervecería	β -glucanasa Acetolactatodecarboxilasa	<i>Aspergillus, Bacillus</i> <i>Bacillus</i>
Panadería	Amilasa Proteasa Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus, Bacillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i>
Textiles	Amilasa Celulasa Catalasa	<i>Bacillus</i> <i>Trichoderma, Humicola</i> <i>Aspergillus</i>
Alimento animal	Fitasa Celulasa Enzima degradante de pared celular vegetal	<i>Aspergillus</i> <i>Trichoderma, Humicola, Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i>
Papel y pulpa	Xilanasa	<i>Trichoderma, Bacillus</i>
Cueros	Proteasa	<i>Aspergillus</i>
Té	Tanasa	<i>Aspergillus</i>

En el año 1992 se patentaron más de treinta aplicaciones para enzimas de *Aspergillus* y más de diez procesos que lo involucran como microorganismo, lo que señala que aún es una fuente no agotada tanto para la tecnología enzimática que domina actualmente la explotación biotecnológica de microorganismos como para nuevos procesos aplicando microorganismos, como conversiones bioquímicas o la obtención de productos alimenticios fermentados (Oxenboll, 1994).

El desarrollo en tecnología de alimentos y la solución de problemas ambientales requieren nuevas soluciones tecnológicas y la tecnología enzimática es una alternativa que aún puede expandirse en áreas más químicamente orientadas por tradición.

Si bien el avance de la ingeniería genética que permite elegir el huésped y el sistema de producción de un metabolito, y la ingeniería de proteínas que permite modificar determinadas cualidades del mismo, parecen no poner ya la limitante de encontrar un microorganismo de fácil manejo en una escala productiva, sigue teniendo importancia la búsqueda al azar de microorganismos y de actividades enzimáticas. De este modo enzimas actualmente muy utilizadas en la industria como la amilasa Termamil capaz de soportar 100°C fue descubierta por exploración al azar en la misma cepa productora de Alcalasa, una proteasa alcalina de múltiple aplicación; y la enzima glucano 1,4- α -maltohidrolasa (Novamyl) responsable del efecto antiendurecimiento del pan también fue encontrada por screening y olvidada durante años hasta que fue caracterizada como óptima para esta nueva aplicación (Hansen, 1995).

Por lo tanto considerando el escaso número de especies actualmente utilizadas, y lo poco que se conoce aún de la ecología, hábitat y capacidades de múltiples especies y cepas dentro del mismo género *Aspergillus* se puede decir que aún su potencial como fuente de enzimas no ha sido totalmente explotado y que queda mucho por explorar.

Objetivos

Como ha sido ampliamente descrito las proteasas abarcan una fracción mayoritaria del mercado de enzimas y son utilizadas de un modo creciente en procesos industriales que involucran degradación y modificación de proteínas. Existe entonces una necesidad permanente de búsqueda de estas enzimas con propiedades nuevas y de desarrollo de sistemas de producción más eficientes para las mismas.

Si bien las ventajas de la automatización de los procesos ha llevado a que sean producidas principalmente por fermentación sumergida; la simpleza, economía y alta productividad posiciona a la FES como un sistema atractivo para la obtención de estas enzimas. Sin embargo existe escasa información acerca de los aspectos cinéticos involucrados en la producción de proteasas por FES y de las interrelaciones de las variables del proceso, lo que acrecienta el interés de su estudio.

Por lo tanto el objetivo general de esta Tesis es:

- Desarrollar procesos de Fermentación en Estado Sólido para la obtención de proteasas a partir de hongos considerados GRAS.

Siendo los objetivos particulares:

- Selección de una cepa adecuada.
- Optimizar la fermentación estudiando el efecto de las principales variables del proceso.
- Caracterizar cinéticamente el proceso.
- Caracterizar el extracto enzimático obtenido.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

1. Selección de cepas proteolíticas

1.1. Aislamiento de hongos:

Gran variedad de productos naturales, fueron usados para aislar hongos: frutas desecadas, semillas de oleaginosas, cereales, legumbres, hortalizas, tes, yerbas, especias, harinas, leche en polvo, tierra.

El medio de cultivo utilizado fue agar YGC esterilizado previamente en autoclave 15 minutos a 121°C. El aislamiento se realizó en placas de Petri. En un primer paso, las semillas u otros productos fueron sembrados en placas con agar YGC, e incubadas a 37°C durante un período de 4 a 7 días.

En esta etapa desarrollaron gran variedad y abundancia de hongos en cada placa, entre ellos los pertenecientes al género *Aspergillus*. De cada *Aspergillus* se hicieron dos repiques sucesivos en placas de agar YGC, incubando 72 horas a 37°C, con el objetivo de lograr el aislamiento y la purificación de cada cepa obtenida.

Las cepas aisladas fueron rotuladas con un número, y pasadas a tubos de agar inclinado de agar malta o papa-dextrosa, incubadas a 28°C de 4 a 7 días y luego guardadas en cámara fría hasta el momento de ser utilizadas como inóculo.

1.2. Screening primario:

Para chequear la capacidad productora de proteasas de las distintas cepas aisladas, las mismas fueron sembradas en placas de agar leche, cuya composición es la siguiente: peptona de carne 5 g/l, extracto de levadura 3 g/l, leche descremada en polvo Molico 1 g/l, agar 12 g/l. Cada placa fue inoculada en el centro con ansa recta y en forma puntual, con el fin de obtener una colonia de forma circular.

Las cepas proteolíticas producen, alrededor de la colonia, un halo de hidrólisis (transparente) que se distingue sobre el medio (turbio). El valor de la relación entre el diámetro del halo y el de la colonia (H/C) fue utilizado como criterio primario de selección (Sekine, 1969; Blazej, 1989). En los casos en que la colonia no fuera circular, se utilizó el promedio de los diámetros mayor y menor para el cálculo de la relación H/C. Las mediciones se realizaron con un calibre.

Las cepas *Aspergillus niger* NRRL 330 y 337 y *Aspergillus oryzae* NRRL 2160, reportadas como productoras de proteasas fueron utilizadas como control en la selección preliminar (Battaglino, 1991).

Las cepas fueron incubadas a 28°C y las lecturas realizadas a distintos tiempos.

1.3. Screening secundario:

Con el fin de testear el comportamiento de las cepas ante la variación de las condiciones ambientales en placa, se realizó lo siguiente:

1.3.1. Efecto de la temperatura:

Siembra de las cepas en la forma indicada previamente en placas de agar leche tal cual (TC). Incubación a 28°C y 37°C. Lectura a 72 y 96 horas.

1.3.2. Efecto de la glucosa:

Siembra en agar leche TC + glucosa en distintas concentraciones: 0; 0,2; 0,5;0,8; 1; 1,5;y 2 % P/V. Incubación a 28°C. Lectura a 72 y 96 horas.

1.3.3. Efecto de la actividad de agua:

Siembra en agar leche TC + NaCl en distintas concentraciones: 0, 3, 6, y 8 % P/P.

Incubación a 28°C. Lectura entre 72 y 166 horas.

Las concentraciones de NaCl necesarias para la reducción de la actividad de agua fueron calculadas de acuerdo a Chirife (1984) y los valores de A_w medidos en un equipo Novasina Thermoconstanter a 25°C.

El halo de hidrólisis era observable a simple vista excepto en los medios agar leche + 8 y 6 % de NaCl, donde la presencia de esa concentración de sal en el medio vuelve más transparente e indistinguible al halo de hidrólisis. Por lo tanto dichas placas fueron reveladas con una solución de coomassie-blue durante 30 minutos y lavadas luego con una mezcla de metanol-acético. El coomassie-blue se asocia más a las zonas donde no hubo hidrólisis, por lo tanto esto da el contraste necesario para distinguir el halo de hidrólisis.

La velocidad de crecimiento radial K_d (cm/h) fue calculada como la pendiente de la regresión lineal entre diámetro de colonia (cm) y tiempo (horas), durante la fase lineal de crecimiento. Para el cálculo de la fase lag, se extrapoló la recta obtenida a cero incremento en diámetro y el valor del punto de intersección sobre el eje tiempo fue definido como fase lag.

1.4. Identificación taxonómica de la cepa 91 aislada:

Se prepararon microcultivos del hongo en agar Czapeck-Dox, incubados en cámara húmeda a 26°C. La identificación se llevó a cabo por observación microscópica diaria de dichos microcultivos, durante un mes a partir de su inoculación, viéndose la evolución de las distintas estructuras. Las mismas fueron medidas utilizando un objetivo graduado micrométrico (40x) y a partir de un amplio muestreo ($n = 25-60$).

También se realizaron preparados entre porta y cubre en solución de lactofenol del material fungal extraído de estrías de 7 días en agar papa y se observaron al microscopio.

Por otro lado se siguió el crecimiento de colonias de la cepa en placas de agar Czapeck-Dox y agar malta, por inoculación en un punto central de 10^5 esporas en 0,005 ml de una solución estéril de Tween 80 0,01%, e incubación a 26°C.

2. Fermentación en Estado Sólido

2.1. Sistema de fermentación:

Se usaron 10 g de sustrato sólido inicial (SS_0) en erlenmeyers de 500 ml cubiertos con tapones de algodón.

El medio fue humedecido con agua destilada, según el contenido de agua inicial deseado, homogeneizado y luego esterilizado por 20 minutos a 121°C, enfriado e inoculado. El tamaño del inóculo fue en todos los casos de 10^7 esporas / 10 g SS_0 .

Los erlenmeyers fueron incubados estacionariamente a las temperaturas requeridas por cada experiencia y durante distintos tiempos.

Cada tiempo de fermentación fue realizado por cuadruplicado para poder determinar por duplicado, la variación del pH y la actividad proteásica en dos de ellos y en los otros dos todas las variables estimadas sobre el koji seco.

2.2. Inóculo y preservación de las cepas:

Las conidiosporas de *Aspergillus* fueron cosechadas de estrías de agar papa-dextrosa o de agar Sabouraud, luego de 5 días de incubación a 28°C, por suspensión en agua estéril + 0,01 % de Tween 80. El recuento de las mismas fue realizado en cámara de Neubauer.

Las cepas fueron mantenidas habitualmente en dichas estrías a 4°C. Sin embargo, para evitar continuos repiques en estrías de agar (lo que podría inducir variabilidad en la cepa), y para su preservación por largo tiempo las cepas fueron conservadas en tubos de tierra estéril, de los que eran recuperadas cada tanto.

Con esta finalidad tubos de hemólisis parcialmente llenos con una mezcla seca, tamizada de tierra y arena y cubiertos con tapones de algodón, fueron esterilizados durante dos días a 121°C por 30 minutos. Los conidios fueron recuperados con la adición de 2 ml de Tween 80 0,01% a estrías de cada hongo de 7 días de incubación a 28°C y 1 ml de esta suspensión fue utilizado para inocular la tierra estéril. Finalmente estos tubos se secaron durante un mes a 37°C y se conservaron en cámara fría hasta su utilización.

2.3. Sustrato:

Se utilizaron los siguientes sustratos agroindustriales: soja partida, afrechillo de arroz, salvado de trigo (molido grueso), arveja partida, avena, cebada, arroz integral, soja : salvado de trigo (7:3), soja : afrechillo de arroz (7:3), cascarilla de arroz, maíz partido. Los mismos fueron almacenados en freezer a -20°C.

Para los estudios granulométricos realizados sobre el sustrato soja:afrechillo de arroz, el poroto entero de soja fue molido y pasado por tamices de distinta malla (3,35 , 2,36 y 1,18 mm), previo a la preparación del medio.

2.4. Contenido de agua (H%):

Se estimó el contenido de agua como la pérdida de peso de la masa total de la fermentación luego de congelarse cada erlenmeyer con aire líquido y de su deshidratación por liofilización durante 26 horas hasta constancia de peso.

2.5. Peso húmedo y peso seco :

La variación de peso húmedo fue calculada como la diferencia entre el peso del sistema inicial de fermentación luego de su esterilización y el peso del sustrato fermentado correspondiente.

El peso seco en estos casos fue determinado gravimétricamente luego del congelado y liofilizado de los sistemas como fue descrito previamente, siendo entonces considerada por diferencia de peso entre ambos la variación de peso seco de la fermentación.

2.6. Actividad de agua (A_w):

Aproximadamente 2 g del sustrato inicial luego de su esterilización o del sustrato ya fermentado fueron usados para determinar A_w en un equipo Novasina Thermoconstanter a 25°C, calibrado adecuadamente en el rango de medición.

2.7. Isoterma de sorción del sustrato soja:afrechillo de arroz:

Se adicionaron diferentes volúmenes de agua destilada al sustrato logrando humedades entre 26-48% en base húmeda, lo que corresponde a 35-90% en base seca. Los valores de humedad y A_w de cada punto de la isoterma se determinaron como fue descrito previamente.

2.8. pH inicial del sustrato y seguimiento del pH durante la fermentación:

Tanto el sustrato inicial luego de su esterilización como el koji total correspondiente a cada tiempo de fermentación fue extraído por agitación, durante 30 minutos con 100 ml de NaCl 1% P/V.

El pH fue medido en esta suspensión con un pHmetro digital Orion Benchtop pH/ISE Meter 920A (Raimbault, 1980).

Salvo que se indique lo contrario el pH inicial de la fermentación fue el pH del sustrato tal cual $\cong 6$. La disminución del mismo en determinadas experiencias fue lograda por adición de HCl 1N al sustrato.

2.9. Obtención del extracto crudo de fermentación:

De la suspensión con 1% NaCl recién descrita se eliminaron los sólidos por filtración y los conidios por centrifugación en una centrífuga Sorvall SS-4 a 10000 rpm (12100 g) por 10 minutos. El extracto así obtenido fue conservado a -20°C hasta su utilización para la determinación directa de actividades enzimáticas y metabolitos o como base para distintos procesamiento.

2.10. Adición de diferentes metabolitos al sustrato inicial:

2.10.1. Fuentes de carbono:

El sustrato sólido fue humedecido sólo con 2,8 ml de agua destilada previo a la esterilización. Luego de la misma se agregaron soluciones de distintos hidratos de carbono esterilizadas por filtración por filtro Millipore 0,22 μm , de modo tal de lograr una concentración de los mismos en el medio de fermentación de 1% P/P respecto de la masa sólida de fermentación, (0,1 g hidrato adicionado/10 g SS_0). Los hidratos de carbono utilizados fueron: maltosa, lactosa, sacarosa, glucosa y ácido cítrico.

2.10.2. Fuentes de nitrógeno:

El medio de fermentación fue humedecido con 5,3 ml de una solución de sal inorgánica o fuente orgánica de nitrógeno, de modo tal de adicionar 0,2% P/P de contenido en nitrógeno respecto de masa de sustrato sólido de fermentación, (0,02 g nitrógeno adicionado/10 g SS_0). Se utilizaron: bicarbonato de amonio, cloruro de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de sodio, asparagina y glutamina.

2.10.3. Fuentes externas de proteína:

Las siguientes proteínas, o derivados, fueron agregados al sustrato de fermentación, y homogeneizados previo a la humidificación del mismo: proteína aislada de soja P760, caseína, gelatina, peptona de carne, clara de huevo liofilizada (albúmina). La concentración final fue de 2% P/P de proteína respecto de la masa de sustrato sólido de fermentación, (0,2 g proteína adicionada/10g SS₀).

En todas estas experiencias los erlenmeyers fueron incubados a 29°C y los resultados obtenidos a 72 y 96 horas fueron testeados contra un control sin aditivos, (TC: tal cual), determinándose la Actividad proteásica relativa respecto del mismo.

2.10.4. Cloruro de sodio:

El sustrato sólido fue humedecido con volúmenes adecuados de soluciones de concentración creciente de NaCl de modo de lograr sistemas de FES combinando 3 niveles de H₀: 37, 44 y 49 %, con 4 niveles de sal: 0; 0,047; 0,754 y 1,57 %.

Se incubó durante 162 horas a 29°C y pH₀ 6.

Cada sistema de FES se realizó por cuadruplicado para la determinación por duplicado de la actividad proteásica sobre los extractos y de la conidiación sobre el koji seco.

2.11. Estimación de biomasa fúngica:

2.11.1. Determinación de glucosamina:

El método tiene dos etapas:

1) Conversión de quitina a glucosamina por hidrólisis ácida:

Se usó el método de Tsuji (1969), modificado y puesto a punto. La puesta a punto incluyó variación de: tiempos de hidrólisis, concentración de la solución de HCl y condiciones de neutralización, hasta llegar a resultados repetitivos.

El protocolo final fue:

- 50 mg del sustrato fermentado seco y molido, fueron mezclados con 5 ml de HCl 6 N, en tubos cerrados, puestos durante 4 horas en baño a 100 °C y luego enfriados en agua corriente.

- 2 ml del hidrolizado, fueron neutralizados con la adición de 4,5 ml NaOH 3 N y 2 ml de buffer fosfato 0,5 M pH=7.

2) Ensayo de glucosamina:

Se utilizó el método de Swift (1973), modificado:

- 0,25 ml del neutralizado (diluídos al medio con agua destilada, 0,5 ml finales), se mezclaron con 0,5 ml del reactivo de acetil acetona, en tubos tapados, colocados en baño a 100 °C por 20 minutos y luego enfriados a T ambiente.

- Luego se agregaron 3 ml de etanol y 0,5 ml del reactivo de Ehrlick.

- Se incubó a 65 °C por 10 minutos y se midió DO a 530 nm contra un blanco de reactivos.

Cada determinación fue acompañada por una curva de calibración de glucosamina en un rango de 0-80 µg, con un alto coeficiente de correlación (R=0,99).

Reactivos:

- de Acetilacetona: 1 ml acetilacetona + 50 ml de Na₂CO₃ 0,5 N.

- de Ehrlick: 2,67 g de N-N-dimetil para aminobenzaldehído en 100 ml de una mezcla etanol:HCl (1:1).

2.11.2. Determinación del factor de conversión de glucosamina a biomasa:

Se realizaron cultivos en placa de Petri. El medio usado fue soja molida:afrechillo de arroz (7:3) 10%, agar 1,5%. Sobre cada placa se ubicó un filtro Millipore 0,45µm pesado y esterilizado ; éste fue inoculado en el centro con $1,2 \times 10^6$ conidios en 0,005 ml de una suspensión de Tween 80 0,01%. Las placas fueron incubadas a 37°C. A los tiempos correspondientes, el filtro fue lavado con agua destilada y secado en estufa a 56°C hasta peso constante por 45 horas, determinándose el valor de la masa seca fúngica (biomasa).

Para la determinación de glucosamina, 20 mg de la biomasa separada del filtro fueron sometidos al mismo método que las muestras de FES.

Para actividad proteásica los filtros sin secar fueron agitados en 10 ml NaCl 1% para extracción de la enzima la que fue determinada por el método modificado de Tsujita y Endo (1976).

La masa seca fúngica fue determinada por lo menos por triplicado, y glucosamina y actividad enzimática por duplicado.

2.12. Recuento de conidios:

200 mg del koji seco y molido de FES fueron agitados (por duplicado) por 30 minutos en 50 ml 1% Tween 80 estériles. El número de conidios se determinó por conteo de la dilución adecuada en cámara de Neubauer (por duplicado). Se calcularon los conidios totales refiriéndolos a los valores de masa seca total.

2.13. Fermentación en medio líquido:

Para la preparación del medio, 50 g de soja molida:afrechillo de arroz (7:3) en 500 ml de agua destilada, fueron autoclavados a 110°C durante 5 minutos. La mezcla resultante fue homogeneizada en caliente con agitador magnético, filtrada por gasa y finalmente centrifugada a 10000 rpm (12100g) por 10 minutos para la precipitación de partículas sólidas. El sobrenadante lechoso resultante fue ajustado a pH 6 con NaOH 1N y utilizado como medio de cultivo siendo fraccionado cada 100 ml en erlenmeyers de 250 ml.

El tamaño de inóculo utilizado fue de 10^7 conidios/100 ml de medio. Los erlenmeyers fueron incubados a 29°C, tanto en forma estática como en agitador rotatorio, durante 164 horas.

3. Determinación de actividades enzimáticas

3.1. Proteasa ácida:

Fueron utilizados dos métodos:

3.1.1. Método de Tsujita y Endo (1976) modificado:

La mezcla de reacción (2,52 ml) contiene la enzima (0,42 ml) y 2,1 ml de solución de caseína 0,8 % P/V en buffer Mc Ilvaine ácido cítrico/fosfato (26,5 mM ác.cítr./13,7 mM Na_2HPO_4), pH=3. La incubación se realizó a 37°C por 10 minutos y la reacción fue terminada por la adición de 2,52 ml de TCA (ác.tricloroacético) 10 % P/V.

Los tubos se dejan 20 minutos a 37°C y luego se centrifugan a 10000 rpm (12350 g) por 10 minutos. La tirosina que se encuentra en fase soluble es determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm.

Una unidad de actividad proteolítica fue definida como la cantidad de enzima que, actuando sobre la caseína, libera 1 µg tirosina/minuto bajo condiciones estándar.

Se calculó la actividad proteásica con la siguiente ecuación:

$$UP/ml = (DO\ 280 \times Fd \times Vr) / (Vp \times t_r \times \alpha)$$

$$UP/gSS_0 = (UP/ml) \times Ve / SS_0$$

Siendo:

-DO 280: densidad óptica a 280 nm.

-Fd: factor de dilución del extracto enzimático.

-Vr: volumen de la mezcla de reacción final (5,02 ml)

-Vp: volumen del extracto en que está contenida la enzima (0,42 ml).

-t_r: tiempo de reacción (10 minutos).

-α: pendiente de la curva de calibración de tyr, absorbancia correspondiente a 1µg tyr (0,0072).

-UP/ml: unidad de actividad enzimática por ml de extracto.

-Ve: volumen total del extracto de fermentación.

-SS₀: masa de sustrato sólido inicial en la fermentación (10 g).

-UP/gSS₀: unidad de act.enzimática por gramo de sustrato sólido inicial.

3.1.2. Método de Anson (1938) modificado:

La mezcla de reacción contiene: 2 ml de hemoglobina desnaturalizada por ácido, en buffer acetato pH=3 y 0,4 ml de la enzima (Vp) en buffer acetato 0,05 M pH=3. Incubación: 30 minutos (t_r) a 40°C, y la reacción es terminada por adición de 2 ml TCA 14% (Vr: 4,4 ml), dejando los tubos a temperatura ambiente por 30-60 minutos con agitación cada tanto. Luego el precipitado es removido por centrifugación 10 minutos a 10000 rpm (12350 g) y se mide la tyr soluble en el sobrenadante por su Absorbancia a 275 nm.

Unidad: Un AHUT (acid hemoglobin units on tyrosine basis), es la cantidad de enzima que produce en un minuto bajo condiciones específicas, un hidrolizado cuya absorbancia a 275 nm es la misma que la de una solución conteniendo 1,10 µg/ml de tyr en 0,006 N HCl (α).

La actividad proteásica se calculó como:

$$\text{AHUT/ml} = (\text{DO 275} \times \text{Fd} \times 4,4) / (0,4 \times 30 \times 0,0083)$$

La curva de calibración de tirosina fue realizada en un rango de 0-100 µg de tyr en 0,006 N HCl.

Todas las reacciones se hicieron por duplicado y con los blancos correspondientes.

3.2. Glucoamilasa:

La actividad glucoamilolítica se determinó incubando 10 µl del extracto enzimático con 0,5 ml de la solución de sustrato (almidón soluble 1%, 5mM EDTA en 20 mM buffer acetato pH 5), durante 30 minutos a 55°C. La reacción fue detenida colocando las muestras en un baño a 100°C durante 5 minutos. Se midió la glucosa resultante de la acción de la enzima en alícuotas del tubo de reacción mediante el método enzimático de glucosa oxidasa/peroxidasa (Bergmeyer y Grassl, 1983). Un blanco correspondiente a la glucosa presente en el extracto enzimático se determinó en muestras de extracto previamente inactivadas a 100°C.

Una unidad de actividad enzimática (UI: unidades internacionales) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µM de glucosa por minuto en las condiciones de reacción señaladas.

4. Determinación de otros metabolitos en el extracto de fermentación

4.1. Proteínas:

Las proteínas del extracto de fermentación fueron determinadas por el método de Bradford (1976). Se realizó una curva de calibración con seroalbúmina bovina en un rango de 0-25 µg de proteína.

4.2. Azúcares reductores:

Se aplicó el método de Nelson (1944), empleando una curva de calibración de glucosa en un rango de 0-50 µg.

4.3. Glucosa:

Se utilizó un kit del Laboratorio Wiener Lab Argentina, basado en el ensayo enzimático de glucosa oxidasa/peroxidasa (Bergmeyer, 1983). Para la cuantificación del azúcar se empleó una curva de calibración de glucosa entre 0 y 45 µg.

5. Caracterización y purificación parcial del extracto proteolítico

5.1. Caracterización del extracto crudo por la variación de su actividad:

Se caracterizaron extractos crudos provenientes de 72 y 96 horas de fermentación.

5.1.1. Actividad a distintas temperaturas:

Se modificó la temperatura de la reacción de determinación de actividad proteásica según correspondiera en un rango de 20 a 80°C ($\Delta=10^\circ$).

5.1.2. Actividad residual a diferentes temperaturas:

0,6 ml del extracto crudo fueron incubados durante distintos tiempos (5 a 120 minutos) a diferentes temperaturas (de 30 a 70°C) y luego congelados en freezer hasta la determinación de actividad realizada según método ya descripto.

$\% \text{ Actividad Residual} = (\text{AHUT medida} / \text{AHUT crudo sin incubación}) \times 100$

5.1.3. Actividad a distintos pH:

se modificó el pH del sustrato de reacción de 2 a 6 ($\Delta=0,5$). Diluciones de la enzima se hicieron en agua destilada.

5.1.4. Actividad residual a distintos pH:

El pH del extracto crudo fue ajustado en un rango de 2 a 8 ($\Delta=1$) con HCl concentrado o NaOH 40% P/P, esterilizado por filtración por Millipore 0,22 μm y fraccionado en eppendorf (0,6 ml). Luego de ser incubados por 20 y 40 horas a 26°C se determinó su actividad en condiciones estándar.

$\% \text{Actividad Residual} = (\text{AHUT medida} / \text{AHUT crudo sin incubación}) \times 100$

5.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC):

Los ensayos fueron llevados a cabo en un equipo DSC Mettler TA4000. Los termogramas obtenidos fueron analizados utilizando el sistema de análisis térmico TA72. La calibración del equipo se realizó utilizando indio como patrón. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando cápsulas de aluminio herméticamente selladas según rangos de temperatura y velocidades de calentamiento indicados en el texto; cápsulas de aluminio vacías fueron usadas como referencia. Las determinaciones de las temperaturas de transición (desnaturalización) fueron realizadas al menos por duplicado.

Preparación de la muestra: extractos crudos provenientes de 72 y 96 horas de fermentación fueron inicialmente ultrafiltrados a 4°C. El concentrado obtenido (7-8 mg proteína/ml), fue liofilizado y resuspendido en agua destilada para lograr una concentración de al menos 15% P/V (de modo de tener al menos 3 mg de proteína en los 20 μl de capacidad de la cápsula).

La materia seca de las muestras se determinó gravimétricamente luego que las cápsulas utilizadas (previamente taradas) fueron pinchadas y secadas en estufa de vacío a 70°C durante 24 horas.

5.3. Ultrafiltración:

Se utilizaron los dispositivos de ultrafiltración de Sigma: Centrifuge filter unit Ultrafree-20 que tienen una membrana de celulosa regenerada con 10000 Da de corte de peso molecular. El proceso fue llevado a cabo en una centrifuga refrigerada International (IEC) a 4°C.

Extractos crudos (27,5 ml) de 72 y 96 horas de fermentación fueron centrifugados (en dos etapas) a 2100 rpm (1500 g) durante 60 y 50 minutos totales respectivamente. La membrana de ultrafiltración fue luego lavada con 100 µl de agua destilada, recuperándose al final del proceso 1,66 y 3,57 ml de concentrado de cada extracto respectivamente. Los mismos fueron mantenidos a -20°C hasta su posterior análisis y utilización.

5.4. Cromatografía de intercambio aniónico:

Resina de intercambio aniónico DEAE-Sepharosa DSS Fast Flow (Sigma) fue utilizada en una columna (Sigma) de 1x10 cm con camisa de refrigeración (4°C), con un volumen de lecho de 6 ml y equilibrada inicialmente con buffer acetato 0,01 M pH 5,2. El pH de alícuotas de los concentrados de extractos de 72 y 96 horas de fermentación, obtenidos por ultrafiltración fue ajustado inicialmente a pH 5,2 con buffer acetato (0,01 M concentración final) siendo luego cada una sembrada en la columna.

La columna fue lavada inicialmente con buffer acetato 0,01 M pH 5,2, luego se conectó la misma a un gradiente lineal de NaCl 0-0,4 M y posteriormente de un paso a NaCl 1M. El flujo utilizado fue de 20 ml/hora y las fracciones recolectadas de 2 ml, las que fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis.

5.5. Cromatografía de filtración molecular:

Se utilizó una columna (Pharmacia) 1x40 cm con un lecho de Sephadex G-75 SF (rango 10000-75000 Da) equilibrada con buffer acetato 0,05 M NaCl 0,05 M pH 5 en condiciones ambientales refrigeradas. El mismo buffer fue utilizado para la elución a un flujo de 0,153 ml/min, recolectándose fracciones de 0,5 ml.

El volumen muerto de la columna fue estimado por el volumen de elución de Blue Dextran 2000 ($V_0 = 10$ ml) y el volumen total por el de elución de CoCl_2 ($V_t = 25,5$ ml). La calibración final de la columna se hizo usando el kit de marcadores de bajo PM de Pharmacia: ribonucleasa A (13700 Da), quimotripsinógeno A (25000 Da) y ovoalbúmina (43000 Da). Los volúmenes de elución se calcularon según: $V_e = V_{\text{fracción}} + V_0$.

La curva de calibración fue calculada entonces por regresión lineal de K_{av} vs $\log(\text{PM})$, siendo $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, a partir de la que se estimaron los PM incógnita.

Extracto crudo de 96 horas de fermentación fue liofilizado y resuspendido en buffer acetato 0,05M NaCl 0,05M pH 5, para lograr una concentración de proteína $\cong 9$ mg/ml. Luego fue centrifugado 20 minutos a 7000 rpm (7200 g) para eliminación de agregados y 0,7 ml del sobrenadante ($\cong 6$ mg proteína/ml) fue sembrado en la columna de filtración molecular. Las fracciones colectadas fueron mantenidas a -20°C hasta su análisis.

5.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida:

Las electroforesis se realizaron utilizando un equipo BioRad Mini Protean II para minigeles (10x8 cm). La densitometría de los geles se llevó a cabo con un equipo BioRad GS-670 Imaging Densitometer, utilizando para su análisis el programa Molecular Analyst V1.1.

SDS-PAGE: Geles de poliacrilamida T=11% fueron preparados según Laemmli (1970), y corridos en condiciones desnaturalizantes (buffer de corrida con SDS) a 15 mA, durante 4 horas a 4°C .

El protocolo básico modificado por Heussen (1980) fue utilizado para la preparación de geles conteniendo gelatina en la matriz como sustrato para proteólisis. Luego de la corrida (en las condiciones mencionadas), los mismos fueron lavados en Triton X-100 (1 hora a 4°C), incubados en buffer acetato 0,05 M pH 5, de 3 a 8 horas a 37°C , y teñidos con Amido Black over night. Luego de su destinción las bandas de actividad proteásica se ven como zonas claras sobre el background azul.

Geles desnaturalizantes sin gelatina fueron teñidos para la detección de proteínas con Coomassie Blue R-250.

Kit de marcadores de bajo PM de BioRad fue sembrado para la determinación de PM: fosforilasa b (97400 Da), seroalbúmina (66200 Da), ovoalbúmina (45000 Da), anhidrasa carbónica (31000 Da), inhibidor de tripsina (21500 Da) y lisozima (14400 Da). La curva de calibración para el cálculo de los PM incógnita fue determinada a partir de regresión cúbica de: R_f vs. $\log(\text{PM})$, siendo $R_f = (\text{distancia migrada por la proteína})/(\text{distancia migrada por el frente})$.

Gel nativo: Gel de poliacrilamida T=10% fue preparado según protocolo modificado de Ornstein y Davis (1962) para mantener las condiciones de corrida inferiores a pH 7. Luego fue corrido, sin SDS en su estado nativo, a 200 V, durante 1 hora a 4°C.

Posteriormente para el revelado de actividad proteolítica, el gel fue incubado en caseína 1% en buffer Mc Ilvaine 0,05 M pH 3, durante 1,5 horas a 37°C.

La tinción se realizó con Coomassie Blue R-250. Zonas claras luego de la destinción indican proteólisis.

6. Tratamiento de datos

Todas las experiencias y determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado, siendo presentado entonces el promedio de las mismas.

Los variados test y modelos aplicados en el análisis estadístico de datos: Correlación de Pearson, Anova, Test de Tukey, Regresión Lineal Múltiple, fueron realizados con el programa Statistix 4.1 1988-90. El modelado por el método de Regresión no Lineal (Modelo Logístico) y las Regresiones Lineales Simples fueron desarrollados con el paquete estadístico del programa Graph Pad Prism 1.03 1994.

Montgomery (1984), Elliott (1983) y Statistix 4.1- User's manual (1994), constituyeron el soporte bibliográfico central en esta temática.

Diferencias en el formato numérico: debido a la configuración del software utilizado, en texto y tablas el separador decimal está representado por la coma y en los gráficos por el punto.

*RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN*

CAPÍTULO I

*Selección e identificación de una cepa
para producción de proteasas en FES*

1. Selección de una cepa para producción de proteasas en FES

La diversidad de proteasas producidas y su capacidad para secretarlas, ha estimulado la aplicación industrial de los hongos filamentosos y en particular de aquellos pertenecientes al género *Aspergillus*.

Las proteasas producidas por *Aspergillus niger* pertenecen al grupo de proteasas ácidas y son principalmente producidas por cultivo sumergido (Yang, 1986; Kalisz, 1988). Pero recientemente se ha dado gran atención a la fermentación en estado sólido debido a las grandes posibilidades que ofrece cuando el microorganismo usado es un hongo, ya que éste típicamente crece en la naturaleza sobre sustratos sólidos (Pandey, 1992).

La selección del hongo adecuado es uno de los criterios más importantes en FES. Una selección primaria de una cepa productora de proteasas, involucra un test de screening en placa en el que un halo de claridad alrededor de la colonia indica la degradación enzimática de la caseína del medio por la proteasa producida.

En nuestro caso se evaluaron otras condiciones nutricionales y fisicoquímicas relevantes para la FES, como efecto de variación de la temperatura de incubación, concentración de glucosa y de la actividad de agua, usando NaCl como depresor de la misma.

1.1. Selección primaria sobre placas de agar leche

La selección primaria se hizo por cuantificación de la relación de los diámetros: halo/colonia (H/C), sobre placas de agar leche incubadas 72 y 96 horas, a 28°C.

La relación mostró previamente buena correlación (R: 0,98) en el tiempo, con la actividad proteásica medida luego de la extracción de la enzima del agar, y es un criterio ampliamente utilizado para analizar la producción de distintos metabolitos (Sekine, 1969; Blazej, 1989).

El 30% de los 210 aislados de *Aspergillus* analizados no mostraron zona de difusión enzimática y de los restantes sólo el 17% mostró una actividad comparable a las cepas *Aspergillus niger* NRRL 330 y337 y *Aspergillus oryzae* NRRL 2160, las que fueron

reportadas como buenas productoras de proteasas (Battaglino, 1991). Cerca de 20 cepas pertenecientes a esta última categoría fueron examinadas ante otras variables.

1.2. Selección secundaria

1.2.1. Efecto de la temperatura

La relación H/C fue medida luego de 96 horas de incubación a 28 y 37°C siendo menor a esta última temperatura.

La producción de proteasa fue significativamente ($p<0,001$) reducida a 37°C respecto de 28°C, (Figura I.1).

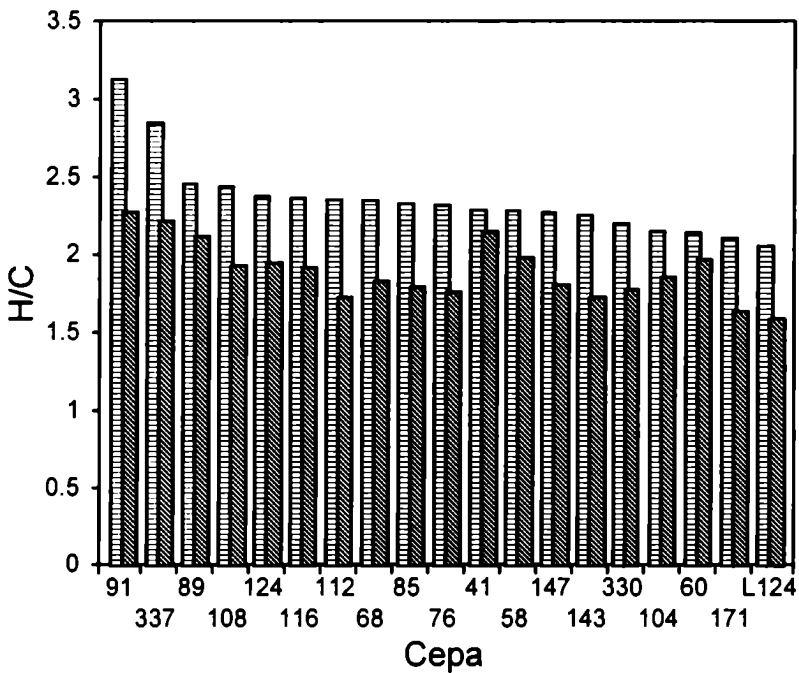


Figura I.1: Efecto de la temperatura sobre la relación H/C a:
37°C , 28°C , luego de 96 horas.
H/C: relación de diámetros (halo/colonia)

Similares hallazgos respecto de una mayor producción de proteasas a una temperatura menor que el óptimo de crecimiento fue reportado por Wang (1974) en cultivos de *Rhizopus*, *Mucor*, y *Actinomucor* sobre sustrato sólido y Narahara (1982) con *Aspergillus oryzae*.

La relación H/C decreció un 25% por el aumento de la temperatura y la cepa 91 fue la mejor productora a ambas temperaturas.

1.2.2. Efecto de la glucosa

Considerando el mismo grupo de cepas, en este ensayo las placas de agar leche fueron suplementadas con glucosa de 0,2% a 2% e incubadas 96 horas, a 28°C.

Cuando las placas fueron suplementadas con más de 1% de glucosa, no se observó halo de hidrólisis, indicando represión de la producción de proteasa para todas las cepas estudiadas. Aplicando el test de Tukey a los resultados restantes obtenidos (Tabla I.1), se observa que la suplementación con glucosa entre 0,2 y 0,8%, decreció la producción de proteasa ($\alpha= 0,05$). En particular y a diferencia del resto, las cepas 91 y 58 sólo mostraron dicho efecto a partir de la adición de 0,5% de glucosa.

Estos resultados sugieren el fenómeno general de represión catabólica. Fiedurek (1986) también reportó una gran reducción en la síntesis de proteasa de *Aspergillus niger* C al crecer en un medio con extracto de salvado de trigo con 2% de glucosa.

Tabla I.1: Test de Tukey para evaluar el efecto de la glucosa sobre la relación H/C.

Glucosa (%)	H/C (media) ^a	Grupos de Tukey ^b
0	2,24	A
0,2	1,93	B
0,5	1,96	B
0,8	1,79	B

^a Media de H/C después de 96 horas. Casos totales : 68
^b Medias con la misma letra no difieren significativamente a $p \leq 0,05$

Klapper (1973) observó una baja producción de proteasa extracelular de *Aspergillus oryzae* cuando la concentración de glucosa superó el 0,3%. Basado sobre la observación que la interrupción de la incorporación de aminoácidos radiactivos a la enzima fue suprimida bajo tales condiciones , concluyó que la síntesis de la enzima fue inhibida.

Shinmyo (1978) demostró en un detallado estudio sobre represión catabólica de proteasa ácida de *Aspergillus niger*, que la adición de 1% de glucosa reprimió la enzima en un 70-80%.

Esta temática será evaluada y discutida posteriormente en el sistema de FES.

1.2.3. Efecto de la actividad de agua

La actividad de agua (A_w) es un parámetro más representativo que el contenido de humedad o la concentración de solutos, para describir un proceso biológico, microbiológico o enzimático (Hahn-Hägerdal 1986). Los microorganismos no reconocen el contenido de agua de un material particular, pero sí la cantidad “disponible” de agua, la que difiere considerablemente, dependiendo del soluto y/o sustrato insoluble presente.

Para regular la actividad de agua, fue agregado NaCl al medio agar leche ($A_w = 1$), de modo de obtener los siguientes valores: 0,982 (3% NaCl), 0,963 (6% NaCl) y 0,95 (8% NaCl). Las placas fueron incubadas entre 72 y 166 horas a 28°C.

La reducción del A_w produjo como efecto principal el incremento de la fase lag, junto con la reducción de la velocidad de crecimiento en todas las cepas estudiadas. Los diámetros de colonia correspondientes al medio de $A_w = 0,95$, se aproximaron a los valores correspondientes a $A_w = 1$ después de 15 días de incubación por lo que fueron excluidos de posteriores estudios.

Para comparar el efecto del A_w sobre la producción de proteasa, se eligieron para cada A_w tiempos diferentes de crecimiento en los que los diámetros de colonia fueran similares (no hubo diferencia significativa, según test de Student, $\alpha = 0,05$). El test de Tukey (**Tabla I.2**) indica que la relación H/C media, fue significativamente disminuida por el descenso del A_w ($\alpha = 0,05$) a 0,982. Sin embargo por debajo de este valor, H/C se incrementa nuevamente alcanzando los valores de A_w 1.

Tabla I.2: Test de Tukey para evaluar el efecto de la actividad de agua sobre la relación H/C.

A _w	H/C (media) ^a	Grupos de Tukey ^b
1	2,15	A
0,982	1,79	B
0,963	1,96	AB

^a Medias de H/C después de 118 horas para A_w 1 y 0,982 y después de 166 horas para A_w 0,963. Casos totales : 39

^b Medias con la misma letra no difieren significativamente a $p \leq 0,05$

Un estudio más detallado sobre el efecto del A_w, fue llevado a cabo con cuatro cepas, analizando la evolución de diámetros de colonia y producción de proteasa durante 166 horas. El radio de la colonia se incrementó linealmente en el tiempo, lo que es esperado para la mayoría de los hongos (Bull, 1977; Prosser, 1982; Mitchell,. 1988).

En la **Figura I.2a** se observa el efecto del A_w sobre la velocidad de crecimiento radial (K_d). Al disminuir el A_w de 1 a 0,982, el K_d se incrementa ligeramente para algunas cepas, mientras que no cambia para otras; sin embargo, cuando el A_w decrece a 0,963, las velocidades de crecimiento disminuyen un 40-50% para todas las cepas.

La fase lag para la cepa 91 mostró poca variación (de 16 a 23 horas.), al decrecer el A_w, sin embargo para las otras cepas se incrementó hasta 3 veces en comparación con las de A_w 1.

La **Figura I.2b** muestra el efecto del A_w sobre la máxima relación H/C. Puede verse que, excepto para la cepa 91, las cepas restantes no muestran gran variación en dicha relación a valores mayores de A_w (1-0,982). Cuando éste decrece a 0,963, un gran incremento en la producción de enzima fue observado para todas las cepas.

Beever (1986) obtuvo una respuesta similar al stress osmótico para *Aspergillus nidulans*, con óptimas velocidades de crecimiento radial hasta 0,5M NaCl y reducción de la misma a niveles superiores a 1M NaCl.

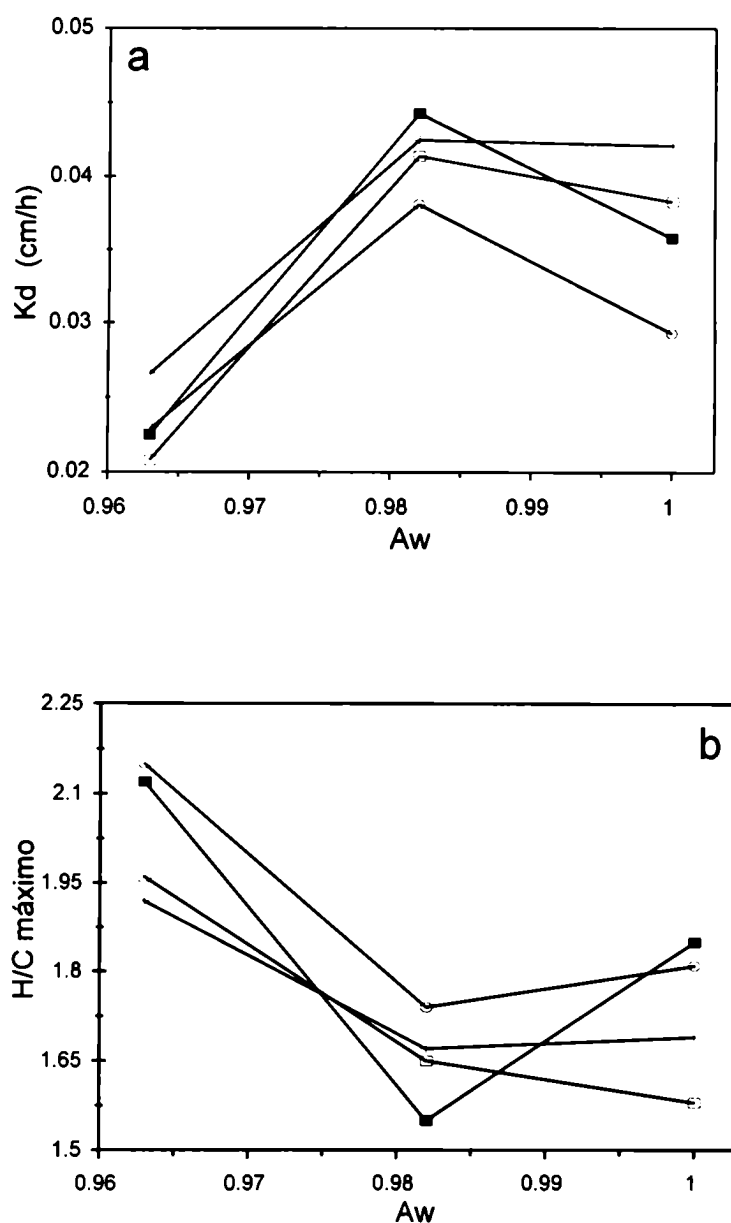


Figura 1.2: Efecto de la actividad de agua sobre:
a) velocidad de crecimiento radial (K_d), b) relación H/C;
para las cepas: □ 76, ○ 89, ■ 91, + 116.

Mitchell (1988), reportó que el crecimiento de *Aspergillus oryzae* sobre placas conteniendo almidón de mandioca, no fue afectado hasta un 4% NaCl. Park (1993), reportó que concentraciones por debajo del 0,5% no tuvieron influencia sobre el crecimiento hifal de *Aspergillus niger*. Sin embargo, 0,75% NaCl causó cesación del crecimiento hifal por 5 minutos, pero 20 minutos después éste se reinició. También mostraron que el contacto repetido con 0,75% NaCl produjo insensibilidad de la hifa a

esta concentración y tolerancia hasta 1,25% NaCl. Estos resultados indicaron que *Aspergillus niger* se adaptó al stress salino, cambiando su estado fisiológico, por ejemplo: acumulación de polioles (como glicerol), para lograr un balance osmótico a través de la membrana celular. Los polioles son solutos compatibles constituyentes habituales del pool celular detectados en las especies de *Aspergillus* y otros hongos (Beever, 1986).

Por esto, el retardo de crecimiento (fase lag) para las cepas 76, 89 y 116 puede ser relacionado al tiempo necesario de acumulación de solutos compatibles para llegar al equilibrio con la concentración salina externa. La cepa 91 requirió menor tiempo para llegar a ese balance, lo que tiene gran significancia tecnológica.

Los resultados mostrados en la **Tabla I.2** y en la **Figura I.2b**, mostraron que la producción de proteasa fue aumentada a menor A_w (0,963), y pudo alcanzar la producción medida a A_w 1, a largos tiempos (166 horas.), a pesar de las bajas tasas de crecimiento observadas.

La máxima producción de proteasa obtenida en estos casos mostró una correlación inversa con la velocidad de crecimiento ($R: -0,91$, $p < 0.01$), indicando que mientras la velocidad de crecimiento es disminuida por el descenso del A_w , la producción de proteasa aumenta.

Esta relación entre la producción de enzima, la variación de la actividad de agua y el incremento del stress osmótico ante la adición de NaCl será discutida posteriormente en el sistema de FES.

1.3. Selección final en FES del microorganismo adecuado

Se seleccionaron seis cepas que mostraron mejor rendimiento en los ensayos previos para analizar la producción de proteasa sobre un sustrato sólido, soja, a 28°C y un contenido de agua inicial de 38%.

Los resultados en la **Tabla I.3** muestran que las cepas 91, 76 y 116, producen la mayor cantidad de la enzima a 72 y 96 horas de fermentación.

Finalmente entre éstas la cepa 91 fue la seleccionada para realizar estudios posteriores en FES, estando esto basado en que exhibe alta relación H/C bajo condiciones de represión catabólica, alta temperatura y A_w reducida, y por su rápida adaptación a los cambios de osmolaridad externos demostrada en la escasa variación de su fase lag.

Tabla I.3: Producción de proteasa en FES para seis cepas seleccionadas.

Cepa	Proteasa (UP/g SS ₀)	Proteasa (UP/g SS ₀)
	(72 horas)	(96 horas)
91	4060 ± 203	4733 ± 236
116	3739 ± 187	4079 ± 204
108	2585 ± 129	2568 ± 128
89	2449 ± 122	2719 ± 136
76	3721 ± 186	4458 ± 223
124	1696 ± 85	1578 ± 79

Los resultados son promedio de 5 experimentos independientes.

2. Identificación taxonómica de la cepa 91

Dadas las estructuras de la cepa 91 observadas y medidas por microscopía de los microcultivos y preparados de lactofenol, se ingresó en dos claves taxonómicas de Raper y Fennell (1965), una basada principalmente en la morfología fúngica y la otra en el color, y también en otra clave dada por Kozakiewicz (1989). En los tres casos se identificó a la cepa 91 como perteneciente al grupo *Aspergillus niger*.

Las estructuras típicas del grupo y las particulares de esta cepa se informan a continuación (Fotos I.1 y I.2):

- Cabeza conidial en algunas formas de negro o marrón oscuro, globosa (casi siempre), o radiada, diámetro: (36,70 ± 6.82) μ.
- Conidióforos lisos, sin color, o pigmentados debajo de la vesícula, largo: (293,30 ± 85,42) μ , diámetro: (5,43 ± 1,36) μ.

- Vesículas globosas, transparentes o coloreadas a la luz en formas de marrón oscuro, diámetro: $(15,76 \pm 4,61) \mu$.
- Células conidiógenas biseriadas (presencia de métulas y fiálides), uniseriadas (sólo la fiálide), frecuentemente pigmentadas.
- Conidios globosos, lisos, diámetro: $(3,94 \pm 0,30) \mu$.
- Presencia de esclerocios.
- Micelio tabicado, y en general se origina un solo conidióforo en cada célula pie.

Foto I.1: Cabeza conidial de *Aspergillus niger* 91. Aumento 400 x.
CBG cabeza biseriada globosa
CO conidióforo
C conidio
M métula
F fiálide

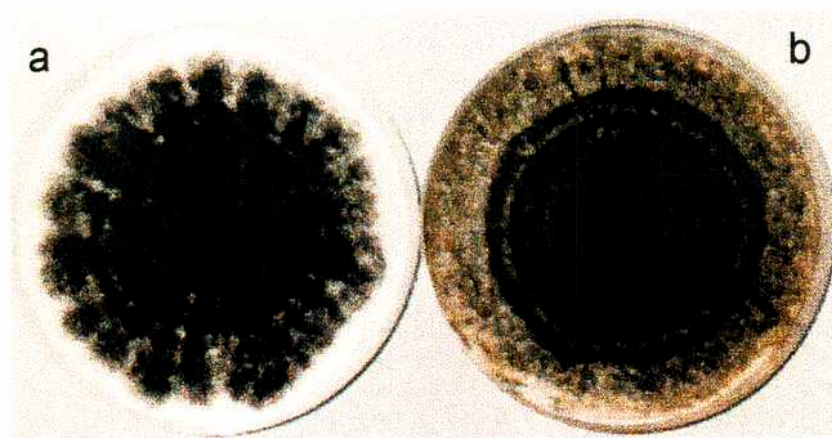
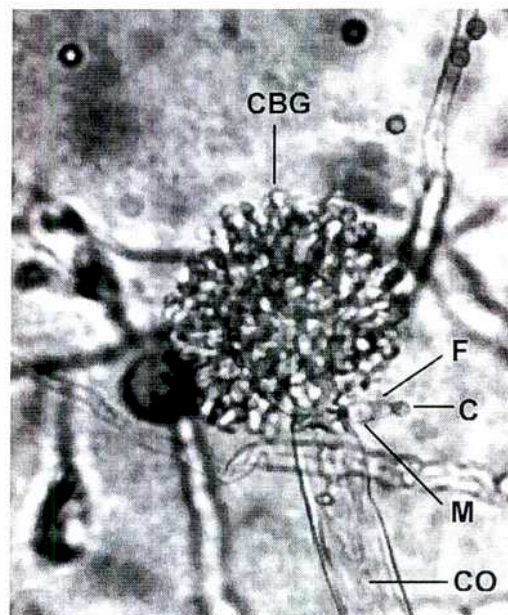


Foto I.2: Colonias de *Aspergillus niger* 91 luego de 10 días a 28°C sobre:
a) agar Czapeck, b) agar Malta.

CAPÍTULO II

Selección del sustrato para la FES

1. Elección y caracterización del sustrato

1.1. Efecto del tipo de sustrato

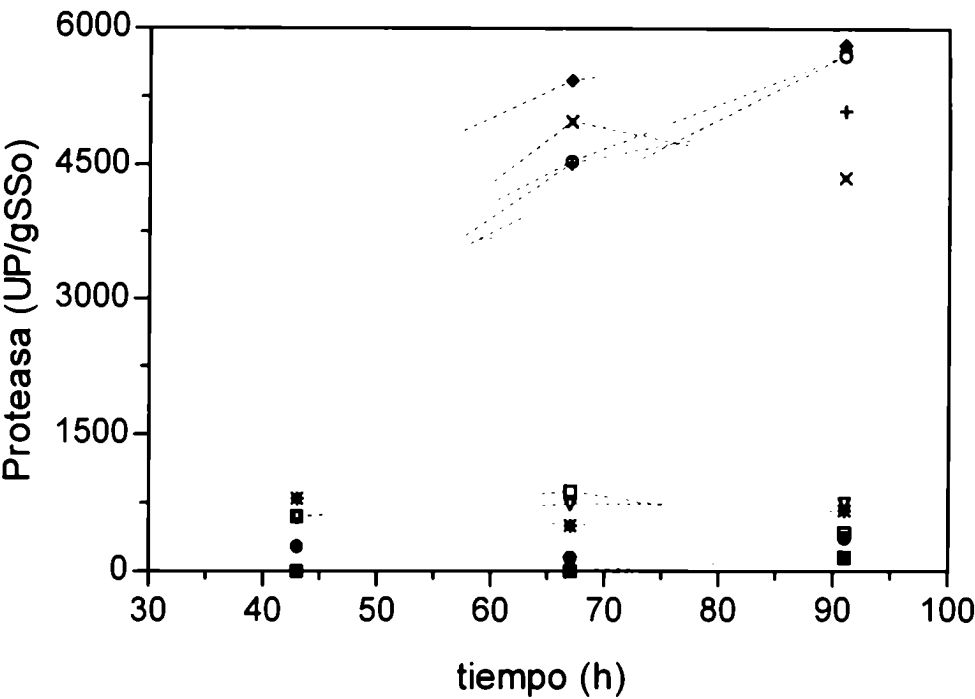


Figura II.1: Efecto de diferentes sustratos naturales sobre la producción de proteasa ácida por *Aspergillus niger* 91 : × soja, ▲ afrechillo de arroz, + salvado de trigo, ● maíz, ■ cascarilla de arroz, ○ arveja, ▼ soja:salvado de trigo (7:3), ▽ avena, * cebada, ◆ soja:afrechillo de arroz (7:3), □ arroz integral. T: 29°C, H₀: 37%, pH₀: TC (5,7-6,2).

Tanto sustancias naturales como sintéticas pueden ser usadas como sustratos en los procesos de fermentación sólida. Entre las primeras se encuentran los productos agrícolas heterogéneos, relativamente no procesados, o derivados de la agroindustria, elegidos generalmente para muchos procesos por su bajo costo o por ser descartados como residuos. Todos tienen una estructura básica polimérica que le confiere las propiedades de sólido, constituida en general por polisacáridos, proteínas y ligninas. Estos pueden tener un rol de soporte es decir proveen una matriz inerte sobre la cual son adsorbidas las fuentes de carbono y energía (azúcares, lípidos, ácidos orgánicos), o bien

pueden actuar como sustrato que luego de ser degradado provee los nutrientes necesarios para el desarrollo del hongo (Mitchell 1992c).

En la **Figura II.1** se observa la evolución de la producción de proteasa ácida en el tiempo, por fermentación de la cepa *Aspergillus niger* 91 sobre distintos sustratos naturales, humedecidos sólo con agua destilada.

En todos los casos se obtuvo buen crecimiento del hongo y compactación del sustrato debido a la abundante penetración del mismo por las hifas del micelio, excepto en la cascarilla de arroz donde el desarrollo fúngico y la producción de enzima fueron escasos debido a que está compuesta principalmente por celulosa, lignina, y tiene escaso valor nutritivo. En cuanto a la producción de proteasa, los sustratos pueden dividirse en dos grupos: los que tienen un contenido de hidratos de carbono superior al 60% que evidencian bajo rendimiento de la enzima, y los restantes sustratos en los cuales ésta se incrementa.

En el sustrato soja partida:afrechillo de arroz (7:3), se obtuvo la mayor producción de proteasa en los tres tiempos de fermentación ensayados.

En la **Figura II.2** se muestra la influencia de la relación hidratos de carbono / proteína, contenidos en cada sustrato sobre la producción máxima de la enzima. Dichos contenidos fueron estimados de datos de la literatura (Montes, 1981; Steinke, 1992; Prakash, 1996).

Relaciones de carbohidrato / proteína superiores a 4 permiten escasa producción de proteasa por el hongo, sin embargo cuando la relación es menor que 2,5 la misma se incrementa abruptamente, siendo máxima en valores próximos a 1. El medio sobre el que se obtiene la máxima cantidad de enzima: soja partida:afrechillo de arroz (7:3), tiene una relación de carbohidrato / proteína de 0,82.

De este modo la composición del sustrato en FES tiene una marcada influencia sobre el rendimiento en proteasa, y como fue observado ya en otros casos, la relación carbohidrato / proteína puede ser utilizada para predecir su capacidad para promover la producción de este tipo de enzimas (Battaglino, 1991).

El medio seleccionado está constituido por 30% de afrechillo de arroz y 70% de porotos de soja partidos. El afrechillo de arroz es obtenido por molienda abrasiva de la capa de salvado que rodea al grano blanco de arroz, una vez que la cascarilla ha sido removida.

Constituye del 5 al 9 % del grano y es una fuente rica de proteínas, lípidos, vitaminas, trazas minerales y almidón (por quiebre del endosperma) cuya proporción depende del grado de molienda (Prakash, 1996).

En cuanto a la composición del poroto de soja, más del 65% son proteínas y lípidos y cerca de un tercio son carbohidratos que incluyen oligosacáridos como estaquiosa, rafinosa, y sacarosa (Abiose 1982).

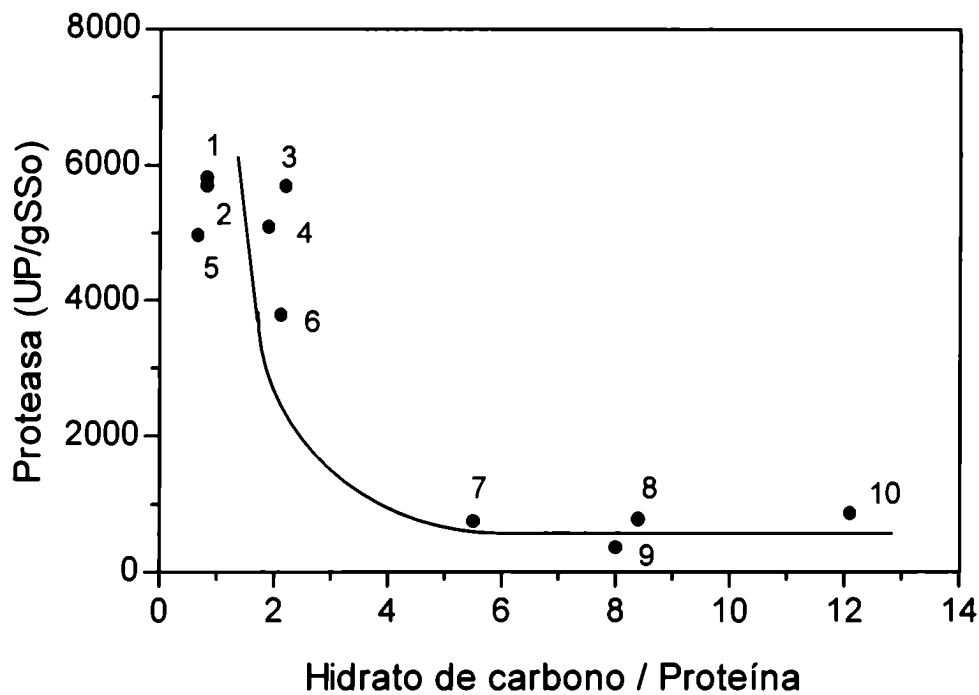


Figura II.2: Efecto de la relación hidrato de carbono a proteína en sustratos naturales sobre la máxima producción de proteasa ácida :
 1 soja:afrechillo de arroz (7:3), 2 soja:salvado de trigo (7:3), 3 arveja,
 4 salvado de trigo, 5 soja, 6 afrechillo de arroz, 7 avena, 8 cebada, 9 maíz,
 10 arroz integral.

Raimbault (1997) resume los pasos necesarios de preparación y pretratamiento para convertir el sustrato crudo en una forma adecuada de uso, estos incluyen:

- reducción de tamaño por molienda o corte.
- hidrólisis físico-química o enzimática de polímeros para aumentar su disponibilidad para el microorganismo.

- suplementación con nutrientes (fósforo, nitrógeno, sales), adecuación de pH y contenido de humedad.
- Cocinado o tratamiento con vapor para pre-degradación de la estructura macromolecular y eliminación de contaminantes.

Algunas de estas opciones han sido ensayadas en este sistema de FES y se comentan a continuación:

1.2. Efecto del tamaño de partícula del sustrato

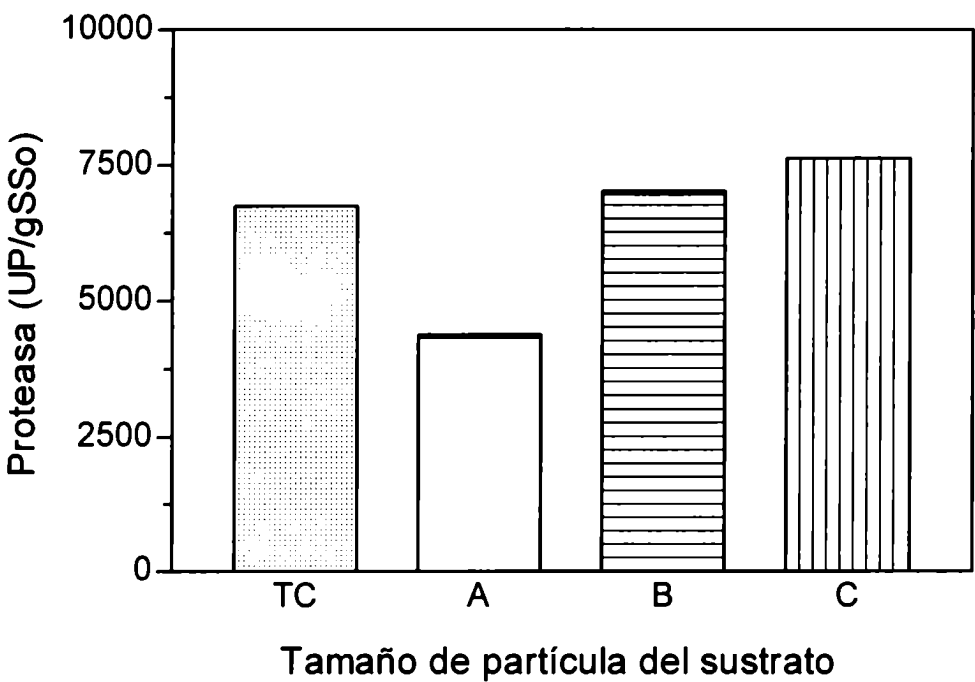


Figura II.3: Efecto del tamaño de partícula de soja en el sustrato soja:afrechillo de arroz, sobre la producción de proteasa ácida por *Aspergillus niger* 91:
A mayor que 3,35 mm; B 3,35 a 2,36 mm; C 2,36 a 1,18 mm;
TC: 25% A, 27% B, 30% C, 18% menor que 1,18 mm.

Con el objeto de analizar la influencia del tamaño de partícula del sustrato soja:afrechillo de arroz sobre la producción de proteasa ácida, porotos enteros de soja fueron molidos y pasados por tamices de distinta malla previo a la preparación del medio. De este modo se realizaron fermentaciones con tres categorías de partículas de soja: mayor que 3,35 mm; 3,35 a 2,36 mm; y 2,36 a 1,18 mm.

En la **Figura II.3** se observa la proteasa producida en estos casos y en el medio tal cual (TC), en el que la soja utilizada fue molida durante 20 segundos siendo su distribución de partícula: 25% mayor que 3,35 mm, 27% 3,35 a 2,36 mm; 30% 2,36 a 1,18 mm y 18% menor que 1,18 mm. En todos los casos la partícula de afrechillo de arroz fue inferior a 1,18 mm.

La aplicación del Test de Tukey para comparación de medias permite confirmar que la proteasa obtenida con un sustrato cuya partícula de soja es superior a 3,35 mm difiere significativamente ($p < 0,05$), de los otros medios utilizados, los que a su vez son similares entre sí.

Por lo tanto, la utilización de un tamaño de partícula de soja inferior a 3,35 mm, o bien la reducción de su proporción como sucede en el sustrato TC, permite un incremento de 50 a 70% en la actividad proteásica obtenida.

Considerando además que el proceso de molienda está acompañado por un costo energético proporcional, resulta ventajoso el uso del mayor tamaño de partícula aceptable en cada sistema de fermentación. Por lo tanto la elección del medio TC de composición variada permitirá disminuir los costos obteniendo aún óptimo rendimiento en proteasa.

La adherencia y penetración de los microorganismos en el sustrato, así como la acción enzimática que degrada sus constituyentes poliméricos en monómeros capaces de permear dentro de las células y permitir el crecimiento de los mismos, depende claramente de las propiedades físicas del sustrato tales como su naturaleza cristalina o amorfa, el área accesible, el área superficial, la porosidad y el tamaño de partícula del cual dependen todos los otros parámetros mencionados (Nandakumar, 1996).

Partículas pequeñas presentan una mayor relación de área superficial / volumen, para la transferencia de calor e intercambio gaseoso y una mejor distribución de la humedad y concentración de nutrientes lo que posibilita tiempos más cortos de difusión de los mismos. Sin embargo cuando las partículas son demasiado pequeñas se produce un empaquetamiento denso del sustrato, con reducción del espacio vacío entre las mismas lo que disminuye la superficie de intercambio con la atmósfera circundante, efecto solamente revertido por la existencia de agitación en el sistema. Por lo tanto hay un mínimo tamaño de partícula en el cual la transferencia de calor e intercambio de gases

se vuelve limitante, y un máximo en el cual la transferencia de nutrientes es la limitante (Mudgett, 1986).

Entonces, como fue observado en el sistema de FES aquí analizado, una equilibrada heterogeneidad física del sustrato proporciona la solución más adecuada para buen crecimiento del hongo y producción de la enzima.

1.3. Isoterma de sorción del sustrato soja:afrechillo de arroz (7:3)

Como ya fue mencionado, una de las modificaciones del sustrato previo a la fermentación es el ajuste del contenido de humedad inicial.

Prior (1992) señala los siguientes conceptos relacionados con dicho proceso.

El agua presente en la FES puede encontrarse en diferentes estados: fuertemente adsorbida a la matriz sólida, como una delgada capa sobre la superficie de las partículas o condensada dentro de los capilares del sólido. Existirá agua libre sólo cuando la capacidad de saturación de la matriz sea excedida, límite que varía considerablemente entre sustratos y depende de sus propiedades de absorción de agua.

El contenido óptimo de humedad para el cultivo de microorganismos en FES es altamente dependiente de dichas características del sustrato. Actualmente el parámetro más usado para medir el potencial del agua, caracterizando el estado energético del agua, o sea el agua disponible para la vida del microorganismo, es la actividad de agua (A_w) del medio.

La relación entre A_w y contenido de humedad del sustrato es descripta a través de las isotermas de sorción. Sin embargo son escasas las isotermas de sorción realizadas sobre sustratos usados en FES y más aún en el rango de A_w típico de una FES ($A_w > 0,90$).

Por lo tanto para caracterizar dicha relación en el sustrato TC, soja:afrechillo de arroz (7:3), se evaluó la isoterma de sorción a 25°C presentada en la **Figura II.4a**, en el rango de humedad más comúnmente usado en FES.

En la **Figura II.4b** se muestra la linearización de la misma según la ecuación de Smith (1981).

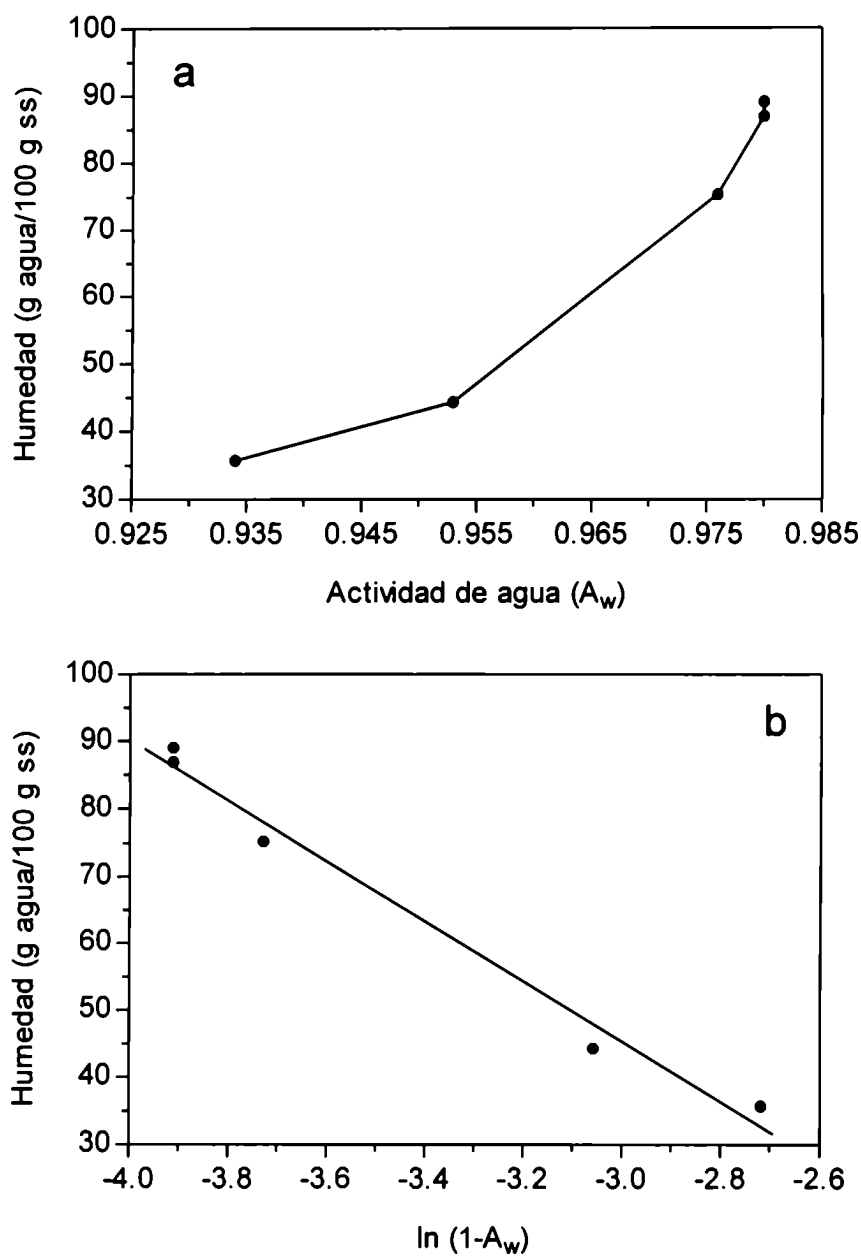


Figura II.4: Isotherma de sorción del sustrato soja:afrechillo de arroz (7:3) a 25°C.
a) Isotherma tal cual. b) Isotherma linearizada.
ss: sólidos secos.

La ecuación (II.1) obtenida presentó buen ajuste, R^2 : 0,98 y a partir de la misma fueron calculados los valores de A_w iniciales del proceso en las distintas condiciones de humedad ensayadas.

(II.1) $H\% = -89,284 - 44,882 \cdot \ln(1 - A_w)$

Donde:
H%: humedad % en base seca.
 A_w : actividad de agua.

1.4. Efecto del modo de cultivo

Con el objeto de dilucidar la importancia del modo de cultivo sobre la producción de proteasa ácida por la cepa *Aspergillus niger* 91 con la utilización del mismo sustrato, se realizaron ensayos paralelos en FES y en cultivo sumergido.

En FES se usó como sustrato 10 g del medio TC soja:afrechillo de arroz , con un 40% de contenido de agua inicial y se recuperó la enzima en un volumen de 100 ml.

100 ml de un extracto 10% P/V, del mismo sustrato sólido fueron utilizados como medio para el cultivo líquido. Éste fue incubado tanto en forma estática como con agitación, mientras que el sólido, sólo estáticamente. Todos los sistemas recibieron el mismo tamaño de inóculo. De este modo la proteasa obtenida por ml de extracto o la total en cada sistema provendrá de la fermentación de una masa equivalente de sustrato con igual composición nutricional pero diferente estructura física.

Trancurridas 164 horas de fermentación se analizó tanto el crecimiento (visualmente), como la producción de enzima.

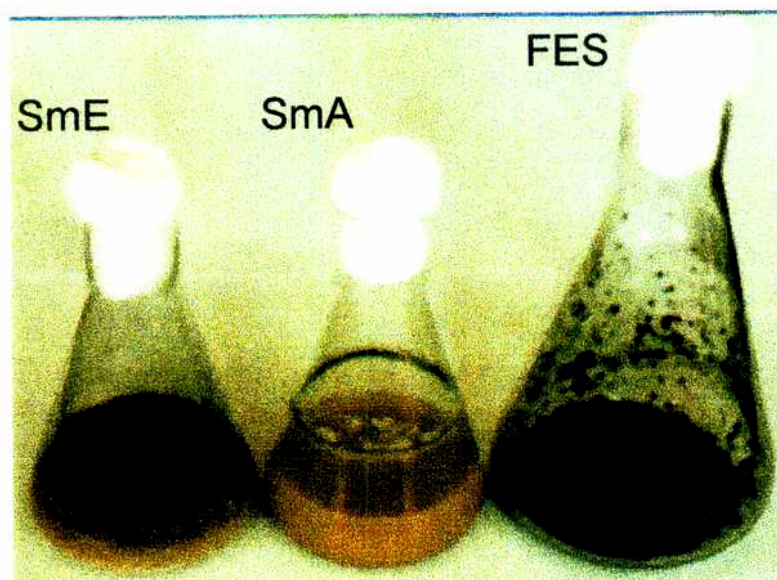


Foto II.1: Diferentes modos de cultivo de *Aspergillus niger* 91 para la producción de proteasa ácida.
SmA y SmE cultivos sumergidos agitado y estático respectivamente,
FES fermentación en estado sólido.

Como la **Foto II.1** indica los tres sistemas de fermentación permitieron óptimo crecimiento del hongo. En FES se observó abundante penetración del sustrato y conidiación, en el cultivo sumergido estático se formó una densa capa de micelio esporulado cubriendo toda la superficie del medio líquido, y en el cultivo sumergido agitado el hongo creció en forma agregada formando abundantes pellets sin conidiación, de escaso diámetro debido probablemente al incremento de viscosidad y por lo tanto del esfuerzo de corte, evento observado en ambos medios líquidos.

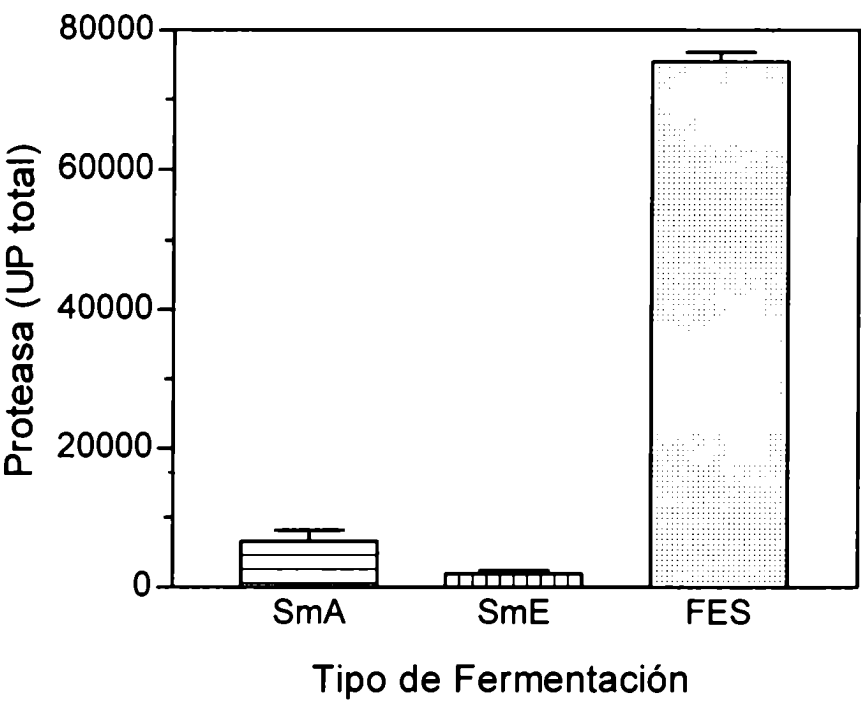


Figura II.5: Producción comparativa de proteasa ácida por *Aspergillus niger 91* en distintos sistemas de fermentación: SmA y SmE cultivos sumergidos agitado y estático respectivamente, FES fermentación en estado sólido.

En la **Figura II.5** se observa que la producción de proteasa ácida en FES por *Aspergillus niger 91* es significativamente superior a la obtenida por cualquiera de los sistemas de cultivo sumergido, a pesar del buen crecimiento fúngico visualizado en todos los casos.

Otros reportes indican resultados similares, con una eficiencia mayor en cultivo sólido que en líquido para biosíntesis de enzimas por hongos filamentosos. Así niveles

significativamente superiores de α -amilasa y glucoamilasa fueron obtenidos por fermentación sólida con cepas de *Rhizopus* y *Aspergillus* sobre mandioca cruda o precocida (Alazard, 1981; Tani, 1986; Soccol, 1994), de proteasa neutra por *Aspergillus oryzae* (Yasuhara, 1994), y de pectin liasa por *Aspergillus niger* (Taragano, 1999).

Sin embargo, es necesario tener en cuenta las características de la cepa utilizada además de la disposición física del sustrato. Viniegra (1997) en un proceso de selección de cepas mutantes de *Aspergillus niger* para producción de pectinasas en cultivo sólido o sumergido, reporta la existencia de un mecanismo regulatorio involucrado en la adaptación de hongos a un medio líquido o sólido y en el control del rendimiento y calidad de las enzimas más adecuadas para cada clase de cultivo. Por lo tanto, cepas seleccionadas para un proceso de FES deberían ser diferentes a las seleccionadas para cultivo sumergido.

El proceso de screening realizado previamente incluyó la exposición a factores limitantes en la FES como los bajos niveles de A_w , y la cepa 91 fue seleccionada entre otras características relativas, por su buen crecimiento y producción en esas condiciones. Por lo que las diferencias observadas son atribuibles tanto al tipo de cultivo realizado como a un eficiente proceso de selección de una cepa para producir enzimas en FES.

2. Suplementación del sustrato

En general, los hongos filamentosos pueden crecer bajo un amplio rango de condiciones ambientales y utilizar gran variedad de componentes del medio como nutrientes.

La adquisición y metabolismo de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno se encuentra bajo un complejo control regulatorio que involucra tanto sistemas globales de control como otros específicos de cada vía (Mac Kenzie, 1993).

Las proteínas exógenas pueden servir como fuente de carbono, nitrógeno y azufre, pero para esto es necesaria la producción y secreción de proteasas.

Jarai (1994), demostró que la regulación de dos genes de *Aspergillus niger* que codifican para las proteasas ácidas aspergillopepsina A y proteinasa A, *pepA* y *pepB* respectivamente, es a nivel transcripcional y está bajo distintos sistemas de control dependientes de fuentes de carbono, nitrógeno, proteínas, y del pH del medio.

2.1. Adición de fuentes de carbono

En las **Figuras II.6a y b**, se observa el efecto de adición al sustrato soja:afrechillo de arroz, de distintos hidratos de carbono al 1% P/P sobre la producción de proteasa ácida, a las 72 y 96 horas de fermentación respectivamente.

El pH inicial de los cultivos fue en todos los casos próximo a 6, excepto cuando se adicionó ácido cítrico donde se redujo a 5,1.

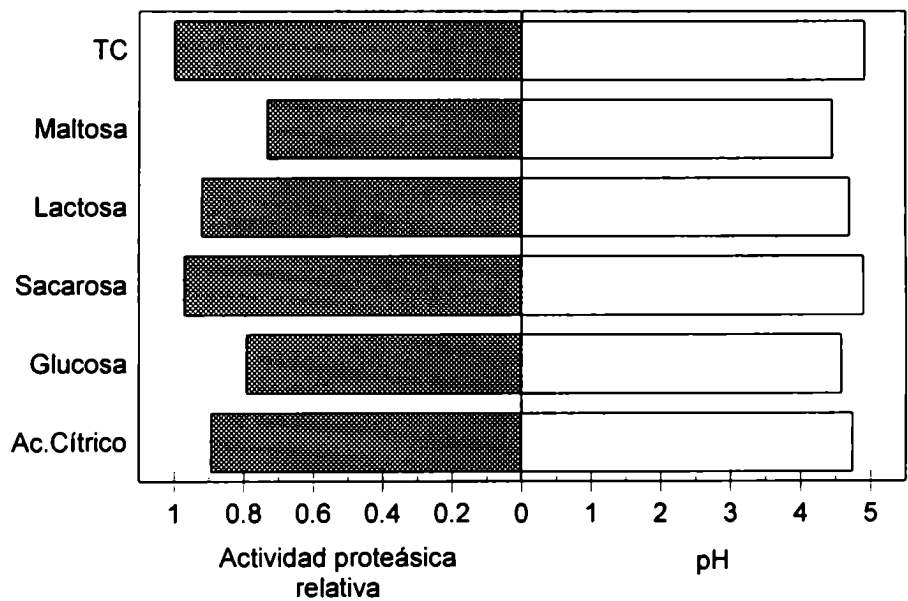
El efecto más notable a las 72 horas de cultivo, es la disminución de la producción de proteasa ante la adición de glucosa o maltosa, en un 21 y 27% respectivamente; siendo esta diferencia mucho menor a las 96 horas.

A esta concentración, el agregado de sacarosa, lactosa, y ácido cítrico no muestra diferencias significativas con el control.

Si bien el cultivo con ácido cítrico tuvo un pH inicial inferior al resto, esta diferencia se minimizó con el tiempo de fermentación.

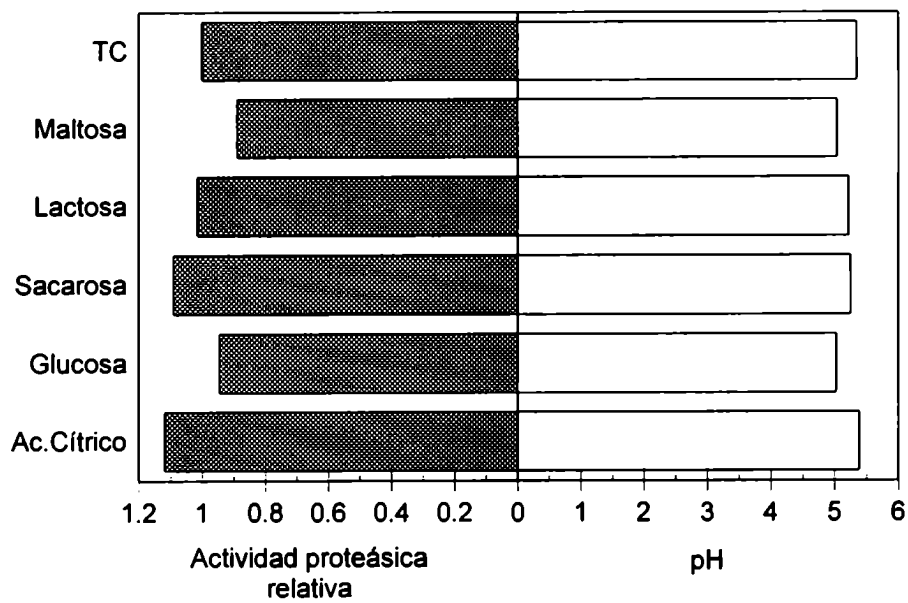
A las 72 horas el pH de los cultivos varía entre 4,5-4,95, y a las 96 hs.entre 5-5,4, viéndose una correlación positiva entre el aumento leve de pH y la producción de enzima ($R = 0,94$).

Figura II.6: Efecto de adición de diferentes hidratos de carbono (1%) sobre la actividad proteásica y el pH de la FES. a) 72 horas, b) 96 horas. TC: sustrato sin aditivos (Actividad proteásica relativa = 1).



a

b



En numerosos casos se ha visto que la presencia de azúcares como glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, (fuentes de carbono fácilmente asimilables), en concentraciones iguales

o superiores al 1%, tienen un efecto de represión catabólica sobre la síntesis de proteasas, que puede ser variable según el hongo y los componentes del medio de cultivo. Sin embargo intermediarios del ciclo de Krebs, como el ácido cítrico no demostraron causar este efecto, (Shinmyo, 1978; Fukushima, 1989; Malathi, 1991; Hellmich, 1988; Fiedurek, 1989).

Jarai (1994) observó que la presencia de fuentes “buenas” de carbono, glucosa (1%), en cultivos de *Aspergillus niger* en medio líquido, reprimió la transcripción de ambos genes, sin embargo fuentes más pobres de carbono como el glicerol (1%), disminuyeron la expresión de *pepB* pero no de *pepA*.

El análisis de las regiones promotoras de estos genes, demostró que la represión catabólica era mediada por el represor CreA, ya que se encontraron varias secuencias específicas de reconocimiento río arriba de estos genes.

Sin embargo este nivel de control varía dentro de las mismas proteasas ácidas. Gente (1997), observó que la ausencia de regulación por fuente de carbono sobre la expresión del gen *aspA*, codificante de una aspartil proteasa en *Penicillium roqueforti*, estaba ligado a la ausencia de sitios conservados de unión para CreA en las secuencias promotoras de *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, donde ejerce una regulación negativa de la transcripción (MacKenzie, 1993), y también en el promotor de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (Kato, 1996).

Si bien la cepa usada en este trabajo *Aspergillus niger* 91, al crecer sobre agar leche con la adición de glucosa (0,2 a 2%), mostró una reducción diferencial de la relación: halo de hidrólisis/colonia, no fue tan significativo el efecto de la adición de diferentes hidratos de carbono (1% P/P), sobre la producción de proteasa en FES.

La ausencia o disminución de represión catabólica en FES, respecto del cultivo en medio líquido fue observada durante la producción de glucoamilasa (Roussos, 1997) y de invertasa (Viniestra, 1997) por *Aspergillus niger*, y de α -amilasa por *Aspergillus oryzae* (Terebiznik, 1998).

La explicación es común en todos los casos y responde a los problemas de transferencia de masa y baja difusión de metabolitos en FES. En este sistema de fermentación, el micelio está rodeado por una delgada capa de agua; las glucoamilasas producidas

difunden para alcanzar el almidón del sustrato. Cuando son liberados los azúcares reductores del mismo, deben difundir para llegar al microorganismo. Como el consumo en la fase temprana de crecimiento es bajo, el azúcar se acumula y da un pico de concentración.

Luego, como el proceso de difusión es lento, los azúcares tan pronto como llegan al microorganismo, son consumidos en la fase exponencial de crecimiento. De este modo su concentración cercana al micelio es muy baja y no se reprime la síntesis de la enzima (Mitchell, 1992b; Roussos, 1997; Terebiznik, 1998).

La existencia de este mecanismo difusional en FES acentúa probablemente el efecto poco significativo de la concentración de hidratos de carbono adicionada en el sistema aquí analizado, por lo que deberían ensayarse concentraciones mayores de los mismos para hacer alguna afirmación de índole regulatoria comparable a las ya mencionadas en otros sistemas de producción de proteasas ácidas.

2.2. Adición de fuentes de nitrógeno

En las **Figuras II.7a y b** se observa el efecto de adición al 0,2% P/P de contenido en nitrógeno, de diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas (entre 0,8 y 1,2% P/P, según la fuente).

No se observaron diferencias relevantes entre los cultivos con la adición de 0,2% de nitrógeno proveniente de distintas fuentes y el control. Sólo el agregado de cloruro de amonio mostró a las 72 horas una reducción del 24% en la producción de la enzima para luego, a las 96 horas alcanzar valores semejantes al control, quizá por haberse consumido el amonio adicionado.

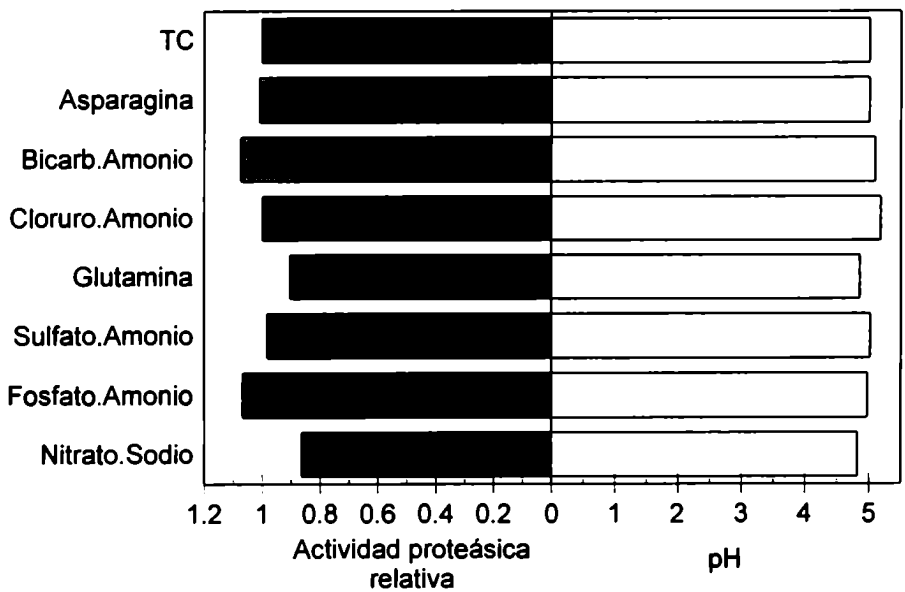
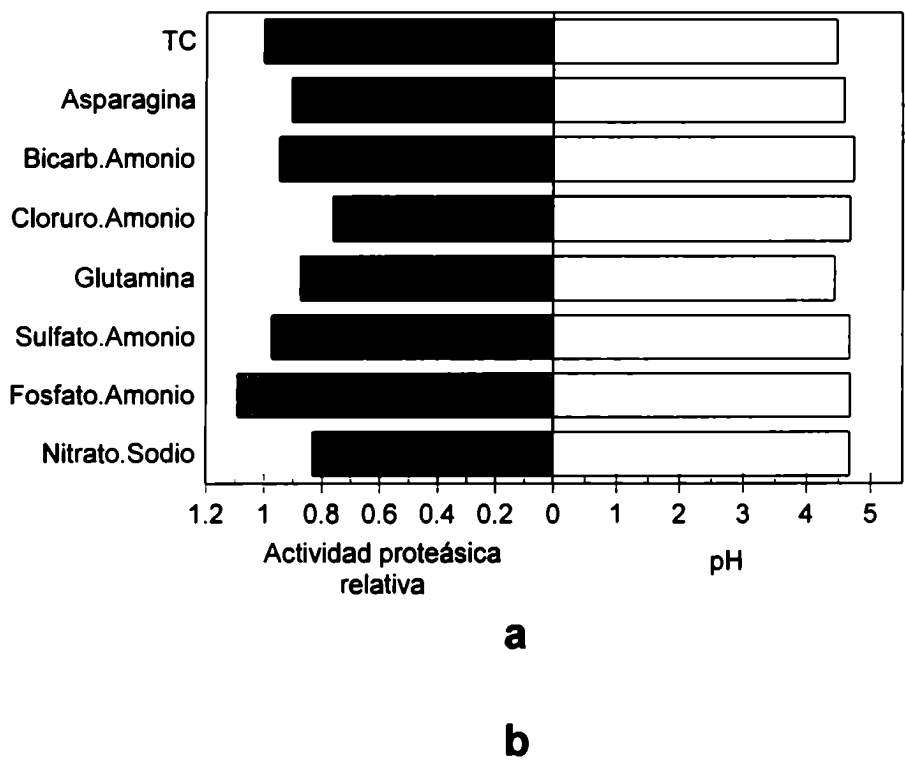
El cultivo con nitrato de sodio mantiene la producción por debajo del control en un 15%, a 72 y 96 horas.

El pH inicial de los cultivos fue similar, entre 6 y 6,1 (6,3 para fosfato de amonio), siendo también semejantes los pHs finales: 4,4-4,7, a 72 horas, y 4,85-5,1, a 96 horas.

En otras experiencias, en *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*, fue observado el incremento de la producción de proteasas por la presencia de sulfato de amonio o su

disminución ante nitrato de sodio, usando desde un 1% P/P, de cada sal(que fue lo adicionado en este trabajo), hasta un 75%, (Nakadai, 1988; Yang, 1986).

Figura II.7: Efecto de adición de diferentes fuentes de nitrógeno (0,2%) sobre la actividad proteásica y el pH de la FES. a) 72 horas, b) 96 horas. TC: sustrato sin aditivos (Actividad proteásica relativa = 1).



Jarai (1994), y Gente (1997), observaron que la adición de NH_4^+ (100 mM), al medio de cultivo líquido, aún en medios conteniendo caseína, reduce total o significativamente la aparición de transcritos de los genes *pepA* y *pepB* en *Aspergillus niger* y *aspA* en *Penicillium roqueforti*.

En *Aspergilli* y *Neurospora crassa* los transreguladores AreA/Nit2, tienen un rol central en este tipo de regulación: son activadores transcripcionales positivos de genes que son reprimidos por fuentes preferenciales o fácilmente asimilables de nitrógeno, y como tales presentan el típico dominio de binding al DNA, con un dedo Cys₂His₂ zinc.

La presencia de secuencias GATA, secuencias de reconocimiento para el binding específico de AreA/Nit2, en los promotores de los genes *pepA* y *pepB* en *Aspergillus niger* y *aspA* en *Penicillium roqueforti*, sugiere la existencia de una proteína regulatoria homóloga a estas.

2.3. Adición de fuentes externas de proteína

En las Figuras II.8a y b se analiza el efecto de adición de distintas proteínas al 2% P/P. No hubo un efecto significativo general sobre la producción de proteasas al incluir un 2% de proteínas en el sustrato sólido.

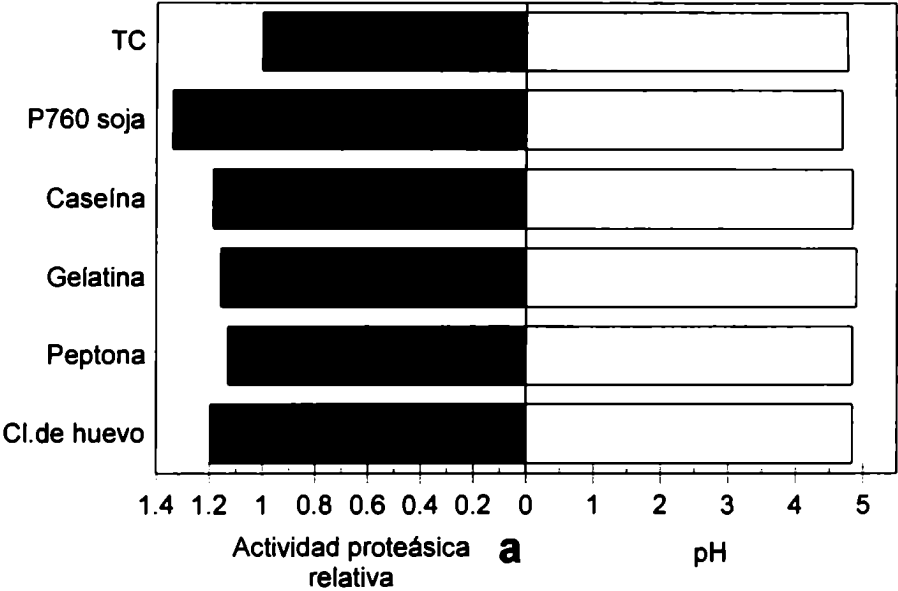
El pH inicial de los cultivos fue semejante a 6 en todos los casos.

A las 72 horas de incubación la presencia de proteína exógena pareciera inducir una más temprana producción de la enzima, siendo en todos los casos levemente superior al control, desde un 13% en el caso de la peptona hasta un 20% para la clara de huevo; pero sólo el incremento fue significativo con el agregado de la proteína de soja P760 (34%).

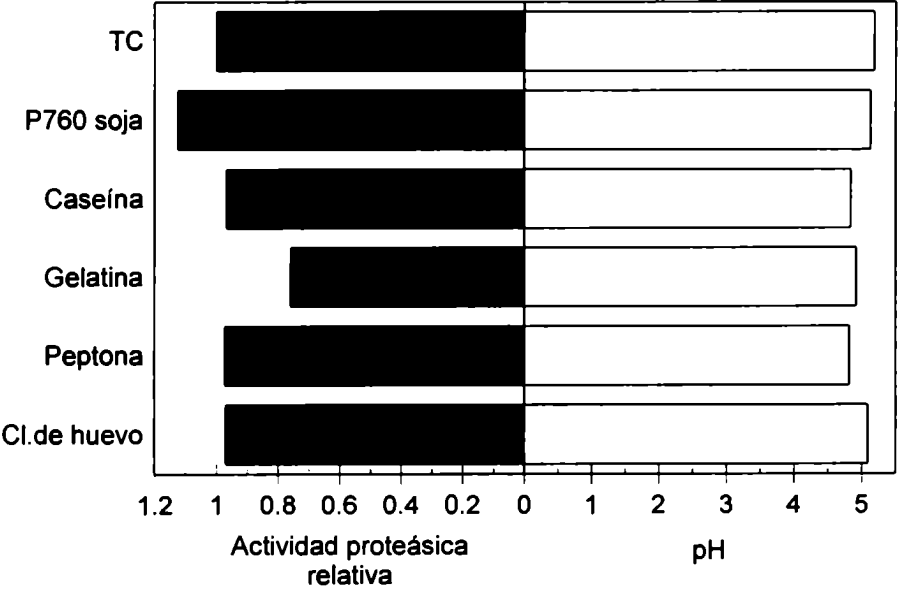
A las 96 horas cuando el hongo entra naturalmente en la fase de mayor liberación de la enzima, ya no se observa este efecto. Sólo un efecto negativo del 25% respecto del control en el cultivo con gelatina y no evidenciado a las 72 horas.

El pH de los cultivos es similar en todos los casos, con valores próximos a 5.

Figura II.8: Efecto de adición de diferentes proteínas (2%) sobre la actividad proteásica y el pH de la FES. **a)** 72 horas, **b)** 96 horas. TC: sustrato sin aditivos (Actividad proteásica relativa = 1).



b



Asimismo la adición de una concentración mayor de P760 para lograr quizás un incremento en proteasa superior al observado, no tendría sentido desde el punto de vista económico, ya que al ser una proteína aislada de soja aumentaría los costos de la FES.

En cultivos de *Aspergillus oryzae*, la adición de proteína aislada de soja, caseína, gluten, clara de huevo, y hemoglobina en concentraciones que varían del 0,5 al 2% P/P, aumentó la producción de proteasas hasta un 80% aproximadamente (Fukushima, 1989; Battaglino, 1991).

Sin embargo algunas de estas proteínas no causaron efecto alguno al 10% P/P en cultivos de *Aspergillus flavus* (Malathi, 1991).

La adición de hasta un 1% P/P de gelatina, induce e incrementa la síntesis de proteasa extracelular en *Ustilago maydis* (Hellmich, 1988), pero concentraciones superiores a ésta pueden reducir el crecimiento del micelio y la síntesis de la enzima en este hongo y en otros como *Rhizopus oligosporus* y *Aspergillus flavus*, (Seaby, 1988; Malathi, 1991). La potencialidad de una proteína como inductor depende por lo tanto de su naturaleza, concentración y fundamentalmente del estado nutricional del medio de cultivo, en cuanto al contenido de nitrógeno (aminoácidos y amonio), sulfuros y fuentes de carbono.

En los sistemas ya analizados de expresión de los genes *pepA/B* y *aspA* en *Aspergillus niger* y *Penicillium roqueforti* respectivamente, la presencia de una proteína inductora, caseína o BSA (1%), en un medio conteniendo NH_4^+ , no induce la síntesis de las proteasas correspondientes, las que se expresan fuertemente en ausencia de NH_4^+ . Lo que confirmaría que la represión mediada por metabolitos nitrogenados, es predominante sobre la inducción específica.

La reversión de la represión por NH_4^+ , en particular en *Aspergillus niger*, también es dependiente de la fuente de carbono presente. La presencia de BSA en un medio con NH_4^+ y una fuente “buena” de carbono ,glucosa, no revierte la represión, sin embargo cuando la fuente de carbono es glicerol, la proteína sí induce la expresión de los genes *pepA/B* a pesar de la presencia de NH_4^+ (Jarai, 1994). Esto indicaría una mayor importancia de la represión catabólica que de la inducción por proteínas en la síntesis de estas proteasas.

Por lo tanto la regulación transcripcional de las proteasas ácidas por proteínas y NH_4^+ responde al aceptado esquema de inducción de enzimas extracelulares por una fuente compleja de nitrógeno que actuaría directamente o vía AreA/Nit2 circuito, y represión por una fuente de nitrógeno favorable que inhibe a AreA (Jarai, 1994; Gente, 1997).

Concluyendo en general se puede decir que en el medio de fermentación utilizado, soja:afrechillo de arroz, la riqueza óptima de nutrientes para la producción de esta enzima impide que los efectos de inducción-represión, sean notables, ya que se debería trabajar en condiciones de hambre y de nutrientes limitante que evidentemente no son las existentes en el sustrato seleccionado. Por lo tanto no se consideró la suplementación del sustrato seleccionado.

CAPÍTULO III

Caracterización de la FES
Efecto de las variables de fermentación

1. Estimación de biomasa en FES

Uno de los parámetros fundamentales en la caracterización del crecimiento microbiano es la biomasa, y su medición resulta esencial para estudios cinéticos en FES.

En FES el micelio fúngico crece íntimamente unido a la matriz sólida y no puede ser cuantitativamente separado de ésta, por lo que la determinación directa de la biomasa resulta imposible.

Mitchell (1992a) describió los distintos métodos indirectos de estimación de biomasa:

1- Medición de una actividad metabólica: consumo de oxígeno y evolución de dióxido de carbono resultante de la respiración, ATP, producción de enzimas extracelulares (siempre que estén asociadas al crecimiento) o metabolitos primarios (como los ácidos orgánicos).

2- Medición de un constituyente celular: nitrógeno y proteínas, ácidos nucleicos, ergosterol, glucosamina (quitina).

3- Medición de consumo de nutrientes: como carbohidratos.

4- Medición física: conductividad eléctrica, caída de presión dentro de una columna empaquetada durante la FES.

Cada método conlleva ventajas y desventajas, por lo tanto es necesario seleccionar uno o varios indicadores de biomasa que mejor se adapten al tipo de microorganismo y de sustrato sólido a utilizar. Además es importante que dicho indicador sea constante a través del desarrollo fúngico y sea el mismo ante distintas condiciones de cultivo (Desgranges, 1991).

El método indirecto elegido para caracterizar el crecimiento del hongo *Aspergillus niger* 91 en el sustrato sólido soja:afrechillo de arroz, fue la determinación del contenido de glucosamina.

Las paredes celulares de los hongos contienen varios polisacáridos que le dan integridad estructural: celulosa, quitina, glucanos, glucoproteínas, y poliuronidos. Entre éstos el principal es la quitina, homopolímero lineal de residuos de N-acetil-D-glucosamina con uniones β -(1-4), que se encuentra formando miofibrillas en la pared, siendo además importante en la morfogénesis fúngica. Su amplia distribución en muchos tipos de hongos, como miembros de Ascomycotina, Basidiomycotina, Zigomycotina, hongos

imperfectos y algunos Mastigomycotina, incluyendo algunos Oomycetes, lo hace un buen indicador de la presencia de los mismos (Cousin, 1995).

Los métodos para su detección incluyen un paso de clivaje de las uniones β -(1-4), ya sea por hidrólisis ácida, alcalina, o enzimática, los que producen respectivamente glucosamina, quitosano, o N-acetilglucosamina; y un paso de análisis de los productos de degradación por colorimetría o cromatografía.

El análisis de quitina ha sido utilizado para estimar la contaminación fúngica en tejidos vegetales, maderas, granos almacenados, y alimentos. En estos casos el contenido de quitina correlacionó con tasas de infección, niveles de patogenicidad y síntesis de aflatoxinas entre diferentes especies fúngicas y cepas, demostrando ser un método más rápido y preciso que otros métodos tradicionales como el conteo en placa (Cousin, 1995).

Un posible riesgo en usar glucosamina como medida del crecimiento fúngico sobre sustratos complejos, es su presencia en glucoproteínas de diferentes semillas. Sin embargo esto no interfiere con la determinación de la glucosamina total, ya que la cantidad presente es característica de cada especie y permanecerá constante a través de la fermentación (Aidoo, 1981).

La precisión de este método depende del establecimiento de un factor de conversión que permita relacionar glucosamina con el peso seco del micelio, para la estimación directa de biomasa.

Con este objetivo se desarrolló un método de cultivo del hongo sobre filtros Millipore, en placas de Petri con el mismo medio a utilizarse en FES (soja:afrechillo de arroz) pero agarizado, para la obtención de la biomasa del hongo sobre la que pudiera determinarse dicho factor sin interferencias del sustrato. En este caso, el valor de la masa seca correspondiente a cada tiempo de incubación, fue obtenido por secado de los filtros en estufa hasta peso constante, y el contenido de glucosamina a través de una hidrólisis ácida de este material y su posterior análisis colorimétrico.

A partir de estos datos se calculó la siguiente ecuación de regresión lineal (III.1):

$$(III.1) \quad G = 0,157 + 0,120 \cdot B$$

Donde:

G: glucosamina (mg)

B: biomasa, masa seca fúngica (mg)

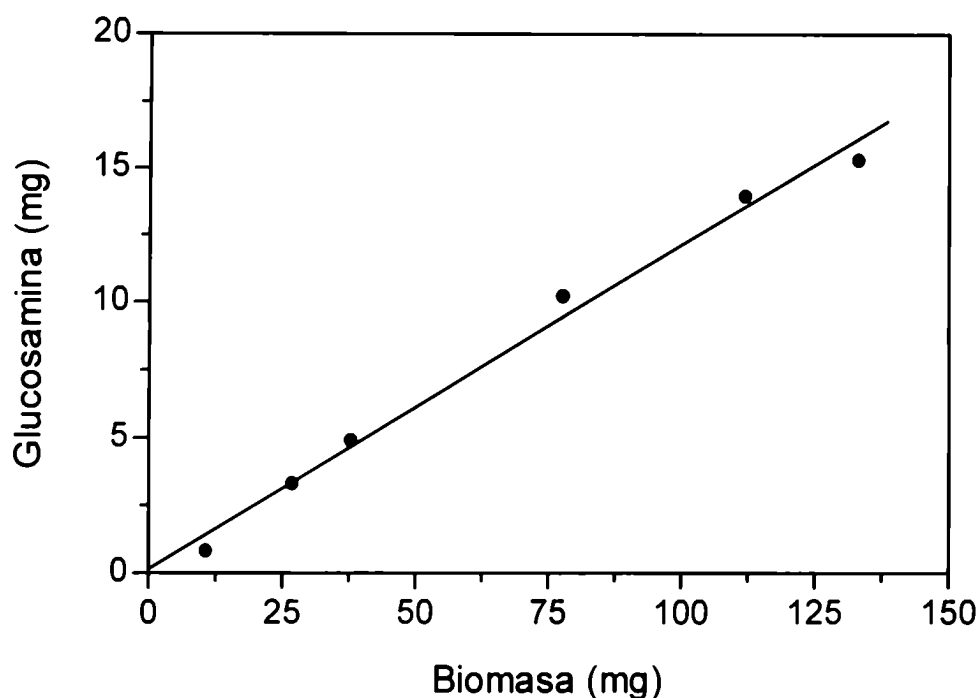


Figura III.1 : Correlación entre glucosamina y biomasa (masa seca) de *Aspergillus niger* 91.

En la **Figura III.1** se muestra el alto grado de correlación existente entre las variables: $R=0,995$ $p < 0,0001$, lo que asociado con el hecho que el contenido de glucosamina (mg/mg de masa seca), no muestra variación significativa durante el crecimiento, permite establecer que la biomasa fúngica en FES puede ser estimada usando la **ecuación (III.1)**.

Desgranges (1991) también observó que el contenido de glucosamina del hongo *Beauveria bassiana* sobre placas con medio agarizado, no variaba con la edad del cultivo. Sin embargo, Roche (1993) utilizando un método similar con hongos de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Gibberella* entre otros, encontró que el contenido de glucosamina estaba relacionado a la fase de crecimiento; pero que la utilización de una ecuación de regresión lineal como la aquí empleada permitió eliminar la variación con el tiempo del contenido de glucosamina y aumentar así la seguridad del método para la estimación de biomasa en FES.

Ambos autores coinciden en que el contenido de glucosamina es dependiente de los componentes del medio de cultivo, ya que obtuvieron diferencias al emplear fuentes orgánicas o inorgánicas de nitrógeno y carbono. La estimación del factor de conversión

de glucosamina a biomasa, debe realizarse en una condición lo más similar posible al cultivo en FES, previo a su aplicación sobre el soporte sólido, por lo que la utilización del mismo sustrato sólido en ambos sistemas aumenta la fiabilidad de la ecuación obtenida.

El hongo en sí mismo constituye una fuente de variabilidad. Distintas cepas de una misma especie creciendo sobre el mismo medio muestran un cierto rango de variabilidad en el valor del factor de conversión (mg glucosamina/mg biomasa): para *Trichoderma* varía de 0,068 a 0,093; para *Beauveria* de 0,055 a 0,085 y también entre distintas especies: *Fusarium oxysporum* 0,081, *Giberella fugikurof* 0,091 y *Aspergillus oryzae* cultivado sobre granos de arroz 0,075 (Roche, 1993; Okazaki, 1980), todos valores que se encuentran en el orden del estimado para la cepa *Aspergillus niger* 91 en este trabajo de 0,121 mg glucosamina/mg biomasa.

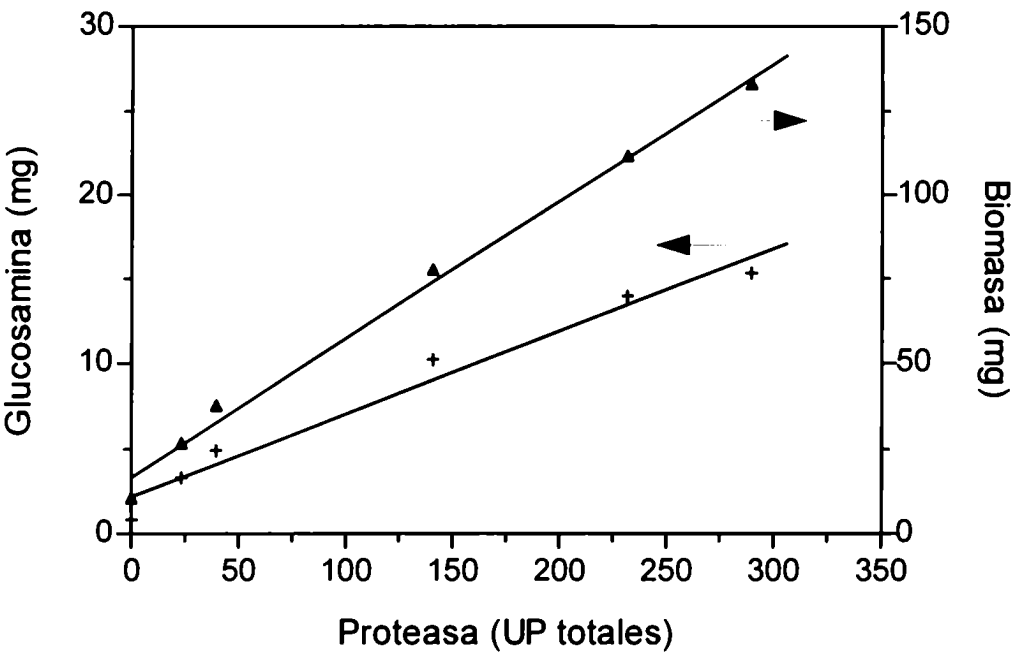


Figura III.2 : Correlación entre: + glucosamina y producción de proteasa; ▲ biomasa y producción de proteasa, de *Aspergillus niger* 91.

Al mismo tiempo se comprobó (**Figura III.2**) que la producción de proteasa ácida por dicha cepa creciendo sobre el filtro Millipore muestra alto grado de correlación con los valores correspondientes de biomasa ($R=0,997$ $p< 0,0001$), y de glucosamina ($R=0,985$

$p < 0,0003$). Esto evidencia la estrecha relación entre glucosamina y la actividad metabólica del hongo y por lo tanto con el crecimiento. Además la secreción del mismo tipo de enzima en placa de Petri y en koji, da mayor validez a la **ecuación (III.1)** para la calibración indirecta de biomasa ya que indica que fue obtenida en condiciones muy similares al crecimiento del hongo sobre el sustrato sólido.

En base a los resultados obtenidos se adoptó como metodología en la FES, la liofilización del contenido total de cada erlenmeyer con el fin de obtener el peso seco del sustrato fermentado, y luego de su molienda y homogeneización la determinación de glucosamina, para finalmente estimar la biomasa en cada caso mediante la **ecuación (III.1)**.

2. Cinética y modelado de la FES

Tanto el entendimiento como la aplicación de procesos de FES, se ven limitados por la escasez de información concerniente a la cinética y al modelado matemático del crecimiento microbiano. Esto se debe fundamentalmente a la complejidad de la interacción entre el micelio y el sustrato, a la heterogeneidad del sustrato y a la dificultad de obtener mediciones directas de biomasa (Mitchell 1992b).

Rodríguez León (1997) puntualizó la importancia de los estudios cinéticos dado que los mismos permiten:

- Determinar la velocidad específica de crecimiento: y en relación con esto la limitación de sustrato, la existencia de algún producto tóxico inhibidor del crecimiento, y la existencia de cambios repentinos en las condiciones de operación.

- Estimar el rendimiento y la productividad de la fermentación: permitiendo diferenciar un escaso crecimiento de una pobre productividad, lo que requiere una acción diferente en cada caso.

- Definir los criterios de control del proceso: como la adición de algún factor nutricional.

- Calcular el calor generado en el sistema.

- Identificar la fase de la fermentación: decidiendo la estrategia a seguir en cuanto a un metabolito específico, como por ejemplo su tiempo de cosecha.

- Generar los criterios de escalado.

Los modelos para describir el desarrollo microbiano pueden ser clasificados por el evento estudiado, el método de aproximación utilizado, o las variables consideradas.

Whiting (1993) propuso clasificarlos en tres niveles: primario, secundario y terciario.

Modelos del nivel primario describen cómo el número de microorganismos cambia con el tiempo en un medio específico. Incluye modelos de crecimiento y de inactivación/supervivencia. Los primeros abarcan desde estimaciones simples basadas sobre respuestas de crecimiento-no crecimiento, hasta tratamientos más complejos donde cada fase del ciclo de crecimiento es descripta cuantitativamente. Mediciones indirectas del microorganismo y productos metabólicos pueden también ser modelados.

Los modelos del nivel secundario indican cómo los parámetros de los modelos primarios cambian con respecto a uno o más factores ambientales o culturales (atmósfera, pH, temperatura, nivel de sal), e incluye ecuaciones de regresión polinomial múltiple, superficies de respuesta, relación de Arrhenius, y el modelo de raíz cuadrada de Bélehrádek.

Modelos del nivel terciario asisten en el uso de los niveles primario y secundario, identificando y usando la información pertinente para la visualización y cálculo de gráficos, predicciones y comparaciones deseados. Incluye expresiones matemáticas, paquetes de software, y sistemas expertos.

Incluida en el primer nivel descrito se encuentra la ecuación logística, ampliamente usada en biología, y propuesta por Okazaki (1980) para describir el crecimiento del micelio de *Aspergillus oryzae* sobre granos de arroz. Este modelo describe conjuntamente el crecimiento en fase logarítmica y estacionaria y está basado en el siguiente concepto: una determinada composición del medio puede producir una definida biomasa máxima, cuando la biomasa aumenta, la velocidad cae por la aparición de factores limitantes.

La expresión integrada de dicha ecuación es:

$$(III.2) \quad X_{(t)} = \frac{N}{1 + K \cdot e^{(-\mu \cdot t)}}$$

$$(III.3) \quad K = \frac{N}{x_0} - 1$$

$X_{(t)}$: biomasa al tiempo t (mg/g msk).
 x_0 : biomasa inicial (mg/g msk).
 N : biomasa máxima (mg/g msk).
 μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
 msk: masa seca koji.

Dicho modelo fue aplicado en este trabajo para describir la evolución de la biomasa en función del tiempo, así como también la producción de proteasa y conidios, y el consumo de sustrato, de la cepa *Aspergillus niger* 91 creciendo sobre soja:afrechillo de arroz y ante la variación de distintos parámetros ambientales.

Habitualmente en FES, cada variable puede ser referida al peso del koji seco (g msk) en cada tiempo como una expresión de concentración, o bien referida al sustrato sólido inicial utilizado (g SS₀) como una expresión del total de la variable obtenida. En este

trabajo los resultados serán expresados de ambas formas con la finalidad de su comparación con la bibliografía existente.

Si bien cada sistema microorganismo-sustrato es único y se debe considerar la relación entre las características físicas y químicas del sustrato, la fisiología del microorganismo a ser cultivado y la naturaleza del producto, existen ciertos parámetros ambientales como humedad, actividad de agua, pH, temperatura, niveles de oxígeno y concentración de nutrientes y productos que afectan significativamente el desarrollo de la FES.

Se analizó entonces el efecto de algunos de estos parámetros ambientales sobre la evolución de la fermentación.

2.1. Efecto del contenido de agua inicial

El desarrollo de la FES a lo largo del tiempo fue evaluado en un rango de contenido de agua inicial ($H_0\%$) entre 38% y 48%, al que corresponde una A_w entre 0,965 y 0,983 respectivamente, a T : 29°C, y pH_0 : 6 (pH del medio sin ajuste).

En las **Figuras III.3a-d** se muestra la evolución de la biomasa, proteasa y conidios a diferentes humedades, descripta a continuación.

La duración de las fases de crecimiento es similar a partir del 40% H_0 , siendo la fase lag: 10 horas, la fase exponencial y de desaceleración: de 10 a 75 horas, y la fase estacionaria: a partir de las 75 horas. La disminución del contenido de agua del sustrato (38%), si bien no afecta la fase lag, sí produce una fase exponencial y de desaceleración más larga y una fase estacionaria tardía a partir de las 115 horas.

La cinética de producción de la enzima tiene cierto retardo en el tiempo respecto de la biomasa, mostrando una asociación parcial con el crecimiento fúngico, siendo secretada al medio entre 50 y 70% de la producción total durante la fase exponencial y de desaceleración, y el resto en fase estacionaria.

En todos los casos la producción de la enzima es seguida por la inducción y desarrollo de la conidiación. Si bien la conidiación es aún más tardía que la producción de proteasa, el desarrollo del 30 al 70% de los conidios, sucede previamente a la fase estacionaria.

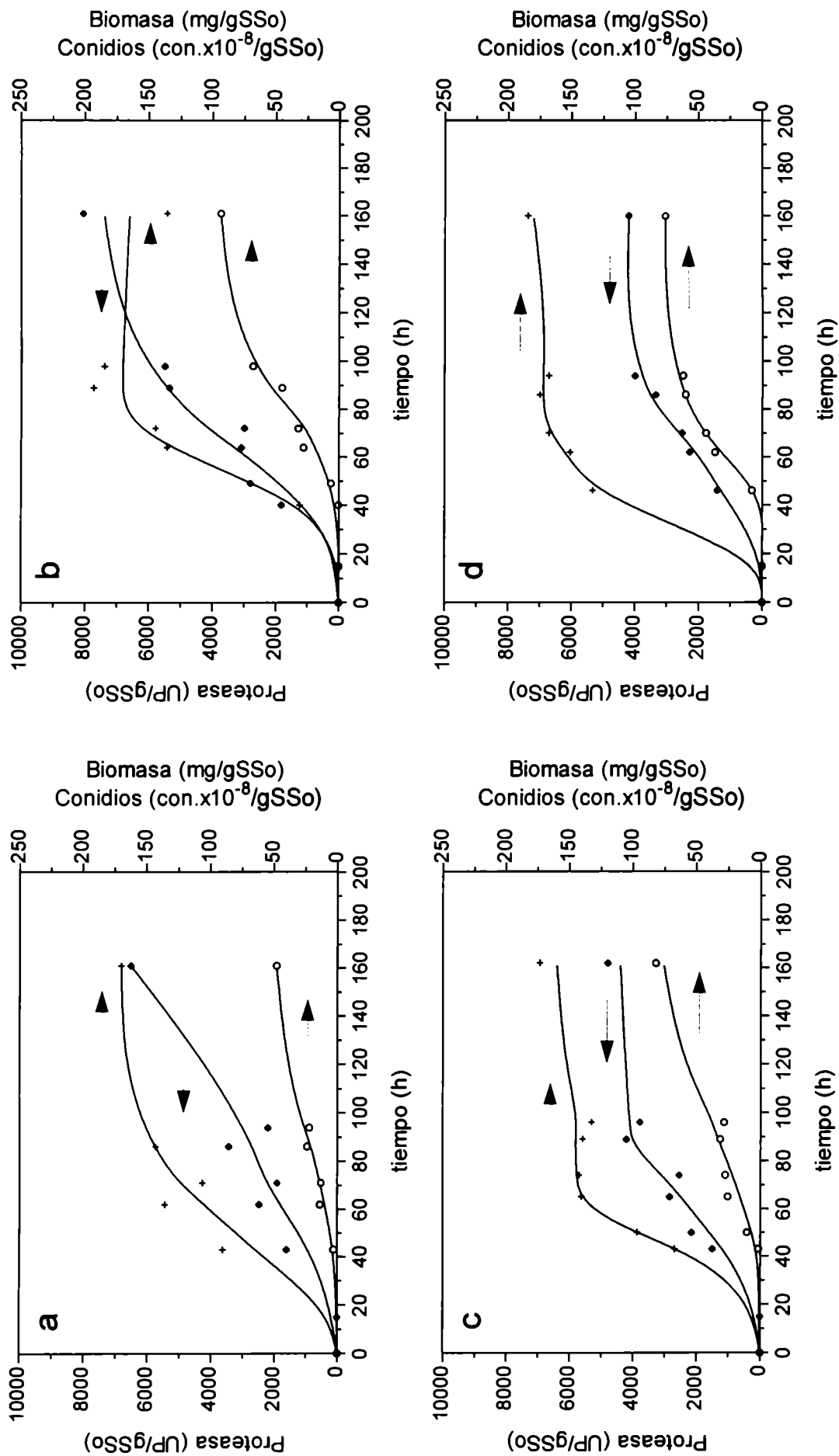


Figura III.3: Efecto del contenido de agua inicial sobre: + biomasa, ● producción de proteasa ácida, ○ conidiación.
H₀%: a) 38, b) 40, c) 44, d) 48. T: 29°C, pH₀: 6. Símbolos: datos experimentales promedio.

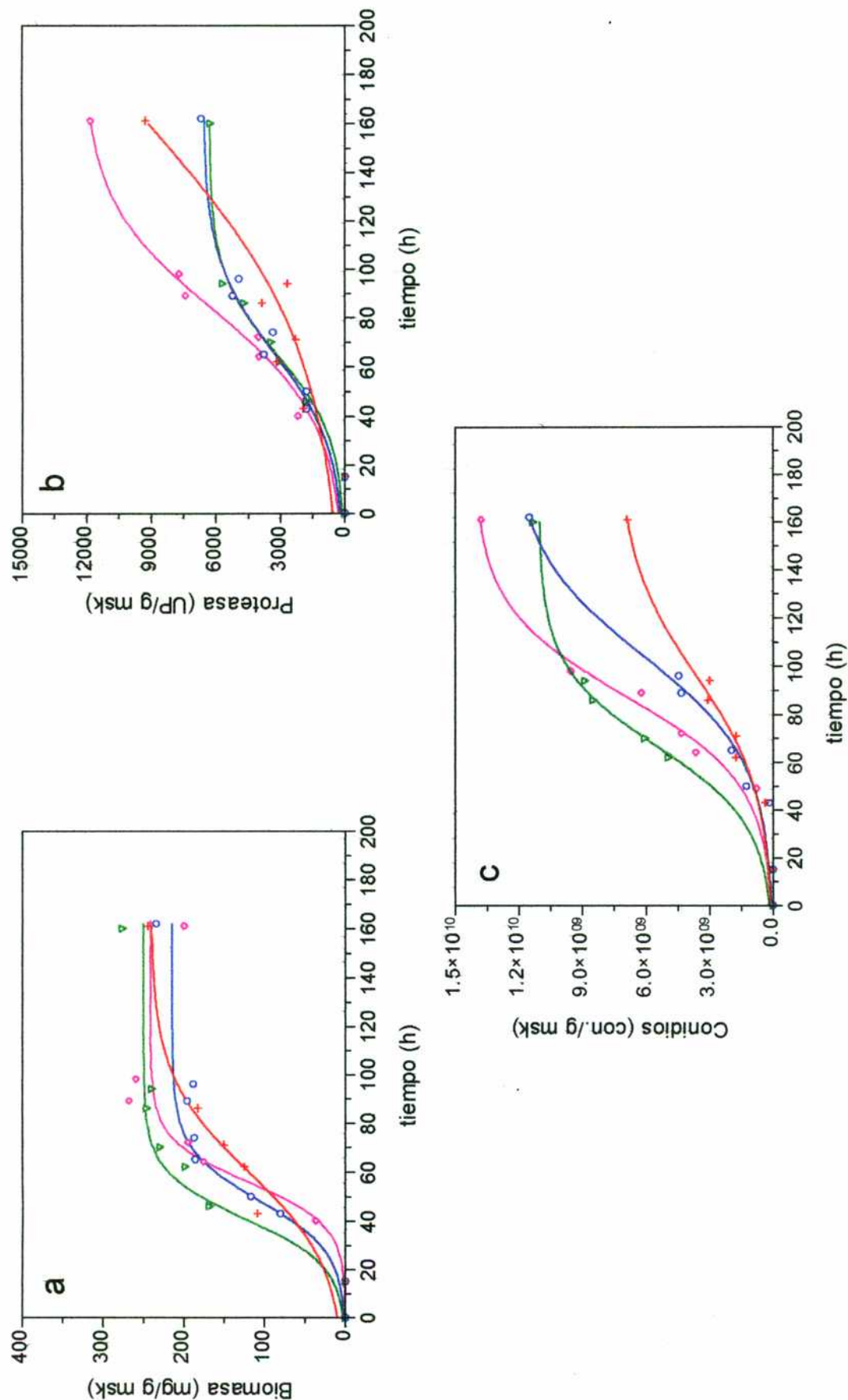


Figura III.4: Aplicación del modelo logístico sobre: a) biomasa, b) producción de proteasa ácida, c) conidiación.

Contenido de agua inicial %: + 38, $\diamond$ 40, $\square$ 44, ∇ 48. T: 29°C, pH₀: 6. Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: datos estimados por el modelo.

Tabla III.1: Efecto de variación del contenido de agua - A_w inicial, sobre los parámetros del modelo logístico.

		Contenido de agua - A_w inicial			
Parámetro		38% - 0,965	40% - 0,969	44% - 0,976	48% - 0,983
Biomasa	N_x (mg/g msk)	241 ± 16	241 ± 10	215 ± 7	250 ± 7
	μ_x (h ⁻¹)	0,052 ± 0,004	0,115 ± 0,005	0,096 ± 0,003	0,104 ± 0,005
Proteasa	R^2	0,951	0,957	0,977	0,976
	N_p (UP/g msk)	8944 ± 300	12210 ± 387	6610 ± 282	6333 ± 164
Conidios	μ_p (h ⁻¹)	0,021 ± 0,002	0,044 ± 0,001	0,051 ± 0,002	0,060 ± 0,001
	R^2	0,932	0,986	0,974	0,988
	N_c (con/g msk)	(0,74 ± 0,03).10 ¹⁰	(1,41 ± 0,04).10 ¹⁰	(1,23 ± 0,03).10 ¹⁰	(1,10 ± 0,04).10 ¹⁰
	μ_c (h ⁻¹)	0,041 ± 0,001	0,054 ± 0,001	0,046 ± 0,001	0,060 ± 0,001
	R^2	0,981	0,986	0,993	0,986

En todos los casos: p<0,0001 ; valor parámetro ± error estándar ; n: 11-16.
msk: masa seca koji ; UP: unidad proteásica, con: número de conidios.

En las **Figuras III.4a-c**, se muestra el ajuste de la ecuación logística a la evolución de la biomasa, producción de proteasa y conidios. En este caso como ya fue mencionado, se representa la “concentración” de cada variable en base a la masa de koji seco (msk), expresión habitualmente utilizada (Ramesh, 1990; Sargantanis, 1993).

En todos los casos el modelo predijo satisfactoriamente los datos observados. El estadístico R^2 (indicativo de la calidad del ajuste), varió entre 0,951 y 0,977 para biomasa; 0,932 y 0,988 para producción de proteasa y entre 0,981 y 0,993 para producción de conidios (**Tabla III.1**).

Analizando en la **Tabla III.1** las modificaciones en los máximos (N) y velocidades específicas (μ) estimados, debidas a la variación del contenido de agua inicial del sustrato, se detecta la existencia de un punto crítico en 40% H_0 . El incremento de H_0 desde 38 a 40% causa un aumento abrupto en las velocidades específicas de crecimiento y producción de proteasa, y un menor efecto en la de conidiación.

Observando tanto los máximos obtenidos por el modelado logístico (**Tabla III.1**), como los máximos valores experimentales en un rango más amplio de H_0 (**Figuras III.5a-b**) se puede concluir que entre 38 y 48% H_0 (lo que corresponde a un rango de A_w entre 0,965 y 0,983), los máximos valores obtenidos de biomasa no presentan diferencia significativa. Sin embargo los correspondientes a proteasa y conidios tienen un óptimo a 40% H_0 , pero siendo afectados de modo diferente por una ulterior disminución o aumento de la humedad: incrementos del contenido de agua causan mayor reducción en los máximos de proteasa que su disminución, mientras que en la conidiación se produce el efecto inverso. Una mayor reducción de H_0 a 31% (A_w 0,95) causa una disminución significativa de la biomasa y de la producción de proteasa y conidios.

Soccol (1995) evaluó el crecimiento de *Rhizopus oryzae* sobre bagazo de mandioca con un contenido de agua de 50% a 80%, encontrando las condiciones óptimas para el mismo y la mayor velocidad de crecimiento a un 70% H_0 . Narahara (1982) observó un incremento continuo de biomasa de *Aspergillus oryzae* sobre granos de arroz cuando el contenido de humedad varió de 25,6% a 40,3%.

Cada sistema microorganismo-sustrato tiene un óptimo de contenido de agua para el crecimiento, sin embargo estos valores son sólo comparables en sistemas similares, ya que el agua disponible dependerá de las propiedades de sorción de cada sustrato.

Optimos de crecimiento a valores superiores a 0,99 de actividad de agua fueron descriptos para *Trichoderma viride* sobre pulpa de remolacha (Grajek, 1987), y para *Rhizopus oligosporus* sobre soja agarizada (Sarrete, 1992). En cambio en el sistema de FES aquí en estudio, a valores de A_w levemente superiores a 0,983 ya se detecta agua libre no retenida por el sustrato.

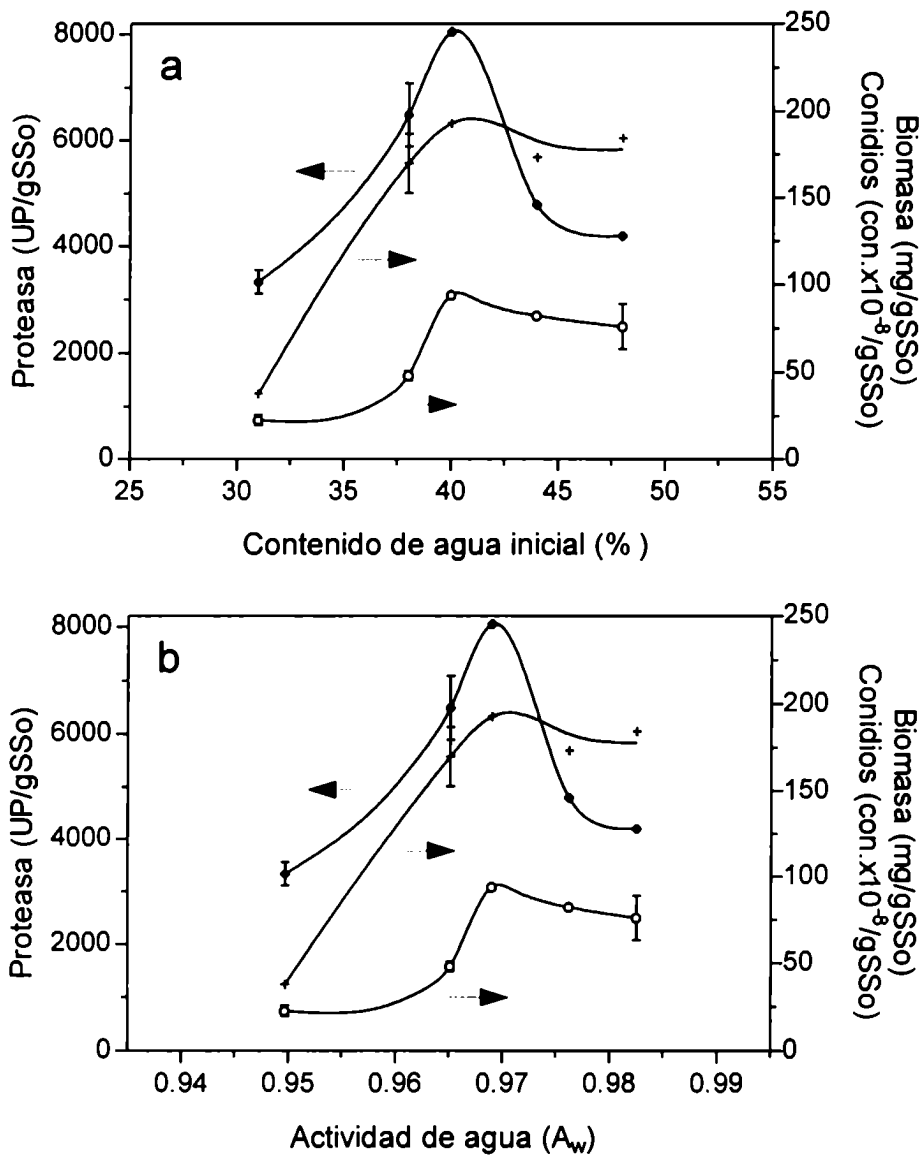


Figura III.5: Efecto de variación del contenido de agua (a) y A_w (b) iniciales, sobre los máximos experimentales de:
+ biomasa, ◆ producción de proteasa ácida, O conidiación.

De modo semejante a lo observado para *Aspergillus niger* 91, la reducción de la fase lag y el aumento de la velocidad de crecimiento y la biomasa fueron inducidos por el incremento del A_w del medio de 0,90 a 0,97 para *Aspergillus flavus* creciendo sobre granos de cebada (Ramakrishna, 1993), y de 0,93 a 0,98 para *Aspergillus niger* sobre mandioca (Oriol, 1988), obteniéndose en este último caso valores de biomasa del orden de los del sistema en estudio.

La sensible variación de la producción de proteasa por *Aspergillus niger* 91 con la humedad inicial del sustrato es similar a lo observado en otras fermentaciones donde hay una condición óptima fuera de la cual disminuye la enzima producida. Máximos de producción se encontraron a 60% H_0 para proteasa de *Aspergillus oryzae* CFTRI1480 creciendo sobre salvado de trigo (Padmanabhan, 1993); 35-40% H_0 (A_w 0,982-0,986) para *Aspergillus oryzae* NRRL2160 sobre un medio con cascarilla y afrechillo de arroz (Battaglino, 1991) ; 35% H_0 (A_w 0,966) para proteasa ácida de *Aspergillus oryzae* WO3 sobre granos de arroz (Narahara 1982) y 50% H_0 (A_w 0,98) para proteasa ácida de *Aspergillus niger* sobre residuos de batata (Yang, 1986). Así como en nuestro sistema de fermentación , en los trabajos mencionados el A_w óptimo para la producción de la enzima es igual o inferior al óptimo para el crecimiento del hongo.

Una secreción más lenta de la proteasa ácida de *Aspergillus niger* 91 a contenidos de agua inferiores al óptimo (Tabla III.1), puede ser debida tanto a menores velocidades de crecimiento como de síntesis de la enzima en sí misma (Ramesh, 1990).

La esporulación de *Aspergillus niger* 91 fue favorecida en un rango de A_w de 0,97 a 0,983 (40 a 48% H_0) en forma similar al crecimiento. En un cultivo de *Beauveria bassiana*, sobre harina de papa se observó un máximo de $5,43 \cdot 10^9$ esporas/g SS₀ a 50% H_0 (Ayala, 1996). Rangos óptimos de esporulación coincidentes con el de crecimiento fueron reportados para *Verticillium lecanii* entre A_w 0,99-1 sobre salvado de trigo y pulpa de remolacha, alcanzando valores de $3,2 \cdot 10^9$ esporas/g SS₀ (Grajek, 1994); para *Aspergillus flavus* y *Penicillium verrucosum* a A_w 0,97 sobre granos de cebada (Ramakishna, 1993) y para *Metarhizium anisopliae* a A_w 0,982 sobre salvado de trigo y a A_w 0,997 sobre afrechillo de arroz-cascarilla de arroz (Dorta, 1994).

Grajek (1987) si bien observó que un rango de A_w entre 0,975 y 0,986 favorecía la esporulación de *Trichoderma viride* sobre pulpa de remolacha, éste era un poco inferior al óptimo observado para el crecimiento del micelio (0,99 a 0,992).

Los resultados aquí obtenidos indican la importancia del control del contenido de agua como parámetro limitante en el proceso de FES.

La existencia de un óptimo del contenido de agua donde tanto la actividad metabólica como la síntesis de proteasa ácida son máximas, es debida a un balance entre la influencia del agua y/o A_w sobre el propio metabolismo del hongo y sobre las propiedades físicas del sistema. Contenidos de agua altos llevan a una disminución de la porosidad, progresiva aglomeración y pérdida de la estructura particulada del sustrato, reducción del volumen y del intercambio de gases, decrecimiento de la transferencia de oxígeno por la escasa difusión y aumento de formación de micelio aéreo. Por el contrario una baja humedad lleva a la reducción de la solubilidad de los nutrientes presentes en el sustrato sólido y del hinchamiento del mismo disminuyendo por lo tanto la accesibilidad del microorganismo a dichos nutrientes (Ramesh, 1990).

2.2. Efecto del pH inicial

Teniendo en cuenta observaciones previas acerca de la estimulación de la producción de proteasas ácidas en *Aspergillus* por el crecimiento a bajos valores de pH (Aunstrup, 1980), se ajustó el pH inicial (pH_0) de la fermentación, a valores inferiores a 6 (pH del medio sin ajuste). Las condiciones de fermentación fueron: pH_0 : 6; 5,4 y 4,4, H_0 : 40%, T: 29°C. El seguimiento en el tiempo de las variables de la FES se hizo en todas estas condiciones de fermentación y se muestra en las **Figuras III.6a-c**.

El descenso del pH_0 del cultivo es acompañado por un incremento gradual de la fase lag: de 10 horas (pH_0 6) a 30-40 horas (pH_0 4,4). También esto afecta la duración de la fase exponencial y de desaceleración de 10 a 75 horas para pH_0 6 y de 30-40 a 130 horas para pH_0 4,4, entrando luego en fase estacionaria.

La secreción de la enzima al medio se asocia más estrechamente al crecimiento a medida que cae el pH inicial, siendo liberada desde un 50% (pH_0 6) hasta el 100% (pH_0 4,4), previamente a la fase estacionaria.

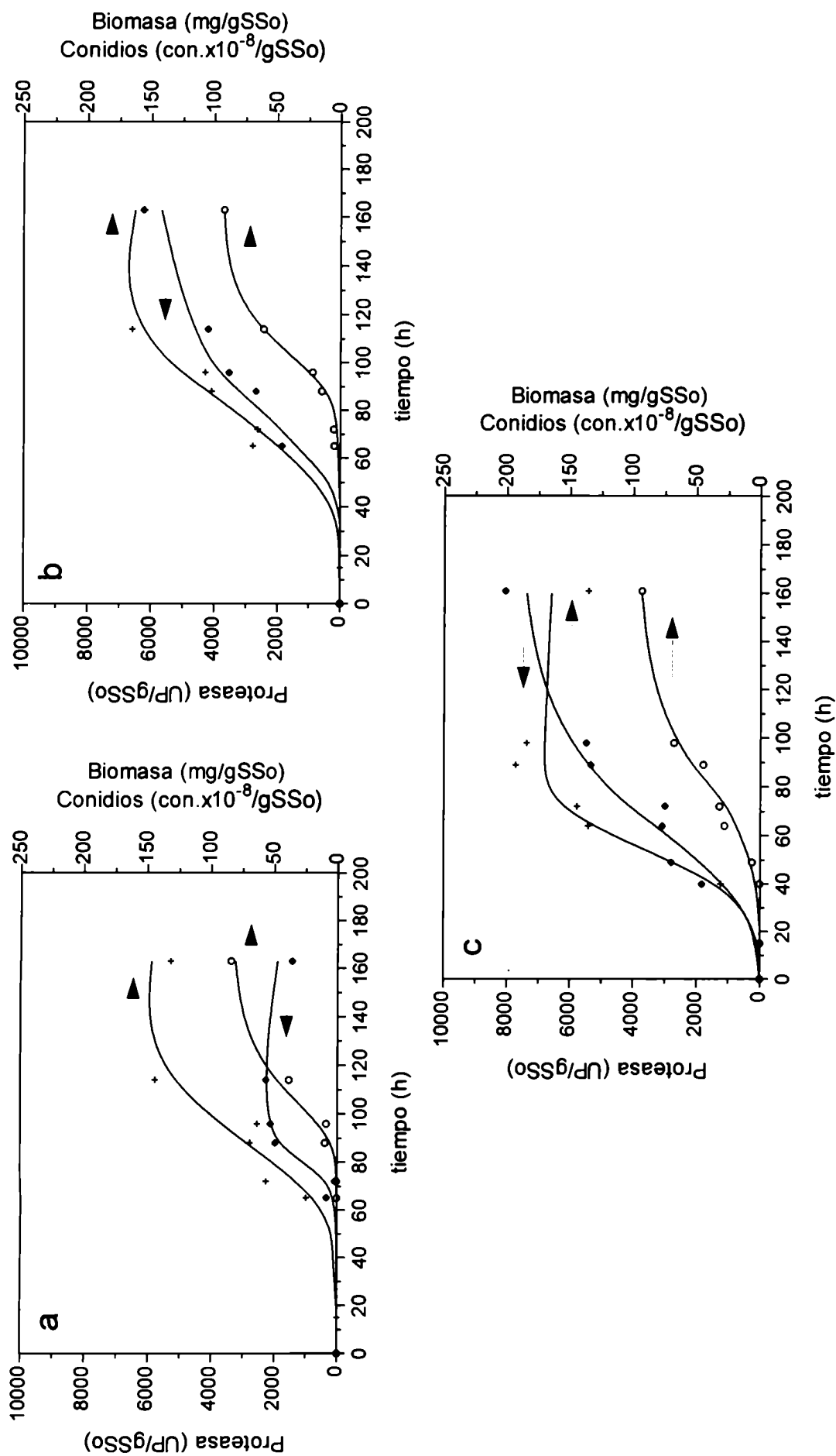


Figura III.6: Efecto del pH inicial sobre: + biomasa, ◆ producción de proteasa ácida, O conidiación. pH₀: a) 4,4 ; b) 5,4 ; c) 6. T: 29°C, H₀%: 40. Símbolos: datos experimentales promedio.

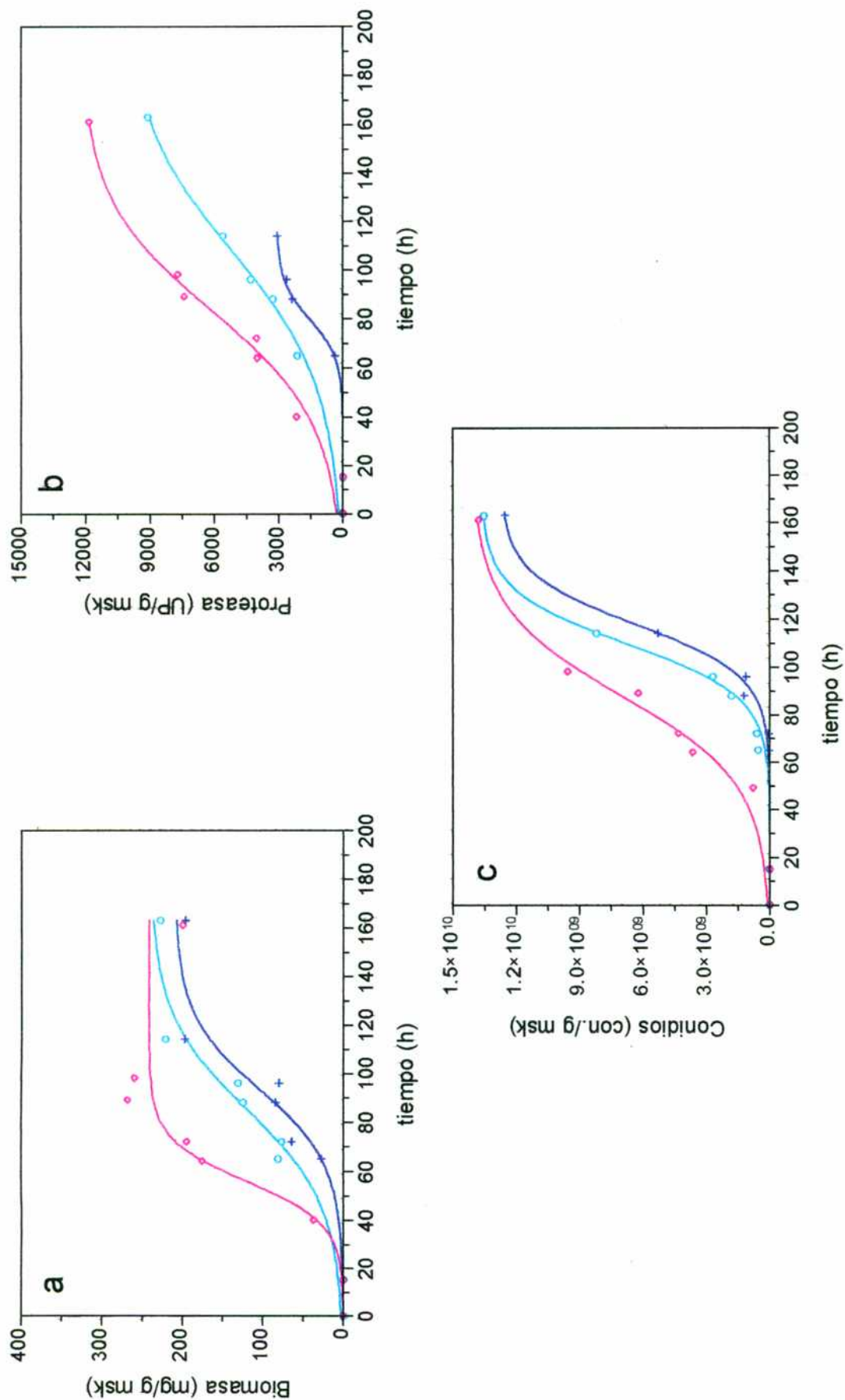


Figura III.7: Aplicación del modelo logístico sobre: a) biomasa, b) producción de proteasa ácida, c) conidiación. pH inicial: + 4,4 ; ◇ 5,4 ; ○ 6. T: 29°C, H₀%: 40. Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: datos estimados por el modelo.

La conidiación aunque desplazada en el tiempo, acompaña a la producción de la enzima en todas las condiciones. La aparición de conidios en el medio durante la fase exponencial y de desaceleración aumenta de 40% a 80% del total, con la reducción del pH₀.

En las Figuras III.7a-c, se observan los valores experimentales y los estimados por el modelo logístico de la biomasa, producción de proteasa y conidios.

En todos los casos existió buen ajuste al modelo; variando R² entre 0,937 y 0,97 para biomasa, y entre 0,986 y 0,998 para la enzima y la conidiación (Tabla III.2).

Tabla III.2: Efecto de variación del pH inicial, sobre los parámetros del modelo logístico.

		pH inicial		
Parámetro		4,4	5,4	6
Biomasa	N _x (mg/g msk)	209 ± 13	240 ± 10	241 ± 10
	μ _x (h ⁻¹)	0,065 ± 0,002	0,051 ± 0,001	0,115 ± 0,005
	R ²	0,937	0,970	0,957
Proteasa	N _p (UP/g msk)	3088 ± 39	10286 ± 285	12210 ± 387
	μ _p (h ⁻¹)	0,127 ± 0,001	0,036 ± 0,001	0,044 ± 0,001
	R ²	0,998	0,995	0,986
Conidios	N _c (con/g msk)	(1,27 ± 0,02).10 ¹⁰	(1,37 ± 0,01).10 ¹⁰	(1,41 ± 0,04).10 ¹⁰
	μ _c (h ⁻¹)	0,094 ± 0,001	0,090 ± 0,001	0,054 ± 0,001
	R ²	0,997	0,998	0,986

En todos los casos: p< 0,0001 ; valor parámetro ± error estándar ; n: 11-16.
msk: masa seca koji ; UP: unidad proteásica, con: número de conidios.

La caída del pH inicial a 5,4 reduce las velocidades de crecimiento y producción de enzima. Un descenso mayor a 4,4, produce un incremento notable en la fase lag, produciéndose sin embargo un nuevo aumento en dichas velocidades una vez que el hongo logró adaptarse al ambiente. En cambio la velocidad de conidiación es potenciada por debajo de pH₀ 6.

Analizando tanto los máximos predichos (Tabla III.2), como los experimentales en la Figura III.8 se concluye que el descenso del pH inicial del cultivo no modifica significativamente los máximos correspondientes al crecimiento y conidiación (la

biomasa total se reduce sólo un 15% a pH 4,4); disminuyendo en cambio progresivamente los correspondientes a la producción de proteasa, especialmente a pH 4,4 donde cae en un 70%.

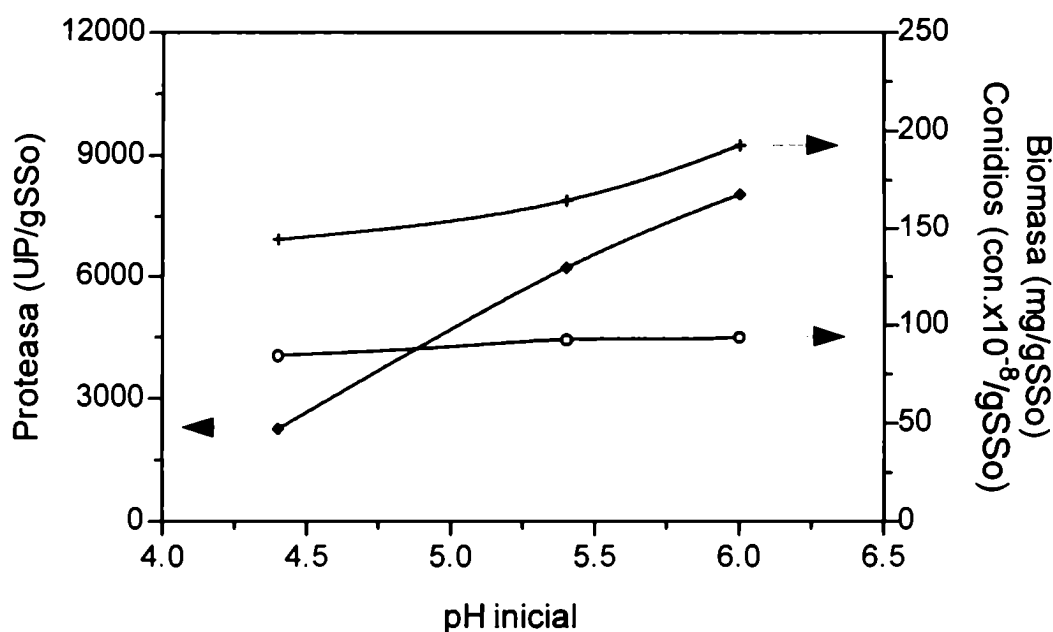


Figura III.8: Efecto de variación del pH inicial sobre los máximos experimentales de:
+ biomasa, ◆ producción de proteasa ácida, O conidiación.

Debido a las dificultades de control de pH en FES, es preferible que el microorganismo a ser utilizado tenga un amplio rango de pH óptimo para el crecimiento. Los hongos filamentosos crecen bien en un rango de pH de 2 a 9 con un óptimo entre 3,8 y 6. Sin embargo se encuentran variaciones relacionadas a la composición del sustrato y al microorganismo en sí (Prior, 1992).

Soccol (1995) observó un óptimo crecimiento de *Rhizopus oryzae* a pH 7, con escasa reducción del mismo ante la acidificación del medio hasta pH 4,7 en el proceso de biotransformación de bagazo de mandioca.

Como fue observado para *Aspergillus niger* 91, el rango óptimo de pH para crecimiento y formación de producto puede diferir considerablemente. De modo similar Yang (1986) observó que mientras una cepa de *Aspergillus niger* mostraba buen desarrollo entre pH 3,1 y 7,1 sobre residuos de batata, más estrecho era el rango óptimo para la producción

de proteasa entre 3,5 y 4,3 (siendo estos últimos valores inferiores a los aquí observados).

Máximos de producción de proteasa cercanos a pH 6 y con disminución de la enzima ante la caída del pH fueron reportados para *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* C en FES sobre salvado de trigo (Padmanabhan, 1993; Fiedurek, 1989).

Máximos de esporulación en el rango de pH 6 fueron reportados para otros hongos filamentosos: *Penicillium oxalicum* en cultivo sumergido y *Beauveria bassiana* en FES sobre harina de residuos de papa, sin embargo en estos casos, la acidificación del medio hasta pH 4 reduce significativamente la producción de esporas (Pascual, 1997; Ayala, 1996).

El efecto de la evolución del pH sobre las distintas variables de la FES será analizado en extenso más adelante.

2.3. Efecto de la temperatura de fermentación

El efecto de la temperatura (T), sobre las distintas variables de la FES se estudió en el rango 29°C - 45°C y a una H₀ de 40%, pH₀ 6 (sin ajuste), realizándose los estudios cinéticos sólo a 29°C y 37°C. En las **Figuras III.9a-b** se muestra la evolución de la biomasa, proteasa y conidios a estas dos temperaturas.

Con el aumento de la temperatura en este rango, se reduce levemente la fase lag, y se prolonga la fase exponencial y de desaceleración, entrando en fase estacionaria más tardíamente, de las 80 horas a 29°C a 100-110 horas a 37°C.

Tanto el crecimiento como la producción de proteasa son superiores a 37°C, durante todo el tiempo de fermentación. La asociación entre ambas variables se estrecha a esta temperatura de fermentación, ya que la proporción de la enzima total secretada durante la fase exponencial y de desaceleración pasa del 50% a 29°C, a valores superiores al 90% a 37°C, siendo el resto liberado en fase estacionaria.

En ambos casos la conidiación sigue más tardíamente a la producción de la enzima. Coincidiendo con la liberación de ésta en el tiempo, durante la fase exponencial y de desaceleración se desarrollan un 40% del total de conidios en el medio a 29°C y casi un 90% a 37°C.

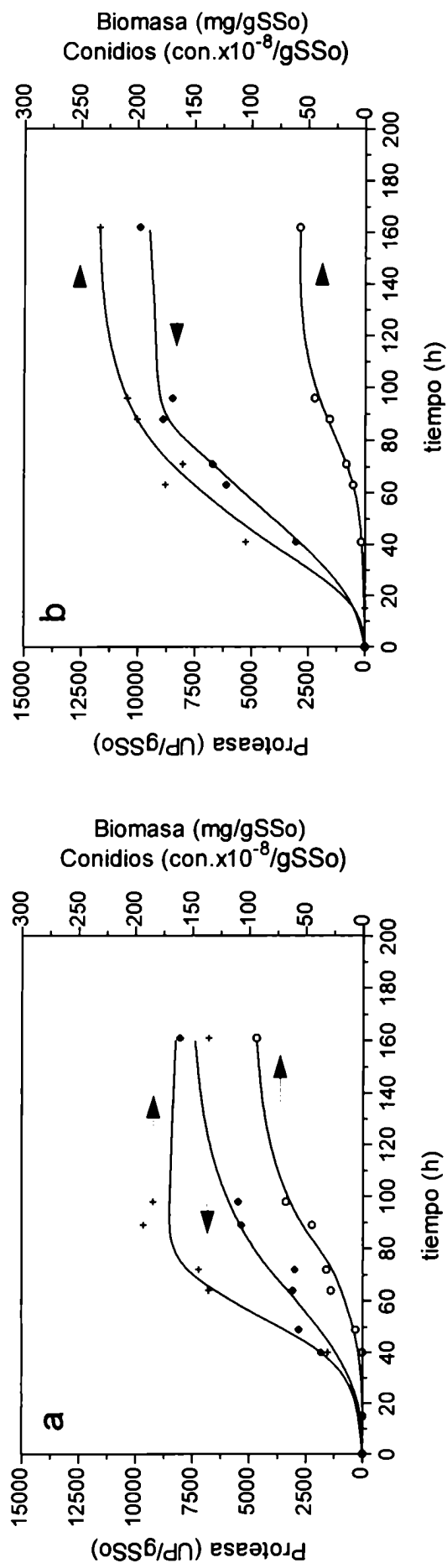


Figura III.9: Efecto de la temperatura sobre: + biomasa, ◆ producción de proteasa ácida, O conidiación.
T °C: a) 29, b) 37. H₀%: 40, pH₀: 6. Símbolos: datos experimentales promedio.

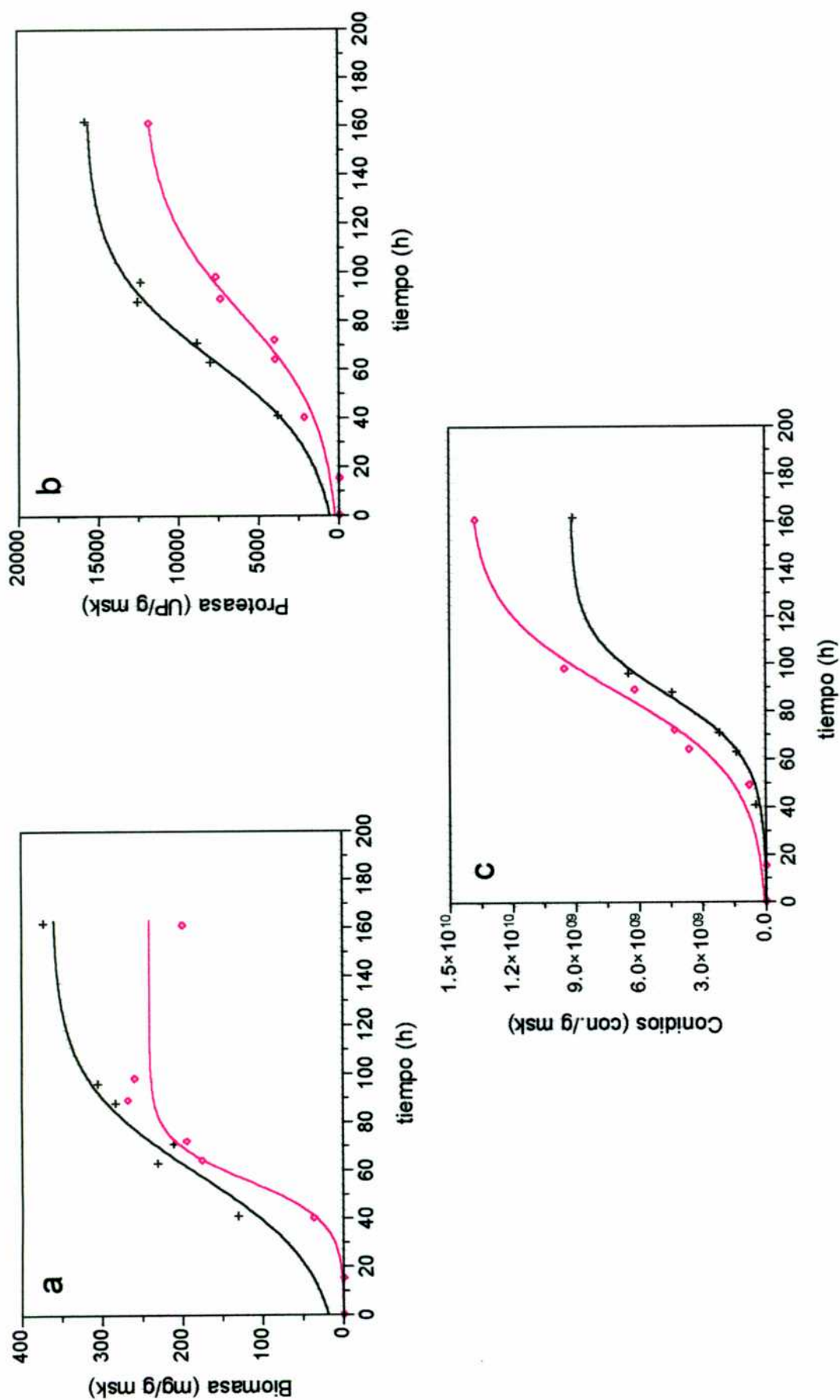


Figura III.10: Aplicación del modelo logístico sobre: a) biomasa, b) producción de proteasa ácida, c) conidiación.

Temperatura °C: ◇ 29, + 37. $H_0\%$: 40, pH_0 : 6. Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: datos estimados por el modelo.

En las Figuras III.10a-b se observan los valores experimentales y predichos por la aplicación de la ecuación logística a distintas variables de la FES.

Tabla III.3: Efecto de variación de la temperatura, sobre los parámetros del modelo logístico.

		Temperatura	
Parámetro		29°C	37°C
Biomasa	N _x (mg/g msk)	241 ± 10	361 ± 16
	μ _x (h ⁻¹)	0,115 ± 0,005	0,050 ± 0,002
	R ²	0,957	0,965
Proteasa	N _p (UP/g msk)	12210 ± 387	15717 ± 359
	μ _p (h ⁻¹)	0,044 ± 0,001	0,050 ± 0,001
	R ²	0,986	0,990
Conidios	N _c (con/g msk)	(1,41 ± 0,04).10 ¹⁰	(0,92 ± 0,02).10 ¹⁰
	μ _c (h ⁻¹)	0,054 ± 0,001	0,076 ± 0,001
	R ²	0,986	0,992

En todos los casos: p< 0,0001 ; valor parámetro ± error estándar ; n: 11-16.
msk: masa seca koji ; UP: unidad proteásica, con: número de conidios.

El ajuste al modelo fue satisfactorio, con valores de R² variando entre 0,957 y 0,992 para todas las variables analizadas (Tabla III.3). Se observa también que el incremento de la temperatura de fermentación de 29°C a 37°C, reduce aproximadamente a la mitad la velocidad de crecimiento, siendo aumentadas las de producción de enzima y conidiación.

Analizando tanto los máximos estimados por el modelo (Tabla III.3) como los máximos valores experimentales en un rango más amplio de temperatura (29-45°C) integrados en la Figura III.11 se puede concluir que el aumento de temperatura de 29°C a 37°C causa un significativo incremento de los valores máximos de biomasa y proteasa (20-25%), disminuyendo sin embargo el máximo de conidios alcanzado en un 40%. Un ulterior aumento a 45°C causa escaso desarrollo de micelio casi sin conidiación, con una mínima producción de la enzima.

La reducción de la fase lag con el aumento de la temperatura de fermentación, el óptimo crecimiento entre 35°C y 40°C, y la disminución del mismo a temperaturas mayores ya

han sido mencionados para *Aspergillus niger* en FES (Raimbault, 1980; Gonzalez, 1988).

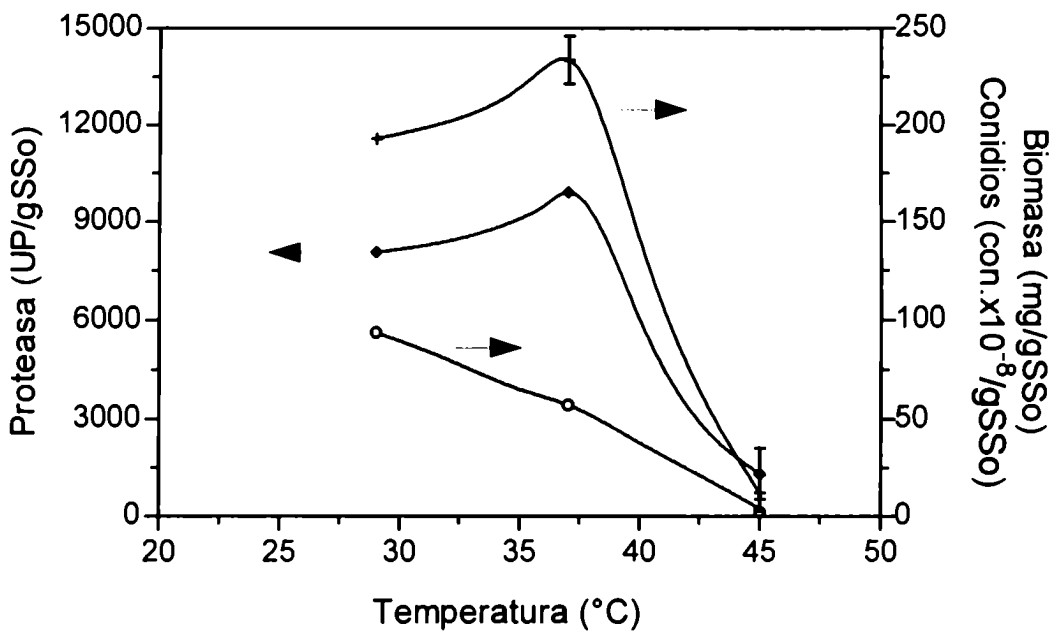


Figura III.11: Efecto de variación de la temperatura sobre los máximos experimentales de: + biomasa, ◆ producción de proteasa ácida, O conidiación.

Smits (1998) constató la dependencia de la velocidad de crecimiento con la temperatura para *Trichoderma viride* sobre salvado de trigo, observando decrecimiento de la misma a temperaturas mayores de 34°C, lo que coincide con lo observado para *Aspergillus niger* 91. En el sistema aquí estudiado un crecimiento más lento a 37°C no impide alcanzar mayor desarrollo de biomasa.

Las óptimas temperaturas para crecimiento y formación de producto no son siempre similares como en este caso. Diferentes hongos filamentosos en FES mostraron máxima producción de proteasa ácida hasta los 30°C siendo estas temperaturas inferiores al óptimo de crecimiento (Wang, 1974; Narahara, 1982; Yang, 1986). En cambio Malathi (1991) observó conjuntamente mayor crecimiento y producción de proteasa superando los 30°C de temperatura para *Aspergillus flavus* creciendo sobre salvado de trigo.

Efectos similares de la temperatura sobre la esporulación a los aquí analizados, fueron reportados en FES. Así se han encontrado máximos valores de conidiación hasta 30°C

para *Aspergillus flavus* sobre granos de cebada y *Beauveria bassiana* sobre harina de residuos de papa, siendo también en este último caso reducida significativamente la esporulación por incubación a 37°C (Ramakrishna, 1993; Ayala, 1996).

Una de las diferencias esenciales entre la fermentación sólida y la líquida es la condición no isotérmica de la primera. La tasa de generación de calor a altos niveles de actividad metabólica puede no ser suficientemente disipada por la evaporación de agua y conducción a través del medio sólido, generando gradientes térmicos que lleven a subóptimas condiciones para formación de biomasa o producto. Por estas causas es que resulta esencial la descripción de la influencia de la temperatura en la cinética del microorganismo en FES (Smits, 1998).

3. Evolución del peso seco y consumo de sustrato

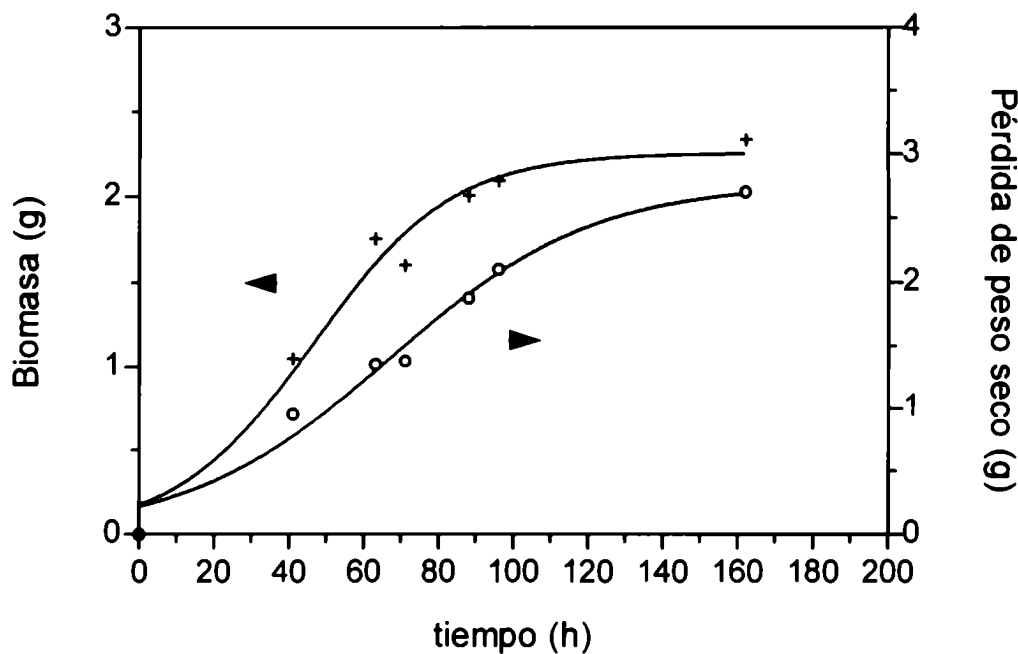


Figura III.12: Evolución de la biomasa (+) y la pérdida de peso seco (O) de la fermentación. T: 37°C, H₀: 40%, pH₀: 6. Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: datos estimados por el modelo logístico.

Durante el proceso aeróbico de fermentación en sustrato sólido, el consumo de sustrato es acompañado por la pérdida de peso seco del material fermentado.

La pérdida de peso seco del sistema se puede definir como (basado en Dorta, 1994 y 1996):

$$(III.4) \quad \Delta Ps_{(t)} = Ps_{(0)} - Ps_{(t)}$$

$\Delta Ps_{(t)}$: pérdida de peso seco (g).
 $Ps_{(0)}$: peso seco inicial (g).
 $Ps_{(t)}$: peso seco a tiempo t (g).
 ΔO_2 : oxígeno incorporado al sistema (g)
 $(H_2O)_h$: agua incorporada al sistema por hidrólisis del sustrato (g).
 ΔCO_2 $(H_2O)_m$ y ΔV : CO_2 , agua y metabolitos volátiles generados por metabolización del sustrato (g).

$$(III.5) \quad \Delta Ps_{(t)} = \Delta CO_2 - \Delta O_2 + (H_2O)_m - (H_2O)_h + \Delta V$$

Por lo tanto dicha pérdida a lo largo de la fermentación es dependiente de la actividad metabólica del hongo; siendo la resultante de un balance entre el aumento de peso debido a la biomasa y al agua incorporada por la hidrólisis de biopolímeros, y la disminución debida a la producción de agua por metabolismo del sustrato, y la eliminación de CO₂ y productos volátiles (siendo estos últimos considerados despreciables).

La **Figura III.12** muestra la evolución paralela de la biomasa y la pérdida de peso seco en las condiciones óptimas para la producción de la enzima. El modelo logístico describe adecuadamente la variación de $\Delta Ps_{(t)}$ (R^2 : 0,975; $p < 0,0001$), siendo aún mayor el ajuste en las restantes condiciones de fermentación (R^2 : de 0,983 a 0,999). La correlación en las condiciones óptimas, entre la producción de biomasa y la pérdida de peso seco es alta (R : 0,98; $p < 0,0001$) y puede ser descripta por la siguiente ecuación:

$$(III.6) \quad B = 0,173 + 0,929 \cdot \Delta Ps$$

B: biomasa total (g). ΔPs : pérdida de peso seco (g).
--

Asimismo se investigó la correlación entre la producción de proteasa y la pérdida de peso seco, resultando también elevada (R : 0,97; $p < 0,0001$) respondiendo a la siguiente ecuación:

$$(III.7) \quad UP = 3028 + 37413 \cdot \Delta Ps$$

UP: proteasa (unidades totales). ΔPs : pérdida de peso seco (g).

Ambas correlaciones se observan en la **Figura III.13**.

Smits (1998) también describió la correlación existente entre liberación de CO₂ y pérdida de peso seco en un cultivo de *Trichoderma reesei* sobre salvado de trigo, siendo esta relación independiente de las condiciones de cultivo.

Terebiznik (1999) a través del modelado de la pérdida de peso seco de *Aspergillus oryzae* creciendo sobre salvado de trigo, obtuvo parámetros cinéticos similares a los calculados con la aplicación del modelo logístico sobre la biomasa, siendo de este modo evitable efectuar mediciones rutinarias de glucosamina.

Ambos autores observaron una pérdida de peso seco respecto del inicial de 20% y 37% respectivamente, siendo la misma de un 31% en el sistema aquí estudiado.

Las correlaciones observadas en este sistema de FES para *Aspergillus niger* 91 descritas por las **ecuaciones (III.6) y (III.7)** permiten estimar la biomasa y proteasa producidas, a través únicamente de la medición de la pérdida de peso seco y así determinar estrategias a seguir como por ejemplo el momento adecuado de cosecha de la enzima.

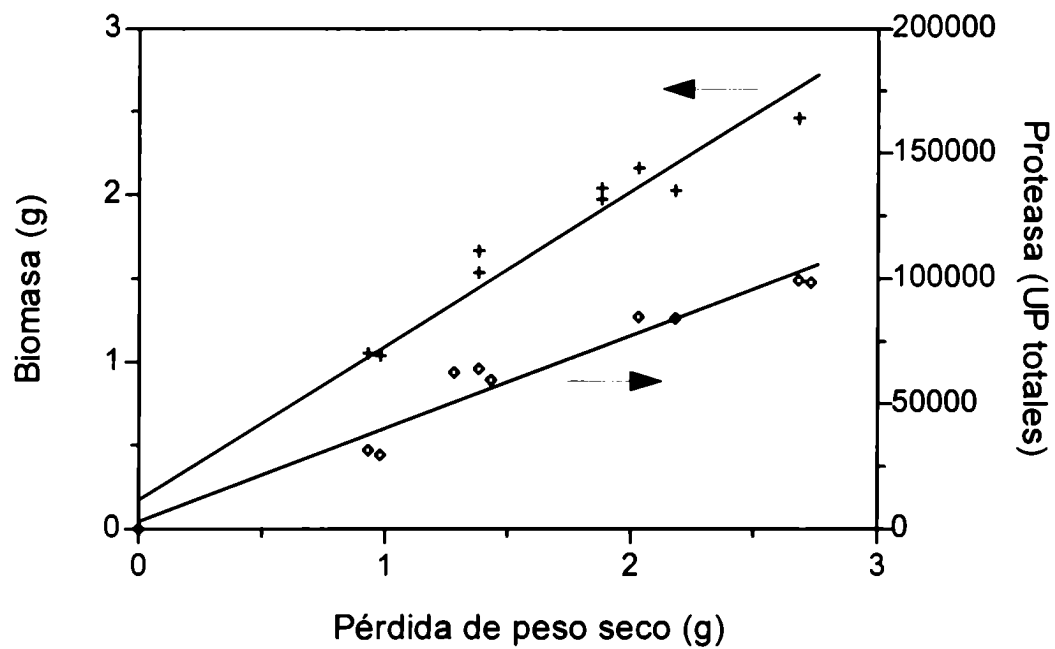


Figura III.13: Correlación entre variables de la FES. T: 37°C, H₀: 40%, pH₀: 6.
+ pérdida de peso seco y biomasa.
◇ pérdida de peso seco y producción de proteasa ácida.

Como muestra la **ecuación (III.8)** el peso seco del sistema a un determinado tiempo Ps_(t), está constituido por el sustrato residual Sr_(t), la biomasa X_(t), y el agua incorporada en el sustrato hidrolizado:

(III.8)
$$Ps_{(t)} = Sr_{(t)} + X_{(t)} + (H_2O)_h$$

El sustrato residual (**Figura III.14**) presenta en los primeros tiempos una velocidad de reducción mayor, durante la fase exponencial del hongo, siendo ésta menor durante la fase estacionaria, ya que en esta última etapa el sustrato es consumido sólo para el

mantenimiento de la biomasa previamente generada y la producción de metabolitos secundarios (si los hubiera).

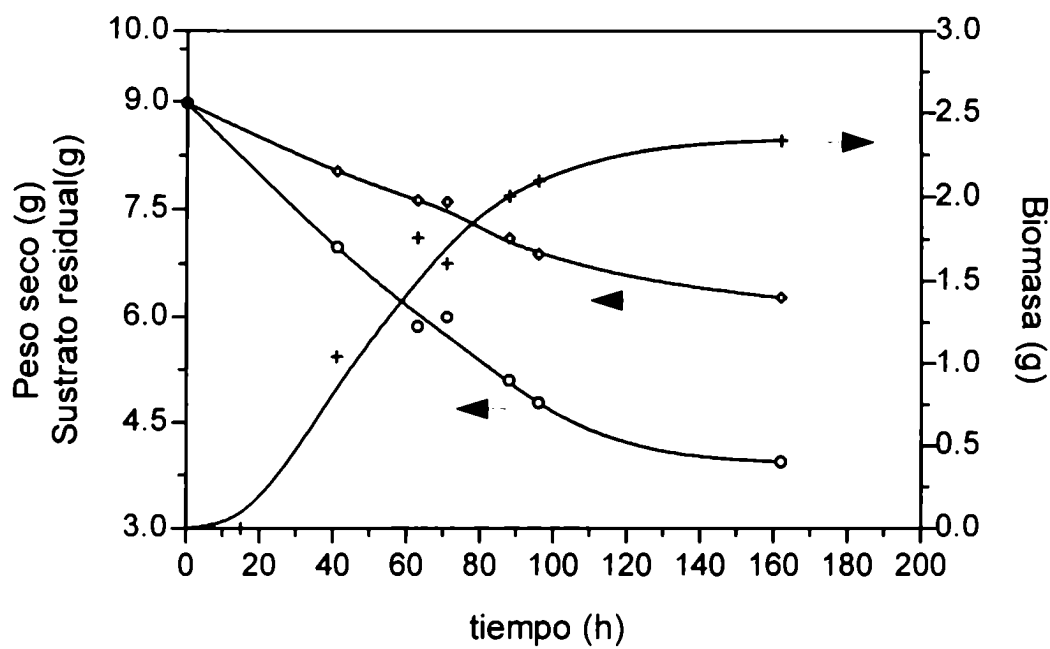


Figura III.14: Evolución de: ◇ peso seco, ○ sustrato residual y + biomasa de la fermentación. Símbolos: datos experimentales promedio.

El sustrato consumido se puede definir como:

(III.9) $S_{c(t)} = S_{(0)} - S_{r(t)}$

Siendo:

(III.10) $Ps_{(0)} = S_{(0)}$

$S_{c(t)}$: sustrato consumido al tiempo t (g).
 $S_{r(t)}$: sustrato seco residual al tiempo t (g).
 $S_{(0)}$: sustrato seco inicial (g).
 $Ps_{(0)}$: peso seco inicial (g).

Reemplazando las ecuaciones (III.8) y (III.10) en la ecuación (III.4):

(III.11) $\Delta Ps_{(t)} = S_{(0)} - S_{r(t)} - X_{(t)} - (H_2O)_h$

Y considerando la ecuación (III.9) se obtiene la siguiente relación (III.12) que vincula fundamentalmente el sustrato consumido con la pérdida de peso seco y la biomasa

generada. El agua de hidrólisis, calculada por Terebiznik (1999) en un sistema de FES similar, puede ser considerada despreciable en dicho balance:

$$(III.12) \quad S_{c(t)} = \Delta P s_{(t)} + X_{(t)} + (H_2O)_h$$

El consumo de sustrato fue calculado de acuerdo a la **ecuación (III.12)** y fue modelado mediante la ecuación logística. En la **Figura III.15** se observan los valores experimentales y predichos, obtenidos en distintas condiciones de humedad inicial de la fermentación.

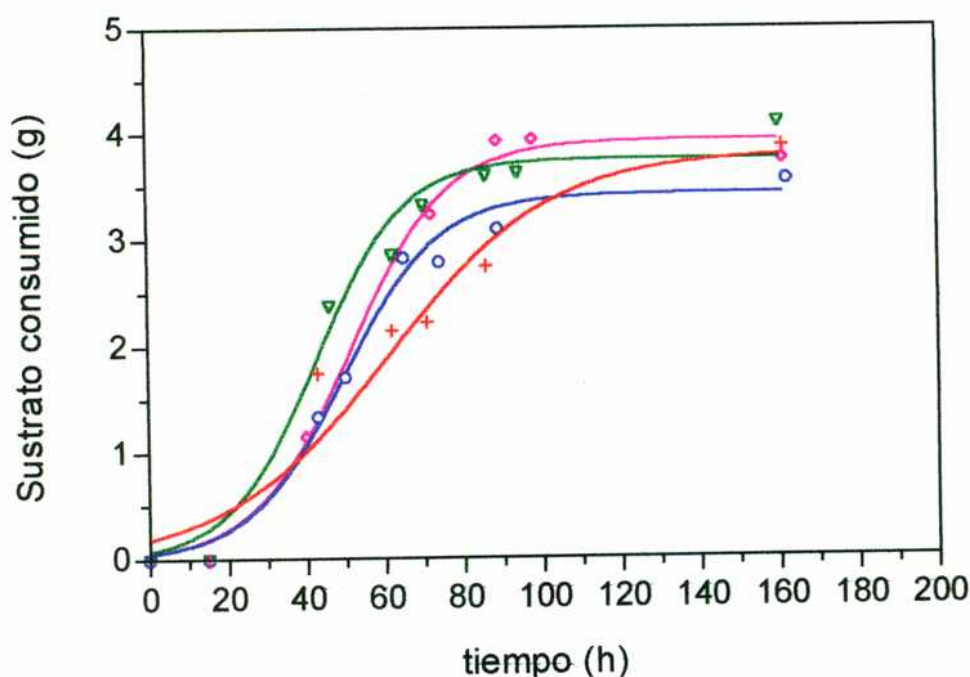


Figura III.15: Aplicación del modelo logístico sobre el consumo de sustrato.

Contenido de agua inicial %: + 38, ◇ 40, ○ 44, ▽ 48. T: 29°C, pH₀: 6.

Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: datos estimados por el modelo.

En la **Tabla III.4** se muestran los parámetros correspondientes obtenidos. En todos los casos el modelo describe adecuadamente la evolución del consumo de sustrato.

Tabla III.4: Efecto de variación del contenido de agua - A_w inicial, sobre los parámetros del modelo logístico aplicado al consumo de sustrato.

Parámetro	Contenido de agua - A_w inicial			
	38% - 0,965	40% - 0,969	44% - 0,976	48% - 0,983
N_s (g)	3,815 ± 0,255	3,934 ± 0,053	3,428 ± 0,102	3,756 ± 0,098
μ_s (h ⁻¹)	0,048 ± 0,003	0,082 ± 0,001	0,083 ± 0,002	0,090 ± 0,004
R^2	0,953	0,994	0,984	0,979

p< 0,0001 ; valor parámetro ± error estándar ; n: 11-16.

El incremento del contenido de agua inicial desde 38 al 40%, causa la duplicación de la velocidad específica de consumo de sustrato (μ_s). Sin embargo no hay grandes diferencias en todo el rango analizado de H_0 en la máxima cantidad de sustrato consumido (N_s), correspondiendo estos valores entre 38% a 43% del sustrato seco inicial. Con la disminución de H_0 al 31% cae significativamente el consumo máximo de sustrato a 2,088 g , un 23% del sustrato seco inicial. Efectos similares fueron observados sobre el crecimiento fúngico y la producción de enzima.

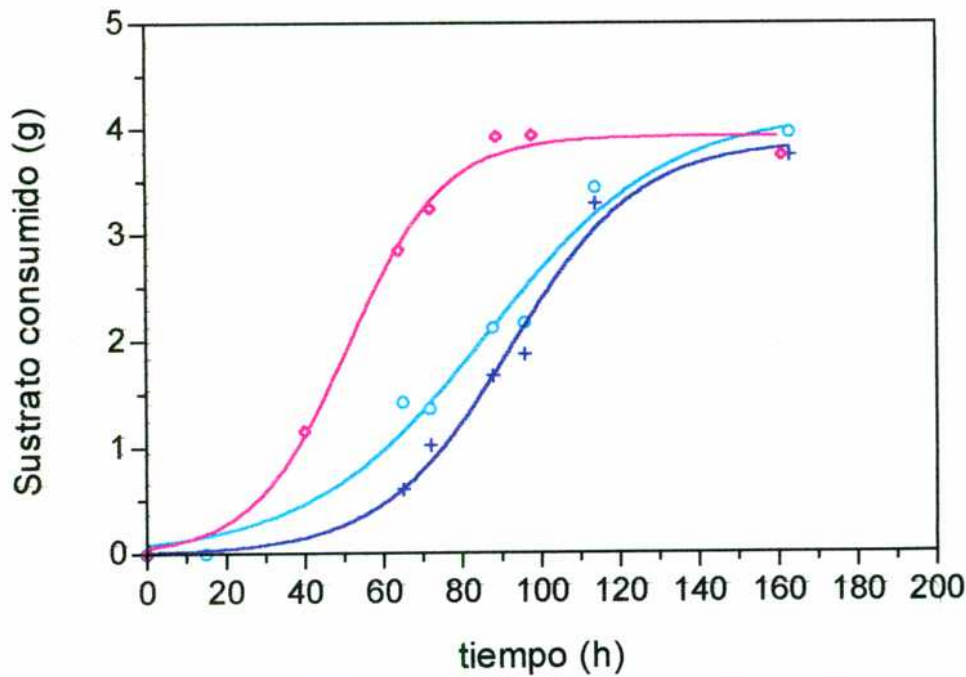


Figura III.16: Aplicación del modelo logístico sobre el consumo de sustrato.
pH inicial : + 4,4 ; o 5,4 ; * 6. T: 29°C, H_0 %:40.
Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: datos estimados por el modelo.

En la **Figura III.16** se muestra la evolución del sustrato consumido modelado con la ecuación logística, en todas las condiciones de pH inicial ensayadas.

En la **Tabla III.5** se observa que el ajuste al modelo fue satisfactorio. La máxima cantidad de sustrato consumido (N_s) no varía significativamente al modificarse el pH inicial de la fermentación, correspondiendo el consumo a un 42% a 45% del sustrato seco inicial. Sin embargo la velocidad de consumo (μ_s) disminuye al aumentar el pH_0 de 4,4 a 5,4. A pH_0 6 dicha velocidad es mucho mayor que para las otras dos condiciones. Estas observaciones y el retardo de las curvas en el tiempo al reducirse el pH_0 , coincide con lo ya descripto para el desarrollo de biomasa.

Tabla III.5: Efecto de variación del pH inicial, sobre los parámetros del modelo logístico obtenidos por regresión no lineal del sustrato consumido en la FES.

Parámetro	pH inicial		
	4,4	5,4	6
N_s (g)	3,883 ± 0,113	4,160 ± 0,157	3,934 ± 0,053
μ_s (h ⁻¹)	0,061 ± 0,001	0,044 ± 0,001	0,082 ± 0,001
R^2	0,986	0,980	0,994

p < 0,0001 ; valor parámetro ± error estándar ; n: 11-16.

En la **Figura III.17** se observa el consumo de sustrato modelado con la ecuación logística obtenido a distintas temperaturas de fermentación.

En la **Tabla III.6** se observan los parámetros correspondientes. El aumento de la temperatura de fermentación de 29°C a 37°C reduce a la mitad la velocidad de consumo de sustrato, aumentando sin embargo un 25% el máximo sustrato consumido y variando de 43% a 56% el consumo respecto del sustrato seco inicial.

Cuando la fermentación se realiza a 45°C, el consumo máximo de sustrato cae significativamente a 1,827 g, sólo un 19% del sustrato seco inicial.

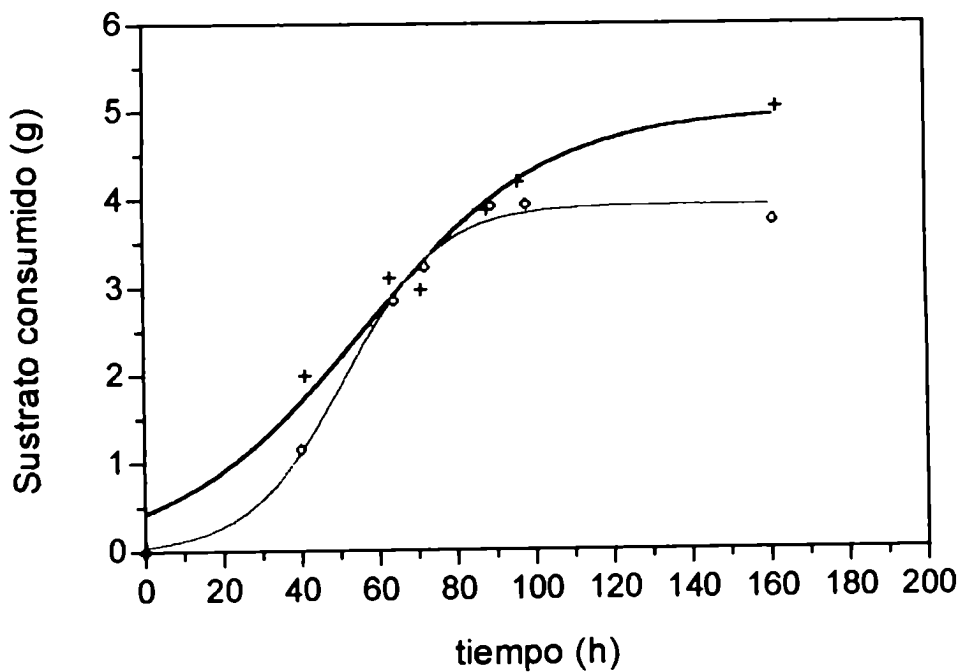


Figura III.17: Aplicación del modelo logístico sobre el consumo de sustrato.
Temperatura °C: 29, + 37. H₀%: 40, pH₀: 6.
Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: datos estimados por el modelo.

Tabla III.6: Efecto de variación de la temperatura, sobre los parámetros del modelo logístico aplicado al consumo de sustrato.

Parámetro	Temperatura	
	29°C	37°C
N _s (g)	3,934 ± 0,053	5,002 ± 0,187
μ _s (h ⁻¹)	0,082 ± 0,001	0,042 ± 0,002
R ²	0,994	0,973

p< 0,0001 ; valor parámetro ± error estándar ; n: 11-16.

Se concluye entonces que aún en la condición de máxima producción de biomasa, se consume sólo una fracción del total del sustrato seco inicial. Esta fracción es variable y depende del sistema de FES. Valores del 34% se obtuvieron para *Metarhizium anisopliae* creciendo sobre salvado y cascarilla de arroz y del 49% para *Aspergillus oryzae* sobre salvado de trigo (Dorta, 1996; Terebiznik, 1998).

Por lo tanto no es el agotamiento del sustrato lo que limita el crecimiento en el sistema sino quizás problemas estéricos, de transferencia de masa, aumento de la densidad de empaquetamiento fúngico, y también la disponibilidad de agua, factor éste último que será analizado en detalle más adelante (Oriol, 1988; Dorta 1996).

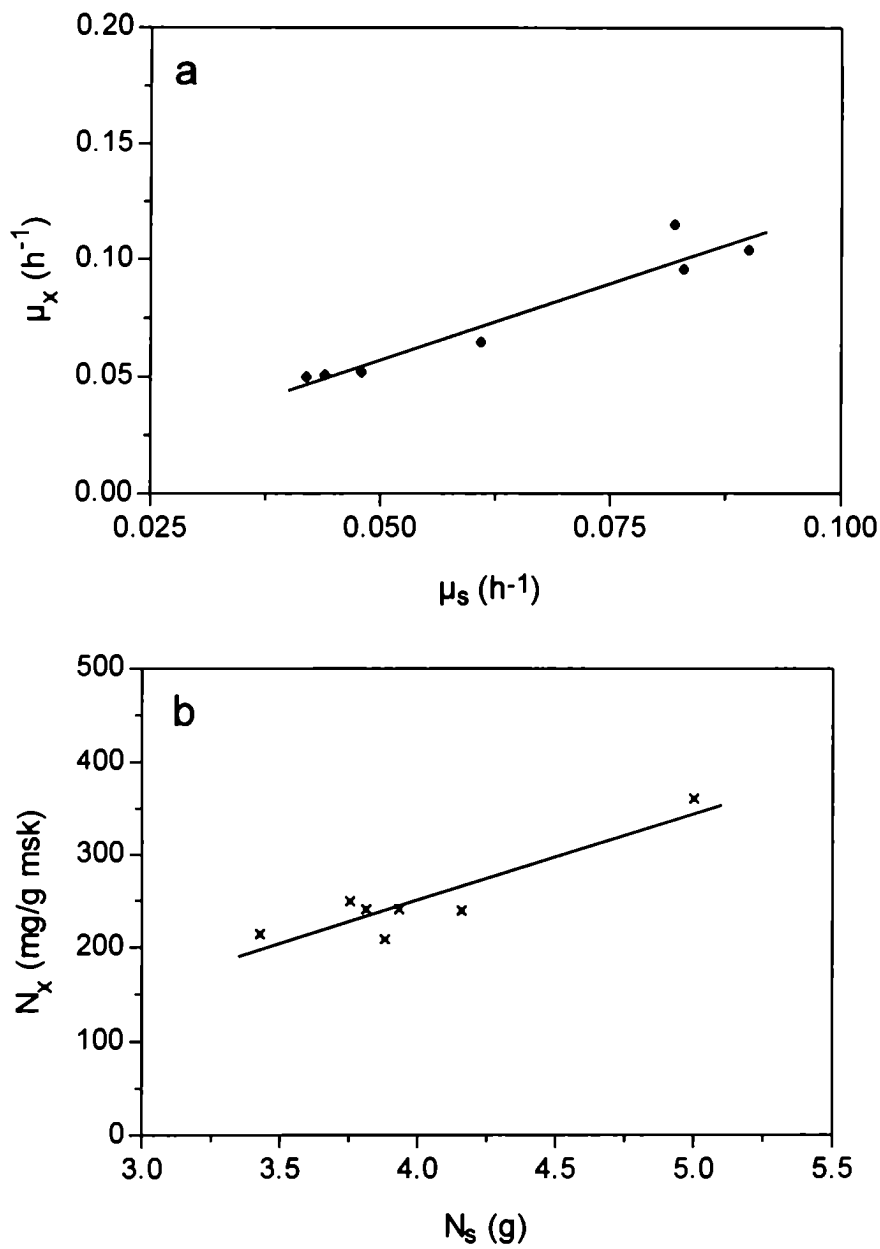


Figura III.18: Correlación entre parámetros del modelo logístico obtenidos en distintas condiciones de fermentación.
a) velocidades específicas de crecimiento (μ_x) y consumo de sustrato (μ_s).
b) máximos de crecimiento (N_x) y de consumo de sustrato (N_s).

Como se observa en la **Figura III.18** las velocidades específicas de crecimiento mostraron buena correlación con las velocidades de consumo de sustrato ($R: 0,96; p < 0,0006$), considerando todas las condiciones de cultivo. También los máximos de biomasa y consumo de sustrato tuvieron una correlación positiva ($R: 0,91; p < 0,0049$). Asimismo se observó en todos los casos una evolución asociada a lo largo del tiempo del consumo de sustrato con el crecimiento y la producción de enzima, siendo ésta más estrecha a 37°C debido al mayor desarrollo de biomasa. (**Figura III.19**)

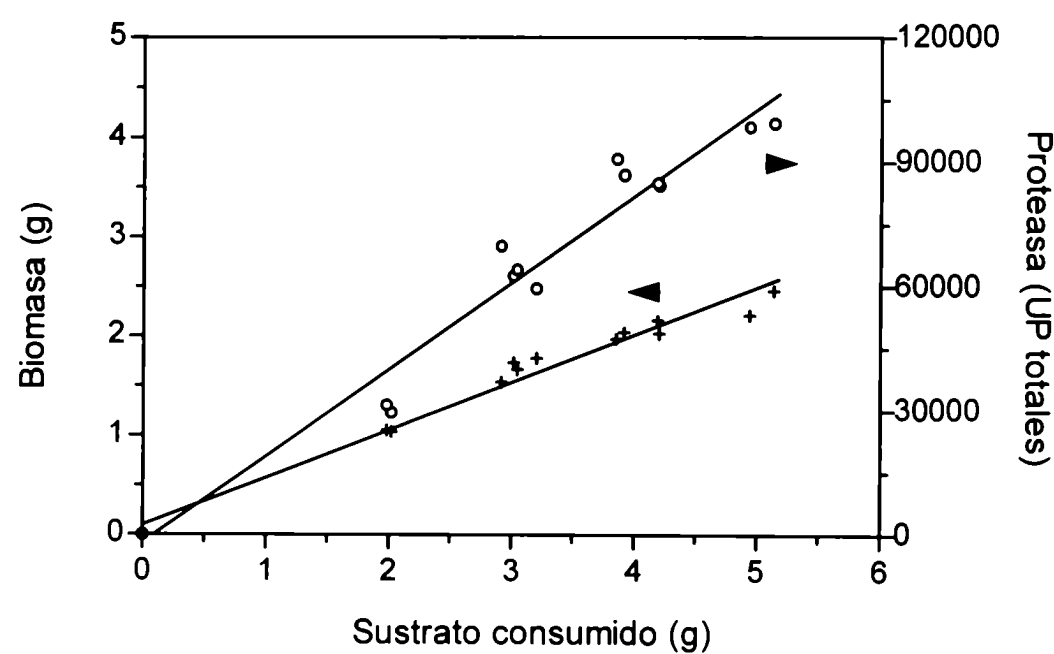


Figura III.19: Evolución asociada de variables durante la fermentación.
T: 37°C, H₀: 40%, pH₀: 6.
+ consumo de sustrato y biomasa.
O consumo de sustrato y producción de proteasa ácida.

Ante estas observaciones se correlacionó el consumo de sustrato en función de las distintas variables de fermentación analizadas ante la modificación de los parámetros ambientales.

De este modo se obtuvo un modelo de Regresión Múltiple (III.13) que explica en forma altamente satisfactoria (R^2 : 0,97; $p < 0,0001$) la evolución del consumo de sustrato en la fermentación independientemente de las condiciones iniciales de la misma.

$$(III.13) \quad Sc = 0,19 + 3,6 \cdot 10^{-6} \cdot UP + 1,1 \cdot 10^{-11} \cdot Co + 1,6 \cdot B$$

Donde:

Sc: sustrato consumido total (g)
UP: proteasa (unidades totales)
Co: número de conidios totales
B: biomasa total (g)

Del análisis estadístico del modelo se desprende que si bien es la biomasa la que explica por sí sola la mayor parte de la variabilidad del consumo de sustrato, tanto la conidiación como la producción de proteasa son variables significativas en el mismo. Todo parece indicar entonces la importancia de la liberación de esta enzima al medio, en función de la degradación de un sustrato con alto contenido protéico, para la obtención de nutrientes utilizados fundamentalmente para el crecimiento y mantenimiento fúngicos.

4. Análisis del rendimiento y productividad total de la FES

Las ecuaciones (III.14) y (III.15) describen el cálculo del rendimiento y la productividad total en este sistema de fermentación (según Wang, 1979; Abdullah, 1985; Dorta, 1996).

(III.14)
$$Y_{i/s} = \frac{\Delta i_{(t)}}{\Delta Sc_{(t)}}$$

(III.15)
$$P_i = \frac{\Delta i_{(t)}}{\Delta t}$$

$Y_{i/s}$: rendimiento de i en función del sustrato consumido.
 $Sc_{(t)}$: sustrato consumido al tiempo t (g/g msk).
 $i_{(t)}$ es según corresponda:
 $X_{(t)}$: biomasa al tiempo t (g/g msk).
 $P_{(t)}$: proteasa al tiempo t (UP/g msk).
 $C_{(t)}$: conidios al tiempo t (n°con/g msk).
 P_i : productividad total de i (unidades correspondientes/hora)

Estos parámetros fueron calculados para las 160 horas de fermentación (fase estacionaria), utilizando los valores estimados por el modelo logístico (excepto en las condiciones de cultivo: 31% H_0 y T:45°C, en que se aplicaron datos experimentales).

Tabla III.7: Efecto de variación del contenido de agua - A_w inicial, sobre el rendimiento y productividad de distintas variables de la FES.

		Contenido de agua - A_w inicial				
Parámetro		31% - 0,950	38% - 0,965	40% - 0,969	44% - 0,976	48% - 0,983
Biomasa	$Y_{x/s}$ (g/g)	0,18	0,44	0,42	0,45	0,44
	$Y_{p/s}$ (UP/g)	15957	15973	20854	13658	11075
Proteasa	P_p (UP/g msk.h)	27	55	74	41	39
	$Y_{c/s}$ (con/g)	$1,1 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^{10}$	$2,4 \cdot 10^{10}$	$2,4 \cdot 10^{10}$	$1,9 \cdot 10^{10}$
Conidios	P_c (con/g msk.h)	$1,8 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$	$6,9 \cdot 10^7$

msk: masa seca koji ; UP: unidad proteásica, con: número de conidios.

En la **Tabla III.7** se observa el efecto del contenido de agua inicial sobre el rendimiento y productividad de la FES.
El rendimiento en biomasa es similar entre 38% y 48% H_0 , y se reduce un 60% al 31% H_0 .

Tanto el rendimiento como la productividad de proteasa son superiores al 40% H_0 , y mientras que la mayor productividad de conidios es también en esa condición, su rendimiento óptimo está entre 40% y 44% H_0 .

Cuando la humedad inicial desciende al 31%, el $Y_{p/s}$ disminuye sólo un 25% respecto del óptimo. Si bien la cantidad de biomasa es menor, la enzima producida por unidad de biomasa es superior a las otras condiciones, probablemente por una dependencia mayor del metabolismo fúngico para la obtención de nutrientes a partir de la actividad proteolítica. Sin embargo la notable baja en la productividad no hace interesante este sistema para la obtención de la proteasa ácida.

Tabla III.8: Efecto de variación del pH inicial, sobre el rendimiento y productividad de distintas variables de la FES.

		pH inicial		
Parámetro		4,4	5,4	6
Biomasa	$Y_{x/s}$ (g/g)	0,37	0,40	0,42
Proteasa	$Y_{p/s}$ (UP/g)	5504	15428	20854
	P_p (UP/g msk.h)	19	56	74
Conidios	$Y_{c/s}$ (con/g)	$2,2 \cdot 10^{10}$	$2,3 \cdot 10^{10}$	$2,4 \cdot 10^{10}$
	P_c (con/g msk.h)	$7,8 \cdot 10^7$	$8,4 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^7$

msk: masa seca koji ; UP: unidad proteásica, con: número de conidios.

En la **Tabla III.8** se analiza la incidencia del pH inicial sobre estos parámetros. Los rendimientos calculados para las 160 horas de fermentación, basados en consumo de sustrato para biomasa y conidiación, así como la productividad de esta última, no son mayormente afectados por la modificación del pH_0 . En cambio tanto el rendimiento como la productividad de la enzima son máximos a pH_0 6, reduciéndose en un 75% a pH_0 4.4.

En la **Tabla III.9** se observa el efecto de la temperatura de fermentación sobre los parámetros.

Con el incremento de la temperatura de 29°C a 37°C se obtienen rendimientos de biomasa semejantes, ya que el aumento de la biomasa es proporcional al del consumo de sustrato en cada caso.

En ese rango de temperatura también los $Y_{p/s}$ son semejantes ya que si bien la proteasa producida a 37°C es mayor, también es superior el consumo de sustrato, pues en este caso está fundamentalmente dedicado al mantenimiento de una mayor cantidad de biomasa. El rendimiento de enzima por unidad de biomasa es superior a 29°C, sin embargo la productividad de proteasa a 37°C aumenta un 25%, lo que lo hace el sistema óptimo para su obtención.

Asimismo también en esta situación (37°C) se reduce tanto el rendimiento como la productividad de conidios.

Un incremento de la temperatura a 45°C reduce significativamente todos los rendimientos y productividades analizados, ya que en este caso las condiciones de crecimiento son limitadas.

Tabla III.9: Efecto de variación de la temperatura, sobre el rendimiento y productividad de distintas variables de la FES.

		Temperatura		
Parámetro		29°C	37°C	45°C
Biomasa	$Y_{x/s}$ (g/g)	0,42	0,45	0,06
Proteasa	$Y_{p/s}$ (UP/g)	20854	19587	7239
	P_p (UP/g msk.h)	74	97	10
Conidios	$Y_{c/s}$ (con/g)	$2,4 \cdot 10^{10}$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^9$
	P_c (con/g msk.h)	$8,6 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^6$

msk: masa seca koji ; UP: unidad proteásica, con: número de conidios.

En la **Tabla III.10** se analiza la productividad de proteasa ácida en diferentes etapas de crecimiento del hongo: la fase exponencial (incluyendo desaceleración), y la estacionaria, en las dos condiciones de FES de mayor rendimiento total (**Tabla III.9**): H_0 40%, pH_0 6, T 29°C y 37°C.

Como fue descripto previamente, el hongo secreta la proteasa al medio durante la fase exponencial y de desaceleración 49% del total de la proteasa a 29°C y 92% a 37°C, lo que se refleja en la productividad, que es similar en ambas fases a 29°C y muy superior en la primera de éstas a 37°C.

Tabla III.10: Efecto de variación de la temperatura, sobre la productividad de proteasa en las fases de crecimiento del hongo.

		Temperatura	
Fase	Parámetro	29°C	37°C
exponencial	P _p (UP/g msk.h)	73	130
estacionaria	P _p (UP/g msk.h)	75	26

msk: masa seca koji ; UP: unidad proteásica.

Asimismo, si bien a 37°C las velocidades específicas de crecimiento (μ_x) y de producción de proteasa (μ_p) son iguales, esta relación es variable en otras condiciones de FES (Tablas III.7-9).

Por lo tanto la producción de la proteasa y el crecimiento no siguen siempre un patrón similar, por lo que considerando los modelos que describen la relación cinética entre crecimiento y formación de producto, la producción de esta enzima responde a un Modelo de tipo II parcialmente asociada al crecimiento (Wang, 1979).

Escobar (1993) realizando estudios cinéticos sobre la producción de proteasa ácida por *Mucor miehei* en cultivo sumergido también concluyó que ésta era generada a partir de una vía secundaria separada del metabolismo primario.

Por otro lado realizando un balance entre costo y beneficio de la fermentación, la reducción del tiempo total de la misma en más de dos días cosechando la enzima al comienzo de la fase estacionaria (aproximadamente 100 horas) a 37°C si bien produce una pérdida cercana al 10% de la proteasa producida, aumenta la productividad total de la FES un 34%.

5. Evolución del pH de la FES y su relación con las variables de proceso

5.1. Evolución del pH en la FES

En general, la variación del pH por el crecimiento de microorganismos, está relacionado al balance iónico establecido por el consumo de sustrato y la formación de diferentes metabolitos.

La disminución o ascenso del pH puede ser causada por la secreción y/o asimilación de ácidos orgánicos (acético, láctico, cítrico, etc.), respectivamente. La utilización de la fuente de nitrógeno del medio también provoca variaciones: la incorporación de sales de amonio por el microorganismo reduce el pH por la liberación de protones; inversamente cuando se incorporan nitratos, se consumen protones del medio para su reducción e incorporación a un esqueleto carbonado. Asimismo la utilización de urea y de proteínas está asociada a una deaminación previa; las aminas son reducidas a amonio utilizando protones del medio e incrementando el pH de la fermentación (Prior, 1992).

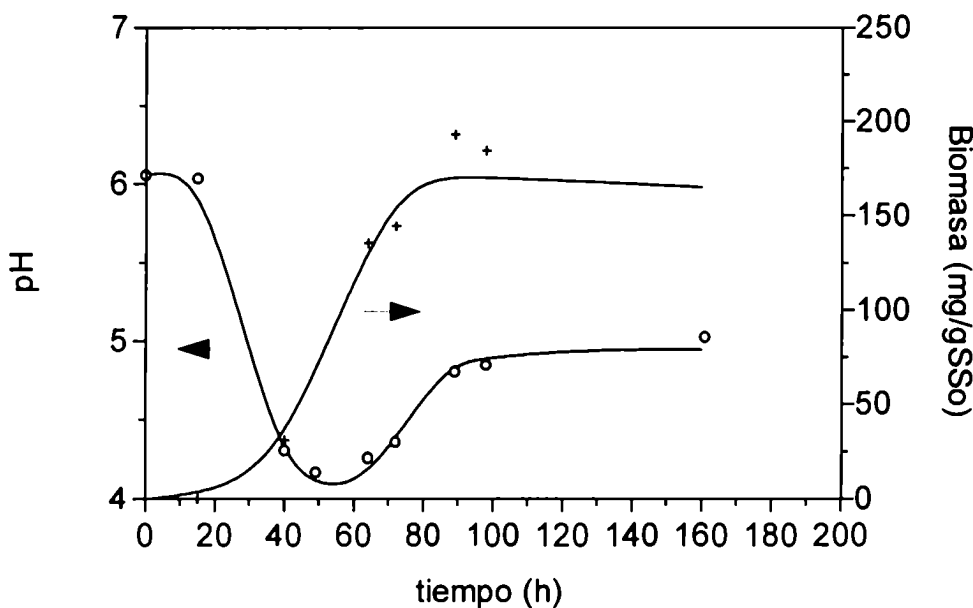


Figura III.20: Evolución del pH durante la fermentación. T: 29°C, pH₀: 6, H₀: 40%.
+ biomasa fúngica, O pH.

Como se observa en la **Figura III.20** la evolución del pH en el sistema de fermentación estudiado muestra un patrón general, asociado a las fases de crecimiento del hongo. Durante los primeros tiempos de la fase exponencial, el pH decae hasta llegar a un mínimo, ascendiendo luego hacia el final de la misma y durante la desaceleración del crecimiento, para finalmente estabilizarse llegando a un plateau durante la fase estacionaria.

Este mismo patrón fue observado en otros procesos de FES. Malathi (1991) describió que una cepa de *Aspergillus flavus* productora de proteasa alcalina, creciendo sobre salvado de trigo producía un descenso inicial del pH a valores inferiores a 6, para luego ascender a un valor superior a 8. En la producción de proteasa ácida por *Aspergillus niger* sobre este mismo sustrato, el pH decayó inicialmente por debajo de 5,5, incrementándose luego hasta 6,3 (Villegas 1993). Prior (1992) observaron en una fermentación de *Aspergillus oryzae* sobre arroz, el decrecimiento del pH inicial de 6,6 a 5,2 para luego subir a 6,3. En estos casos se concluyó que la deaminación de las proteínas del medio usadas como fuente de nitrógeno, llevaba a la alcalinización final.

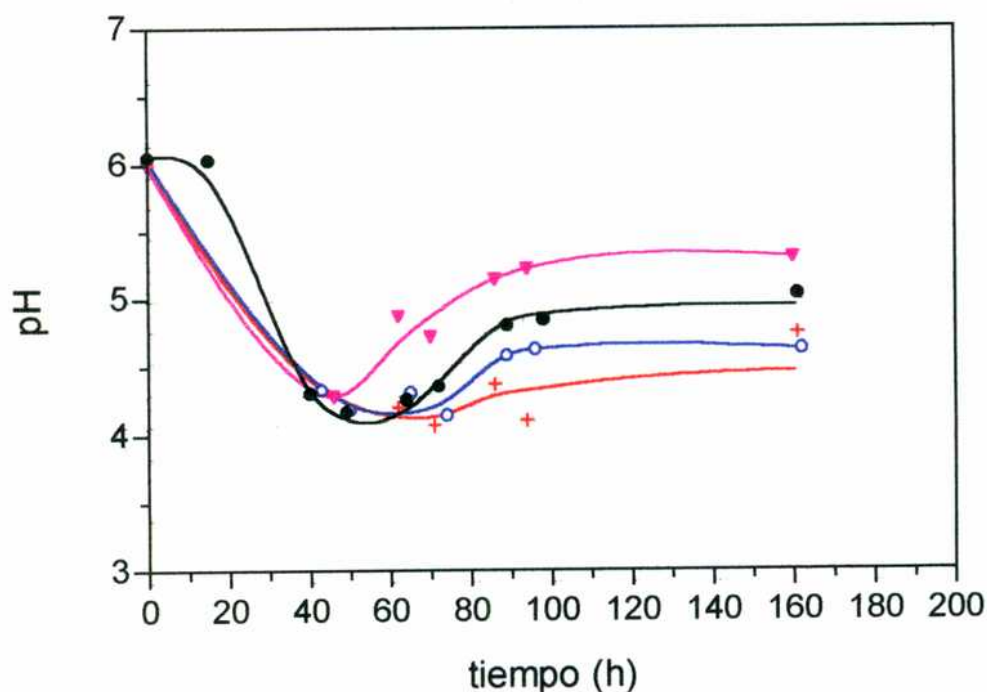


Figura III.21: Efecto del contenido de agua inicial del sustrato sobre la evolución del pH.

$H_0\%$: + 38, ● 40, ○ 44, ▼ 48. T: 29°C, pH_0 : 6

En la **Figura III.21** se observa que el incremento del contenido de agua inicial del sustrato desde 38% a 48%, (a 29°C y pH_0 6), no produce diferencias importantes en el pH mínimo alcanzado: 4,1 - 4,25, ni en las velocidades de caída de pH que varían de 0,027 a 0,037 unidades/hora. En cambio los pHs máximos alcanzados difieren significativamente, (4,6 - 5,3), siendo mayores a mayor humedad inicial.

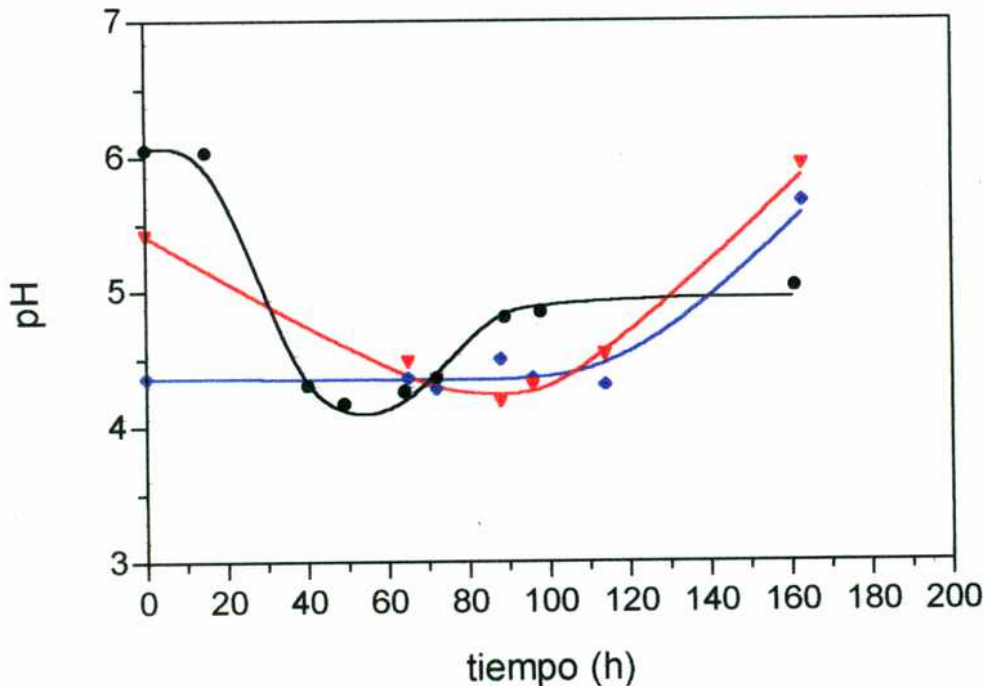


Figura III.22: Efecto del pH inicial del sustrato sobre la evolución del pH de la FES.

$\text{pH}_0\%$: ◆ 4,4 ; ▼ 5,4 ; ● 6. T: 29°C, H_0 : 40%.

En la **Figura III.22** se muestra que el ajuste del pH inicial del cultivo por adición de HCl 1N, entre 4,4 y 6, (a 29°C y 40% H_0), tampoco varió demasiado el pH mínimo de la fermentación: 4,1 - 4,3. Las velocidades de descenso del pH se reducen significativamente de 0,036 unidades/hora (pH_0 6), 0,014 unidades/hora (pH_0 5,4), hasta casi 0 unidades/hora (pH_0 4,4), permaneciendo en este último caso el pH constante desde el inicio de la fermentación hasta su fase de ascenso.

Las fases de ascenso del pH, se ven retrasadas en el tiempo. Mientras que la fermentación con pH_0 6 llega a las 90 horas al pH máximo igual a 5, las curvas correspondientes a pH_0 5,4 y 4,4 entran en fase de ascenso 50 horas más tarde

aproximadamente, y llegan a valores máximos de pH superiores, de 5,7 y 5,9 respectivamente, pero sin llegar a un plateau.

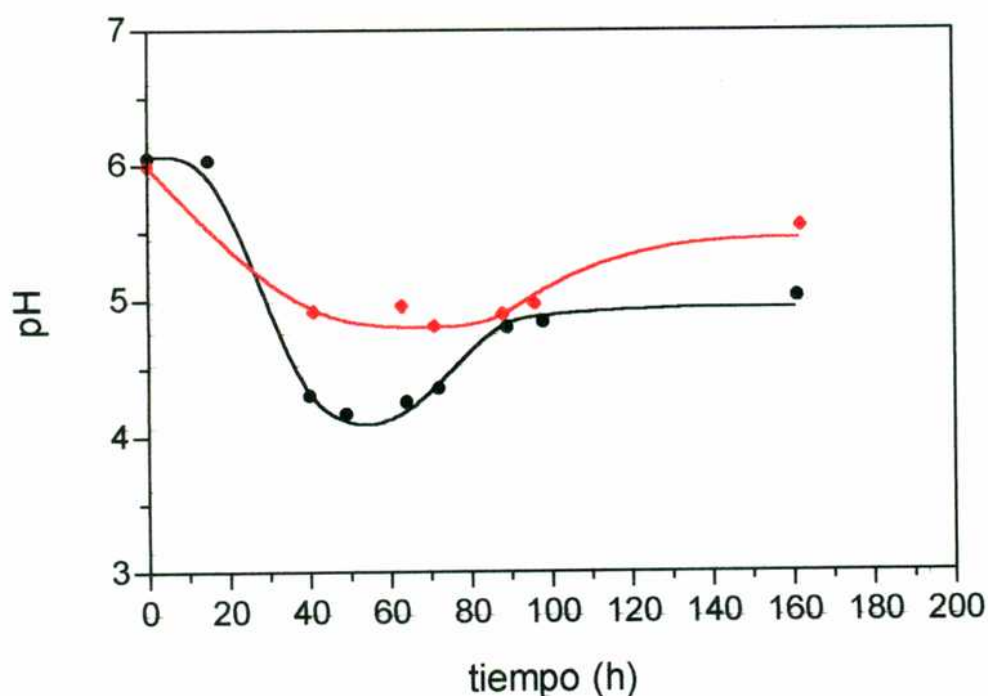


Figura III.23: Efecto de la temperatura sobre la evolución del pH de la FES.

T: ● 29°C, ◆ 37°C. H_0 : 40%, pH_0 : 6.

Como se observa en la **Figura III.23** el aumento de la temperatura de incubación de 29°C a 37°C (40% H_0 , pH_0 6), eleva el pH mínimo alcanzado por la fermentación de 4,1 a 4,8. La velocidad de descenso del pH se reduce significativamente de 0,036 unidades/hora a 0,017 unidades/hora.

La curva de pH a 37°C presenta valores mayores y oscilaciones menos marcadas a lo largo del tiempo que la correspondiente a 29°C.

Los máximos valores de pH (plateau) varían de 5,5 (37°C) a 5 (29°C), siendo alcanzados a las 120 y 90 horas respectivamente.

En sistemas de fermentación que emplean distintos sustratos sólidos y cepas de *Aspergillus niger*, se ha reportado que el pH decayó a un mínimo a comienzos de la fase exponencial, debido a la producción de ácidos orgánicos por el hongo durante la

tropofase (Yang, 1986; Roukas, 1986); luego asciende, por disminución o cesación de la secreción de dichos ácidos (Khan, 1984).

Estudios realizados por Hang (1987) sobre la síntesis de ácido cítrico en *Aspergillus niger* sobre cáscara de kiwi, se relacionan con los resultados obtenidos en el sistema de fermentación estudiado. Un menor contenido de agua inicial favorece en *Aspergillus niger* el mantenimiento del pH en valores más bajos, por ser estimulada la síntesis de ácido cítrico. Asimismo el incremento de la temperatura de fermentación a 37°C, disminuye la producción de dicho ácido provocando un menor descenso del pH en el cultivo con respecto a 29°C, y ascendiendo a valores superiores que a 29°C en la fase estacionaria.

Soccol (1997a), analizando la producción de ácido cítrico sobre mandioca por una cepa de *Aspergillus niger* también encontró que la misma era favorecida a menores contenidos de agua inicial del sustrato, temperatura inferior a 30°C (26°C), y un rango de pH inicial entre 1,6 y 3,5.

De acuerdo a este último dato es probable que al disminuir el pH inicial de la fermentación a 4,4, se vea más estimulada la síntesis de ácidos orgánicos que a pH₀ 6 o 5,4, y esto retarde el ascenso del pH del sistema.

5.2. Relación entre conidiación, producción de proteasa y pH de la fermentación

Existen referencias acerca del importante papel que los procesos proteolíticos cumplen en la formación de esporas en bacterias y que la producción de proteasas extracelulares coincide con la esporulación (Ferrero, 1995).

En *Bacillus subtilis* la represión catabólica, regula conjuntamente la transcripción de enzimas involucradas en la utilización de varios azúcares, enzimas degradativas (α -amilasa), las primeras tres enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico y la iniciación de la esporulación. La proteína Spo0A es el factor regulatorio de la iniciación de la esporulación y está involucrada en la regulación de la producción de proteasa extracelular, ya que después de ser activada por fosforilación, inhibe la transcripción de AbrB, un represor negativo de la biosíntesis de proteasa. Se cree que cambios en la

concentración de un metabolito regulatorio o bien señales ambientales, pueden dereprimir la biosíntesis de Spo0A (Bierbaum, 1994).

Si bien la espora bacteriana cumple una función de resistencia diferente a la función propagativa de los conidios, también en hongos filamentosos cultivados en medio líquido, se ha visto que la producción de proteasas, galactosidasas y amilasas es incrementada cuando la conidiación del hongo fue inducida (Ueno, 1987).

Battaglino (1991) y Ueki (1994a y b) observaron que la disminución de proteasas de *Aspergillus oryzae* en Koji se asociaba a una reducción en la conidiación.

Asimismo el aislamiento de mutantes inducidos de *Aspergillus niger* deficientes en proteasa extracelular mostró que la mayoría de ellos tenía reducida la esporulación (Mattern, 1992).

Por lo tanto resultó de interés estudiar la relación proteasa-conidiación en FES, ante la variación de los parámetros ambientales.

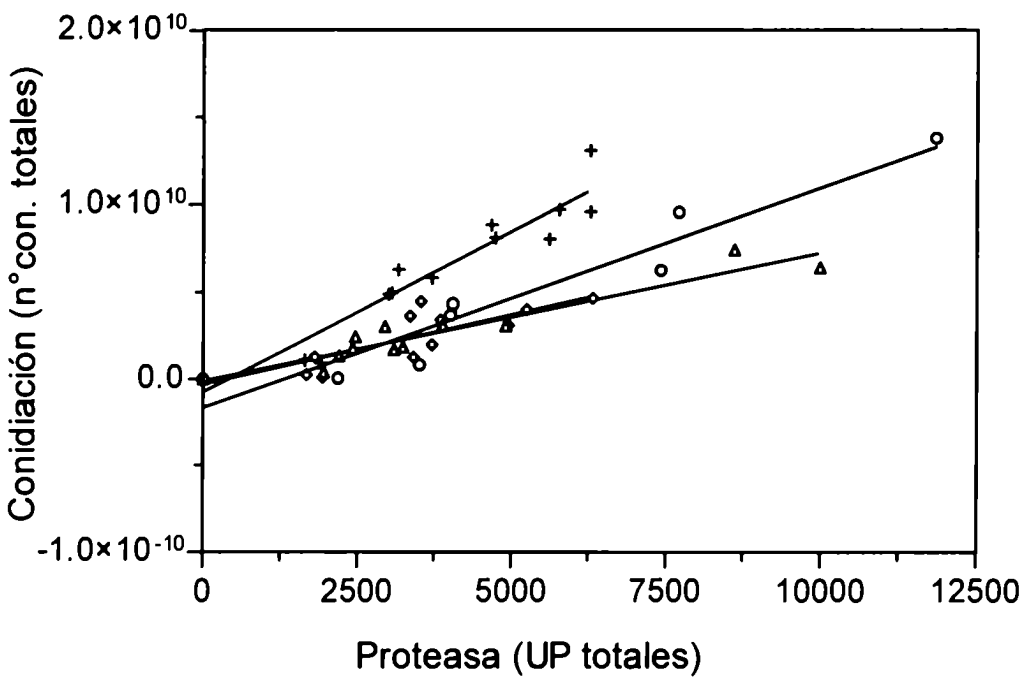


Figura III.24: Correlación entre conidiación y producción de proteasa con distintos contenidos de agua inicial de la FES.

H₀%: Δ 38, ○ 40, ◇ 44, + 48. T: 29°C, pH₀: 6

Como fue descripto previamente, la evolución de la proteasa y la conidiación en el tiempo ante distintas condiciones iniciales de fermentación, muestra que en todos los casos la producción de la enzima es seguida por la inducción y desarrollo de la conidiación.

Aplicando el test de correlación de Pearson entre conidios totales y proteasa total producida, para todos los tiempos de la fermentación, se obtuvieron buenos coeficientes de correlación para cada condición inicial testada.

Para contenidos de agua iniciales del 38%, 40%, 44% y 48%, los R fueron: 0,95 , 0,96 , 0,86 , y 0,96 respectivamente ($p < 0,0001$), (**Figura III.24**).

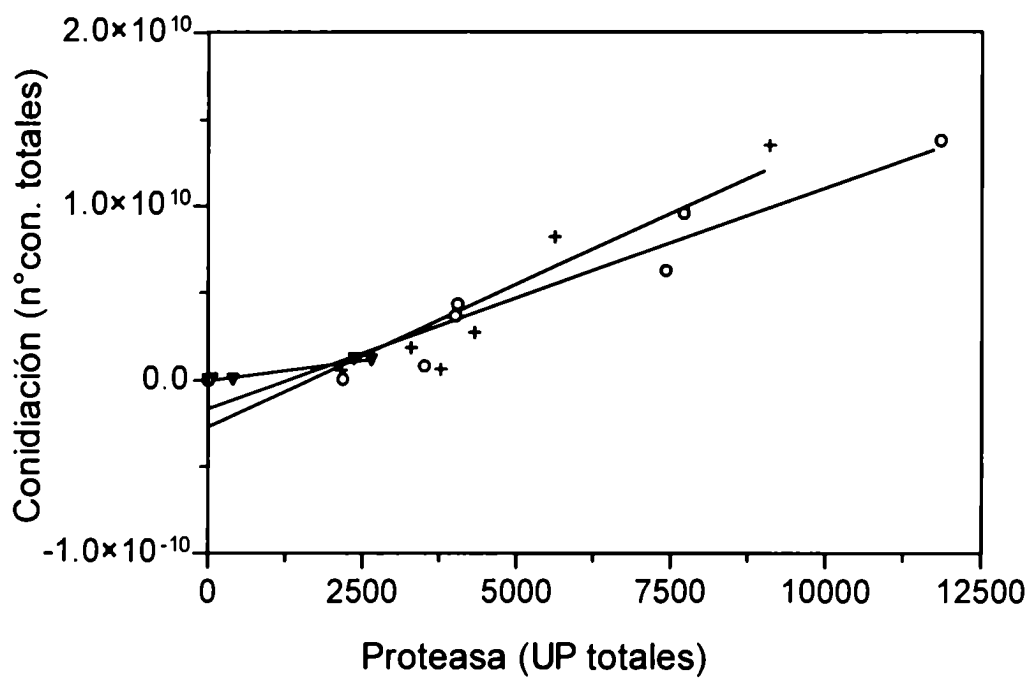


Figura III.25: Correlación entre conidiación y producción de proteasa con distinta condición inicial de pH de la FES.
pH₀: ▼ 4,4 ; + 5,4 ; ○ 6. T: 29°C, H₀: 40%.

Para pHs iniciales de 4,4 , 5,4 , y 6:, los R fueron: 0,98 , 0,92 ,y 0,96, respectivamente ($p < 0.0001$), (**Figura III.25**). En la condición pH₀ 4,4, sólo se consideraron los primeros tiempos de fermentación, ya que la correlación no es buena para los tiempos totales , pues mientras la caída de pH₀ a este nivel reduce la actividad de proteasa , no afecta la conidiación.

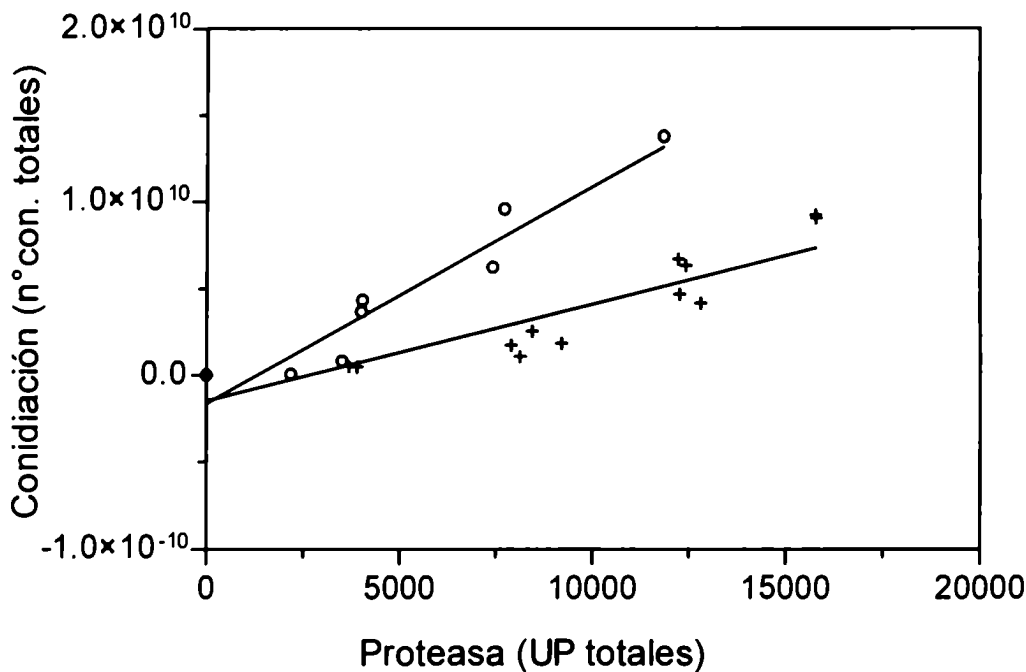


Figura III.26: Correlación entre conidiación y producción de proteasa con distintas temperaturas de fermentación.

T: O 29°C, + 37°C. H₀: 40%, pH₀: 6.

Para la variación de la temperatura de fermentación de 29°C a 37°C, los R fueron: 0,96 , y 0,91 respectivamente,($p < 0,0001$), (**Figura III.26**).

Distintos contenidos de agua inicial o temperaturas de incubación mostraron diferencias en su efecto sobre la correlación, (las pendientes son diferentes a un nivel extremadamente significativo, $p < 0,0001$), mientras que el pH₀ no parece modificar la correlación (las pendientes no difieren significativamente $p > 0,05$).

El patrón general observado en la evolución del pH de la fermentación en el tiempo, está ligado a la evolución de la producción de enzima y a la conidiación. En todas las condiciones ensayadas, conjuntamente con la llegada del pH de la fermentación a un mínimo y su posterior ascenso, hacia el fin de la fase exponencial, se incrementa en forma importante la velocidad de producción de la proteasa y la conidiación. Esto puede implicar algún tipo de regulación directa o indirecta de la enzima y/o la conidiación por el pH.

Esta vinculación entre pH del medio y la producción de proteasa y conidios está representado en la **Figura III.27**, que corresponde a la condición de fermentación donde se obtuvo máxima conidiación (T 29°C, H₀ 40%, pH₀ 6).

Una relación similar entre evolución del pH del medio y secreción de distintas proteasas en FES fue observada por Malathi (1991) y Villegas (1993), y también por Ferrero (1995) para la producción de proteasa alcalina por *Bacillus licheniformis* MIR29 en cultivo sumergido.

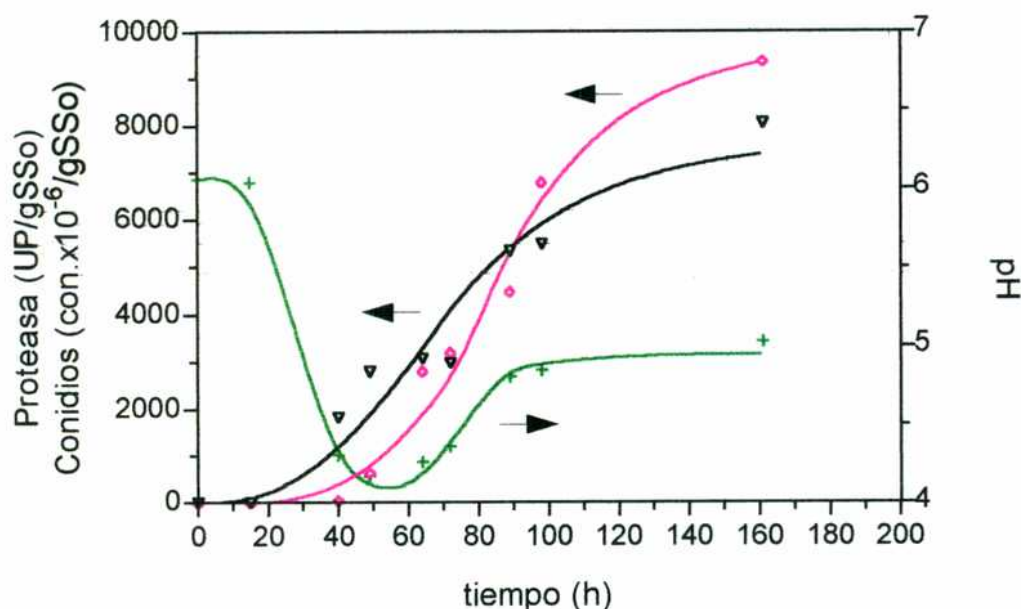


Figura III.27: Relación entre la evolución de:

+ pH, ◇ conidiación y ▽ producción de proteasa ácida en FES.

Con el objeto de correlacionar la influencia conjunta de la proteasa y el pH de la FES sobre la conidiación, se desarrolló un modelo de Regresión Múltiple (III.16) considerando todas las condiciones de fermentación ensayadas, a partir del tiempo en que se obtiene el mínimo en la evolución del pH.

$$(III.16) \quad Co = 9,6 \cdot 10^9 \cdot pH - 2,6 \cdot 10^6 \cdot UP + 5,2 \cdot 10^5 \cdot UP \cdot pH$$

Co: número de conidios totales.
pH: pH del cultivo.
UP: proteasa (unidades totales).

La correlación obtenida es altamente significativa, siendo R^2 : 0,86 y $p < 0,0001$. De este modo se observa que independientemente de las condiciones iniciales de la FES, el ascenso del pH del cultivo, la presencia de la proteasa y la modulación de su producción por parte del pH, están correlacionados satisfactoriamente con el incremento de la conidiación.

Si bien estos estudios no son completos y debieran ser complementados a nivel genético y bioquímico, permiten describir una relación entre la producción de la enzima y el desarrollo de la conidiación, con cierto grado de asociación en su respuesta ante determinadas señales ambientales.

5.3. Consideraciones acerca de la regulación por pH

Todos los microorganismos enfrentan variaciones en el pH del medio de crecimiento y en general poseen un mecanismo homeostático de pH que restringe el rango de variación que deben sufrir las moléculas intracelulares. Sin embargo este sistema no protege a las permeasas ni a las enzimas o metabolitos de exportación, cuya síntesis está fuertemente influenciada por el pH ambiental. Por lo tanto resulta una ventaja para la economía celular, poseer un sistema regulatorio que sense el pH externo y que asegure la apropiada síntesis de moléculas, en las condiciones en que éstas pueden ser activas, así por ejemplo la secreción de fosfatasas ácidas en medio ácido y de fosfatasas alcalinas en medio alcalino (Caddick, 1986).

Sarkar (1996) y Brakhage (1997), resumen los últimos avances en la descripción del sistema de regulación de genes por pH en *Aspergillus nidulans*.

Según el modelo planteado el producto del gen *pacC*, PacC, es un factor de transcripción con tres dedos Cys_2His_2 zinc, cuya proteólisis es paso esencial en la regulación de la expresión de genes por pH. Por lo tanto dos formas de PacC son detectables en extractos: en condiciones ácidas de crecimiento predomina la forma entera, en condiciones alcalinas predomina la forma clivada, (40% de PacC), conteniendo el extremo N-terminal. Esta última versión proteolizada es la funcional, la que en presencia de una señal mediada por el producto de seis genes *pal* en respuesta a un ambiente alcalino, activa la transcripción de los genes que se expresan en medio

alcalino y reprime los que se expresan en medio ácido. La transcripción de *pacC* está asimismo sujeta a una activación autógena por pH alcalino.

La presencia de varios sitios GCCARG de reconocimiento para PacC en los promotores de genes expresados en alcalinidad (*pacC*, *ipnA* y *prtA*, los dos últimos codificantes para las enzimas isopenicilin N sintetasa y proteasa alcalina respectivamente), y la existencia de sólo uno o ninguno de estos sitios en promotores de genes expresados en acidez (*pepF*, *A* y *B*, y *aphA*, codificantes de proteasas ácidas y fosfatasa ácida respectivamente), esboza la posibilidad que el mecanismo de regulación por PacC, sea diferente en ambos tipos de genes. El hallazgo de un doble mutante: en el gen *pacC* y en otro gen *pacM*, que sin mediar la señal de pH del medio permite la sobreexpresión simultánea de genes “ácidos y alcalinos”, permite suponer que si bien PacC puede ejercer directamente su función de activador de la transcripción de genes “alcalinos”, su función de represión de genes “ácidos” sería ejercida por su interacción directa o indirecta con el producto del gen *pacM*.

Este tipo de regulación por pH fue encontrada por Jarai (1994) y Gente (1997), en la expresión de proteasas ácidas de *Aspergillus niger* y *Penicillium roqueforti*, estableciéndose que este nivel de control sobrepasa a los ejercidos por represión por metabolitos de carbono, nitrógeno, o inducción por una fuente protéica.

En todas las condiciones ensayadas en el sistema de FES estudiado, durante la producción de proteasa ácida por *Aspergillus niger* 91 el pH de la fermentación varía entre 5,5 y 4, (rango en el cual no es afectada la estabilidad de la enzima, según ensayos que serán luego descriptos), por lo que las variaciones de actividad proteásica observadas no serían explicables a través de la aplicación del sistema regulatorio por PacC exclusivamente.

Terebiznik (1998), explica la regulación por el pH del medio, de la secreción de α -amilasa por *Aspergillus oryzae* en FES, aplicando el modelo deducido por Espeso (1993), en sus estudios sobre el control de la transcripción del gen *ipnA* codificante de la isopenicilin N sintetasa, enzima interviniente en la síntesis de penicilina G por *Aspergillus nidulans*, demuestra la existencia de un mecanismo de acción concertada entre la regulación por pH y por fuente de carbono, pero independiente de los sistemas PacC y CreA.

En este modelo, el estado nutricional del medio de cultivo, se evidencia a través de la evolución del pH. La presencia de fuentes “buenas” de carbono (glucosa, sacarosa, acetato), acidifica el medio y permite buen crecimiento del hongo. En cambio cuando éstas están en baja concentración o sólo hay fuentes de carbono de menor aporte al desarrollo de biomasa (lactosa, arabinosa, fructosa), se alcaliniza el pH del medio por el catabolismo de proteínas y aminoácidos, y se favorece la síntesis de penicilina en una condición de pH donde la competencia de las bacterias con el hongo puede ser mayor.

De acuerdo con esto, Terebiznik (1998), observó que durante el crecimiento de *Aspergillus oryzae* en salvado de trigo se producía un descenso inicial del pH debido a la acumulación de glucosa. La disminución posterior de la misma al ser consumida por el hongo y el inicio de la metabolización de proteínas, aumenta el pH del medio, lo que dispara la síntesis de α -amilasa para obtener nuevamente azúcares fermentescibles.

Sin embargo cuando el pH inicial es inferior a 5,5, este incremento del pH, es amortiguado por la acidez del medio y por lo tanto no hay señal que potencie la síntesis de α -amilasa, la que entonces se mantiene constante en bajo nivel.

Estas últimas observaciones realizadas son análogas a las obtenidas en el sistema de producción de proteasa ácida por *Aspergillus niger* 91.

Como se observa en la **Figura III.28** también en este caso la acumulación de glucosa coincide con la acidificación del medio, mientras que su disminución, lleva a la alcalinización del mismo. Y como ya fue descrito para el Modelo de Regresión Múltiple (**III.16**) aquí planteado, es este cambio en la evolución del pH el que dispara la secreción de proteasa ácida.

El medio soja:afrechillo de arroz (7:3) tiene un contenido en hidratos de carbono del 28%, y de éstos aproximadamente la mitad es de origen amiláceo proveniente únicamente del afrechillo. Otros sustratos sólidos utilizados en FES, como el salvado de trigo o la mandioca, contienen entre 50 y 60% de almidón, por lo que los hongos allí cultivados obtienen el carbono necesario para su crecimiento a partir de la producción de un sistema amilolítico de enzimas y la consecuente degradación del almidón (Soccol, 1997b, Terebiznik, 1998).

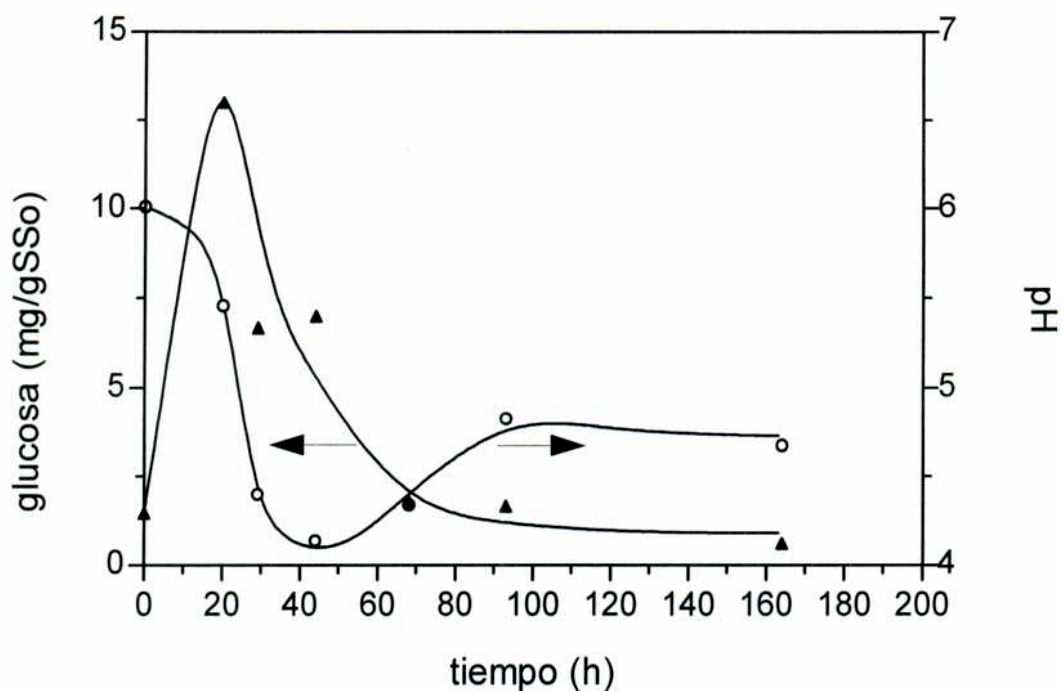


Figura III.28: Evolución de: ▲ contenido de glucosa y O pH en FES.

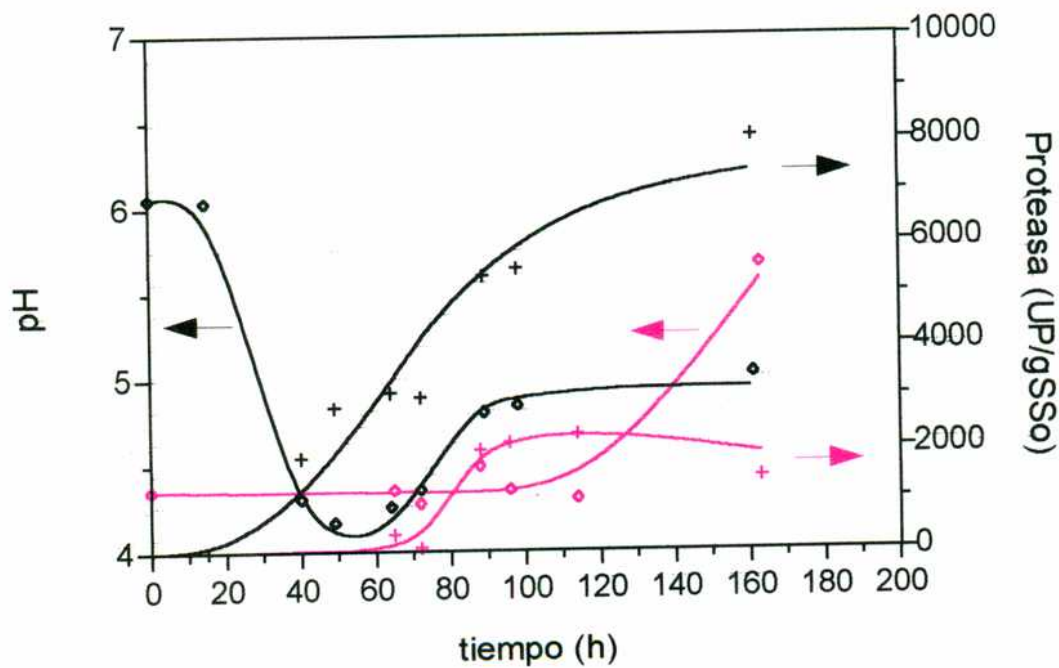


Figura III.29: Relación entre la evolución del pH y la producción de proteasa ácida a distintos pHs iniciales de la FES. T: 29°C, H₀: 40%.

pH₀ 6: + proteasa, ◇ pH.

pH₀ 4,4: + proteasa, ◇ pH.

Por lo tanto en este sistema de FES, si bien pueden no haberse agotado los hidratos de carbono del medio, su no muy abundante presencia, el consumo inicial por activación del sistema amilolítico de enzimas y los problemas de difusión de nutrientes en FES que no permiten que se acumulen en grado suficiente, hacen que en el hongo se induzca un progresivo cambio en la utilización de la fuente de carbono del medio, incrementando la producción de proteasas, el catabolismo de proteínas y aumentando así el pH del medio.

La **Figura III.29** muestra que cuando el pH_0 de la fermentación es más ácido (4,4), no se produce la señal de cambio en el pH y la proteasa sólo es producida en un nivel muy bajo sin incrementarse su síntesis.

6. Agua

La influencia del contenido y actividad de agua sobre el desarrollo de la FES, ha sido ampliamente reconocida. Estos parámetros son generalmente ajustados en su óptimo valor al inicio del proceso; sin embargo en sistemas en los que no se aplica control de humedad, se producirán cambios en las propiedades de sorción del medio, relacionados con las condiciones en que la fermentación se desarrolla (Prior, 1992).

Se pueden considerar tres fuentes principales de variación del contenido de agua: evaporación causada por la evolución del calor catabólico, consumo de agua para hidrólisis de biopolímeros, y agua producida por el metabolismo (Dorta, 1994).

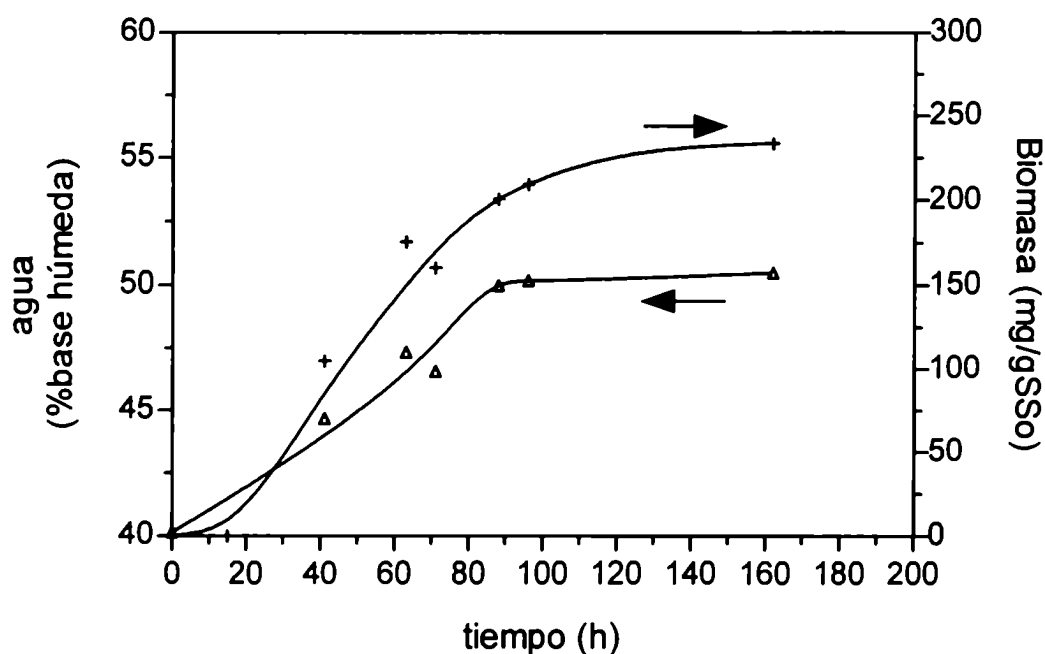


Figura III.30: Evolución de: + biomasa y Δ contenido de agua durante la fermentación. H_0 : 40%, T: 37°C, pH_0 : 6.

En FES, debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen, la generación de calor por los microorganismos es mucho mayor que en cultivo líquido. En la mayoría de estos sistemas, la transferencia del mismo por conducción y convección, es escasa debido a la pobre conductividad térmica de los sustratos sólidos y a la inexistente o

pobre agitación. Todo esto lleva a que la remoción de calor sea un factor crucial, y más aún en el escalamiento del proceso.

En sistemas con aireación forzada, la utilización del enfriamiento por evaporación ha demostrado gran eficiencia en muchos casos llegando a remover hasta el 80% del calor generado, pero esto puede llevar a una gran pérdida de humedad con el consecuente secado de los sólidos y frenado de la fermentación.

La tasa de evaporación-enfriado, puede ser controlada por la regulación de la velocidad de flujo de aire seco balanceado con el rociado de agua fría sobre el sustrato, o bien por la modificación de la humedad relativa del aire que fluye a través de la cámara, lográndose así un ajuste integrado de temperatura y humedad (Lonsane, 1992b).

En cambio, cuando la fermentación es realizada sin aireación forzada, dentro de cámaras en las que no siempre puede mantenerse un control de la humedad relativa, como corresponde al sistema aquí estudiado, no deben despreciarse ninguna de las fuentes de variación del contenido de agua.

En la **Figura III.30** se observa la relación existente entre la evolución del contenido de agua y la biomasa, incrementándose linealmente durante la fase exponencial y llegando al plateau en fase estacionaria, lo que lo hace un buen indicador del crecimiento fúngico. Como fue observado previamente, el descenso del peso seco seco del sistema acompaña dicha evolución (**Figura III.14**).

La variación del contenido de agua inicial en la FES, entre 38% y 48%, lleva a un desarrollo paralelo del contenido de humedad (**Figura III.31**). Se observa un ascenso sin grandes diferencias durante la fase de activo crecimiento del hongo que oscila entre 4,5 y 7% respecto de la condición inicial, para luego mantenerse constante o decaer levemente. Este incremento similar en el contenido de humedad es la resultante de un crecimiento fúngico semejante, no existiendo diferencia significativa entre los valores máximos de biomasa alcanzados en todos los casos.

La disminución del pH inicial de la fermentación, a 29°C, coincidentemente con el efecto causado sobre el crecimiento del hongo, prolonga la fase lag en la evolución del contenido de agua, desde 20 horas (pH inicial 6, tal cual), a aproximadamente 50 y 70 horas (pH inicial 5,4 y 4,4, respectivamente), lo que lleva a la pérdida de humedad inicial en el sistema ante la ausencia de actividad metabólica (**Figura III.32**). El

incremento en contenido de agua hasta la fase estacionaria, varió de 7% (pH inicial 6), a 4-5% respecto del valor inicial, con la acidificación inicial del medio.

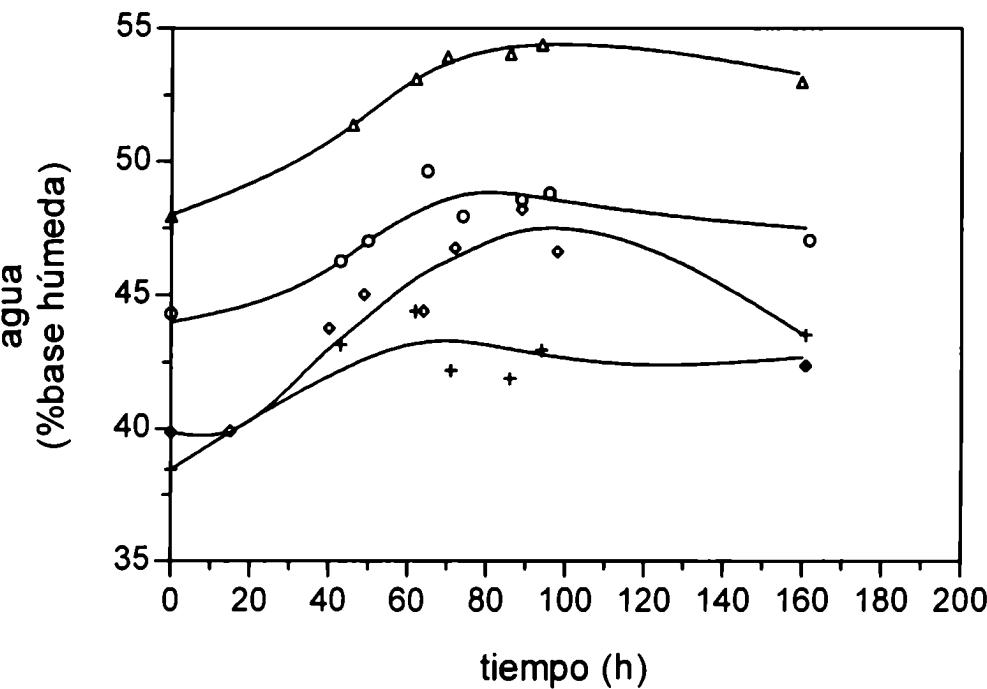


Figura III.31: Efecto del contenido de agua inicial sobre la evolución del contenido de agua de la FES. H_0 : + 38%, ◇ 40%, O 44%, Δ 48%. T: 29°C, pH_0 : 6.

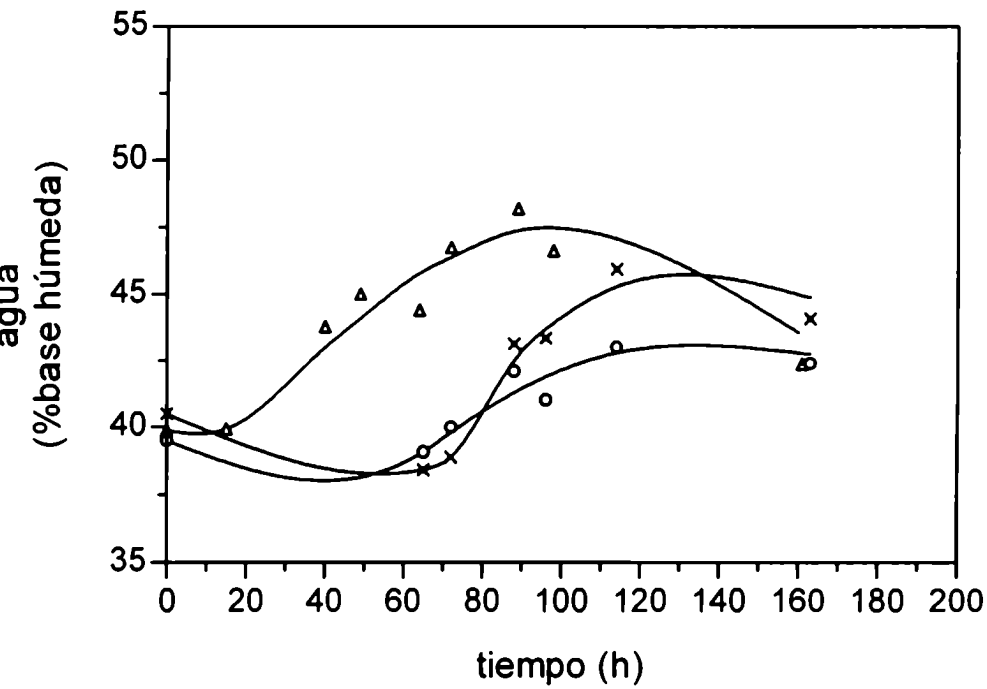


Figura III.32: Efecto del contenido de agua inicial sobre la evolución del contenido de agua de la FES. pH_0 : x 4,4 , O 5,4 , Δ 6. T: 29°C, pH_0 : 6.

La **Figura III.33** muestra que el ascenso en la temperatura de incubación de 29°C a 37°C, si bien no provoca diferencias significativas en el contenido de humedad durante la fase exponencial, sí lo hace al entrar en fase estacionaria incrementándose el mismo en 7% y 10% respectivamente, por encima del valor inicial, coincidiendo esta diferencia con una mayor biomasa máxima observada a 37°C.

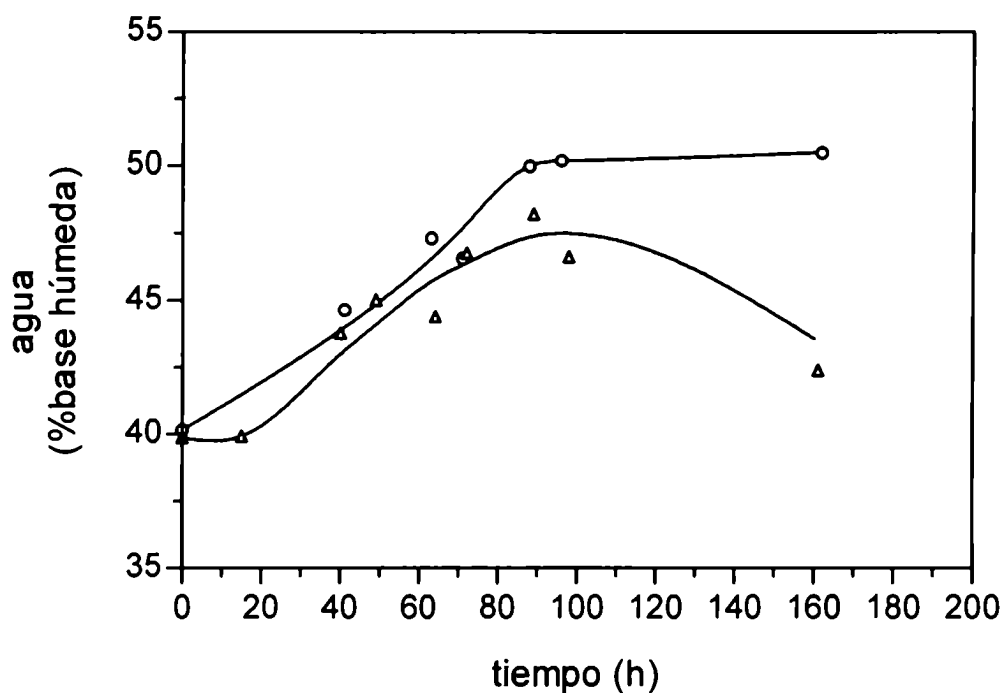


Figura III.33: Efecto de la temperatura sobre la evolución del contenido de agua de la FES. T: Δ 29°C, ○ 37°C. H_0 : 40%, p H_0 : 6.

Si bien la evolución del contenido de agua de la fermentación acompaña el crecimiento, no es indicativo del agua disponible para los requerimientos del microorganismo.

Narahara (1982) estableció que la A_w del sustrato irá variando por la acción del microorganismo sobre el mismo, a través de la liberación de metabolitos, como azúcares reductores, y por el balance de agua del sistema.

En la **Figura III.34** se muestra el perfil de actividad de agua determinado experimentalmente en las condiciones óptimas de obtención de proteasa (T: 37°C, pH_0 :6, H_0 :40%). Si bien el contenido de agua de la fermentación aumenta, la A_w disminuye de 0,97 a 0,96 a las 20 horas, como consecuencia del incremento de la concentración de azúcares reductores en el medio. La posterior disminución de los

mismos permite el ascenso del A_w a 0,98 a las 55 horas, para luego ir descendiendo gradualmente por el balance entre la acumulación de ácidos orgánicos y aminoácidos, a causa del metabolismo fúngico, y la tendencia a una mayor pérdida de agua del sistema a tiempos largos de fermentación. El A_w final alcanzado: 0,90, ha sido ya reportado en FES, como inhibidor del crecimiento en *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*, por disminución de la transferencia de masa y de la disponibilidad de agua para el microorganismo (Narahara, 1982; Oriol, 1988).

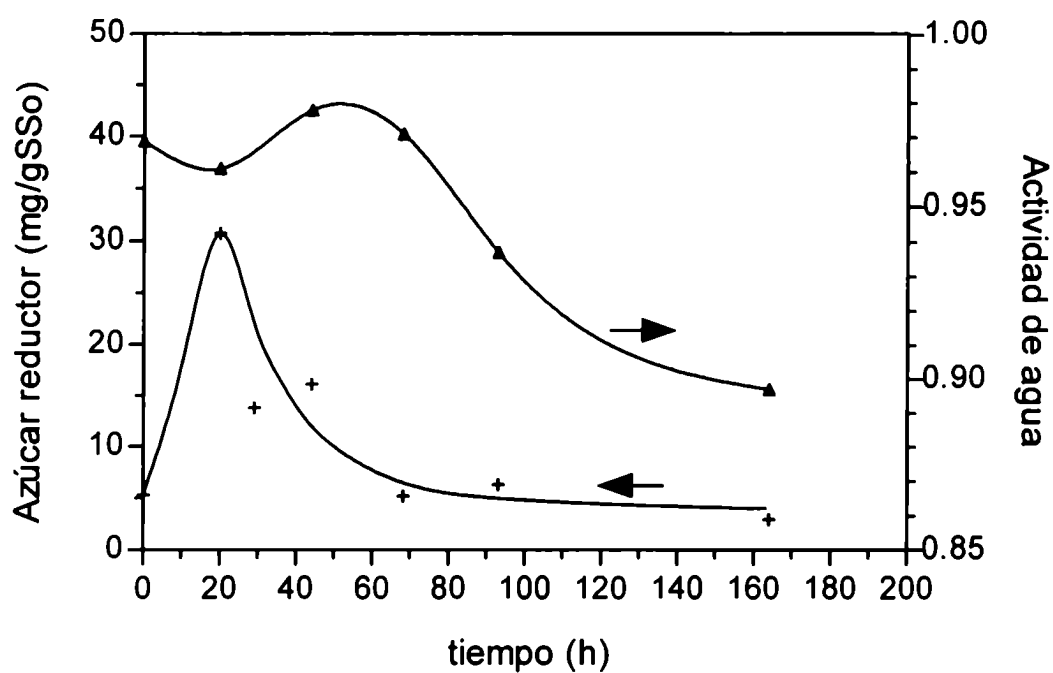


Figura III.34: Evolución de: ▲ actividad de agua y + azúcares reductores durante la fermentación. T: 37°C, pH₀:6, H₀: 40%.

Dorta (1994), analizó el balance de agua en un sistema de FES sin aireación forzada similar al aquí estudiado, considerando todas las fuentes de variación de la misma.

Considerando ΔP_w y $\Delta P'_s$, como las pérdidas de peso húmedo y seco, determinadas antes y después del secado del sustrato fermentado, se pueden deducir los siguientes balances de masa:

$$(III.17) \quad \Delta Ps' = \Delta O_2 - \Delta CO_2 - \Delta V - (H_2O)_m + (H_2O)_h$$

$$(III.18) \quad \Delta Pw = \Delta O_2 - \Delta CO_2 - \Delta V - (H_2O)_{rel}$$

Donde:

$$\Delta Ps' = Ps_{(t)} - Ps_{(0)}$$

$$\Delta Pw = Pw_{(t)} - Pw_{(0)}$$

$Ps_{(t)}$: peso seco a tiempo t (g).
 $Ps_{(0)}$: peso seco inicial (g).
 $\Delta Ps' = -\Delta Ps_{(t)}$ en (III.4).
 $Pw_{(t)}$: peso húmedo a tiempo t (g).
 $Pw_{(0)}$: peso húmedo inicial (g).
 ΔO_2 : oxígeno consumido (g).
 ΔCO_2 : dióxido de carbono producido (g).
 ΔV : productos volátiles producidos (g).
 $(H_2O)_m$: agua producida por el metabolismo de carbohidratos (g).
 $(H_2O)_h$: agua consumida por la hidrólisis de carbohidratos (g).
 $(H_2O)_{rel}$: agua perdida del sistema por evaporación (g).

Combinando (III.17) y (III.18), se obtiene una ecuación de balance de agua:

$$(III.19) \quad (\Delta Ps' - \Delta Pw) = (H_2O)_h + (H_2O)_{rel} - (H_2O)_m$$

Como

$$(III.20) \quad (\Delta Ps' - \Delta Pw) = (H_2O)_0 - (H_2O)_t$$

$(H_2O)_0$: agua inicial.
 $(H_2O)_t$: agua final al tiempo t.

El agua a un tiempo t será:

$$(III.21) \quad (H_2O)_t = (H_2O)_0 - (\Delta Ps' - \Delta Pw)_t$$

Y la fracción de agua perdida por el sistema $(H_2O)_p$:

$$(III.22) \quad (H_2O)_{p(t)} = [(H_2O)_0 - (H_2O)_{(t)}] / (H_2O)_0$$

Y considerando (III.20) y (III.19) será:

$$(III.23) \quad (H_2O)_{p(t)} = [(H_2O)_{h(t)} + (H_2O)_{rel(t)} - (H_2O)_{m(t)}] / (H_2O)_0$$

Si el agua producida por el metabolismo $(H_2O)_{m(t)}$ es mayor que la suma del agua perdida por hidrólisis del sustrato y por evaporación, el término $(H_2O)_{p(t)}$ resultará negativo y el sistema tendrá una ganancia neta de agua. En la situación inversa, el coeficiente será positivo y el sistema habrá perdido agua.

Teniendo en cuenta que en las condiciones de fermentación ensayadas, la humedad relativa de la cámara de cultivo fue aproximadamente 30%, y que la A_w inicial del sistema varió entre 0,949 y 0,983, existe a priori un gradiente evidente de humedad relativa entre la fermentación y el exterior, lo que llevaría al sistema a la pérdida de agua y a su secado, a menos que esto sea balanceado por la producción de agua metabólica por el hongo.

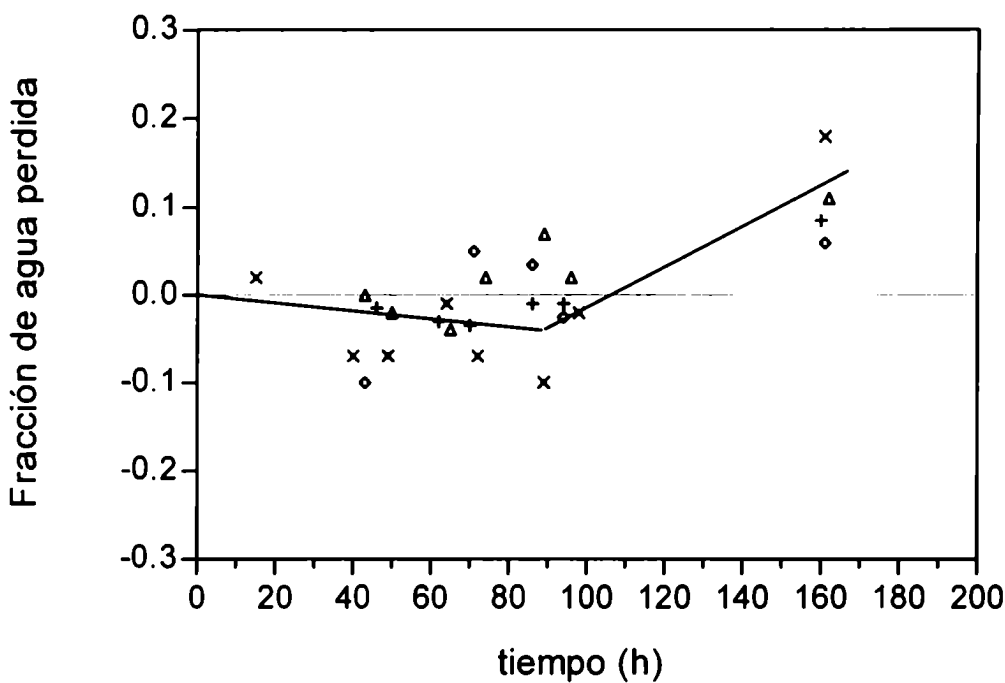


Figura III.35: Efecto del contenido de agua inicial sobre la evolución de la fracción de agua perdida de la FES.
 H_0 : ◇ 38%, × 40%, Δ 44%, + 48%. T: 29°C, pH_0 : 6.
Símbolos: datos experimentales promedio. Línea: tendencia.

En la **Figura III.35** se observa la fracción de agua perdida del sistema, calculada según **(III.22)**, para las distintas condiciones iniciales de contenido de agua de 38% a 48% (base húmeda). Se puede delinear una tendencia general con una leve ganancia de agua por parte del sistema durante la fase exponencial donde el agua generada por el metabolismo supera al agua perdida por evaporación y por hidrólisis. A partir de las 100 horas, cuando el sistema entra en fase estacionaria y el sustrato sólo es consumido para mantenimiento, el agua metabólica es baja y la consumida por hidrólisis despreciable.

En esta etapa el agua eliminada por evaporación tiene por lo tanto mayor peso en el balance, resultando en una pérdida neta del agua del sistema.

La fracción de agua perdida al tiempo final de fermentación (162 horas), tiene una relación con la A_w inicial de los sistemas (0,949 a 0,983 correspondiente a un contenido de agua inicial de 31 a 48%), que se muestra en la **Figura III.36** . Se observa que la pérdida de agua del sistema se agudiza a valores de A_w inicial inferiores a 0,96 , muy probablemente por verse disminuida comparativamente la generación de biomasa.

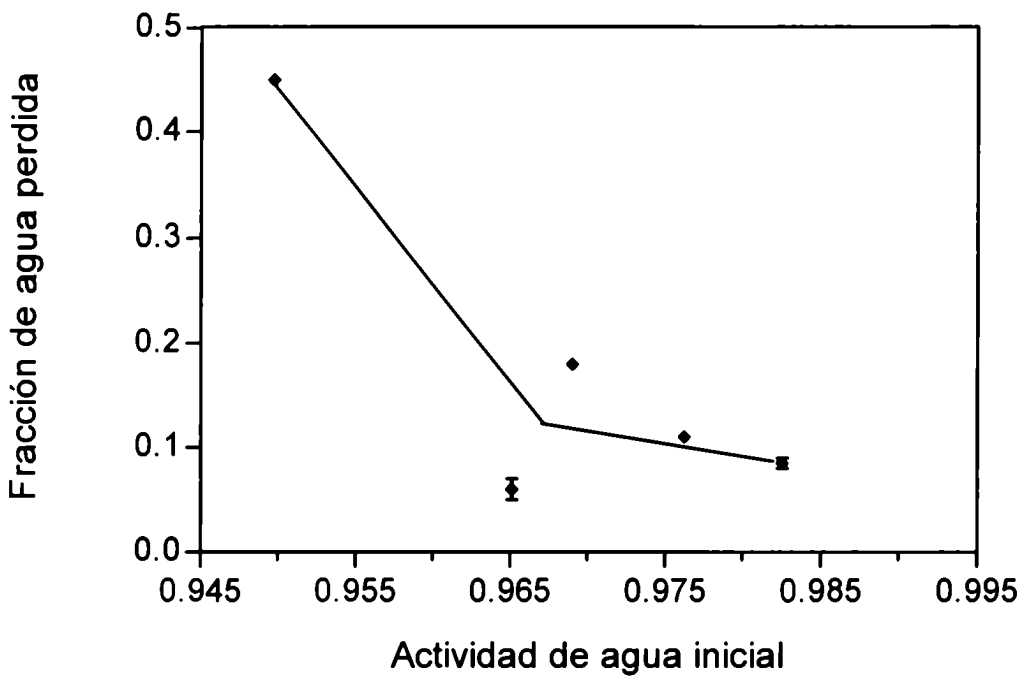


Figura III.36: Efecto de la actividad de agua inicial sobre la fracción de agua perdida final de la FES.
Símbolos: datos experimentales promedio. Línea: tendencia.

La modificación del pH inicial del cultivo de 6 a 5,4 (29°C, H_o 40%), no afecta sensiblemente a la fracción de agua perdida en el tiempo, observándose una leve ganancia de agua del sistema durante la fase exponencial, y la pérdida de la misma en fase estacionaria, por las causas ya descriptas (**Figura III.37**). Sin embargo la acidificación inicial del medio a 4,4 ,con el aumento de la fase lag, lleva al sistema a no poder minimizar las diferencias de humedad relativa con el exterior, y por lo tanto a ser afectado principalmente por la evaporación con una pérdida de agua lineal hasta las 70

horas, momento en que la misma comienza a disminuir a causa de la generación de agua por el crecimiento fúngico pero sin llegar a la compensación, para finalmente en la fase estacionaria incrementarse nuevamente la pérdida. En los tres casos, para el tiempo final de la fermentación (162 horas), se observa una pérdida de agua similar.

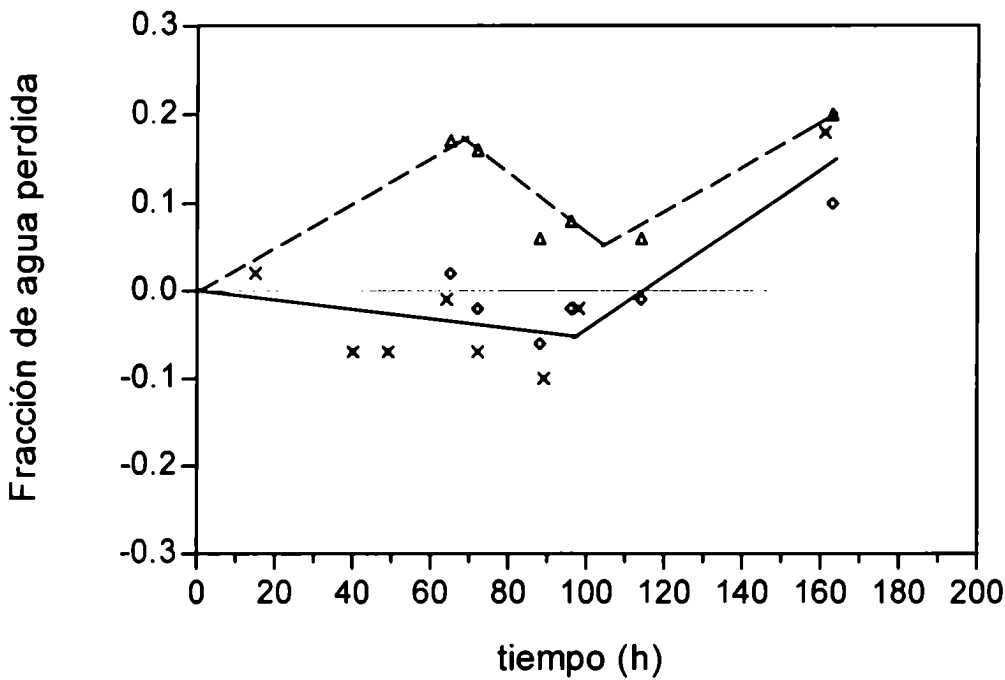


Figura III.37: Efecto del pH inicial sobre la evolución de la fracción de agua perdida de la FES.
pH₀: × 6, ◇ 5,4 , Δ 4,4. T: 29°C, H₀: 40%.
Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: tendencias.

El aumento de la temperatura de fermentación de 29°C a 37°C, marca mayores diferencias en la evolución de la fracción de agua del sistema (**Figura III.38**). Durante la fase exponencial el sistema llega a duplicar la ganancia de agua, por una mayor agua metabólica generada que supera las pérdidas del balance, relacionado esto con la ya descrita observación de un significativo aumento de biomasa. Al entrar en fase estacionaria el agua metabólica generada a 29°C no llega a compensar las pérdidas por evaporación y el sistema pierde agua, en cambio a 37°C, si bien la evaporación reduce la ganancia de agua en el balance, no llega a compensarla, y la fracción de agua perdida permanece negativa.

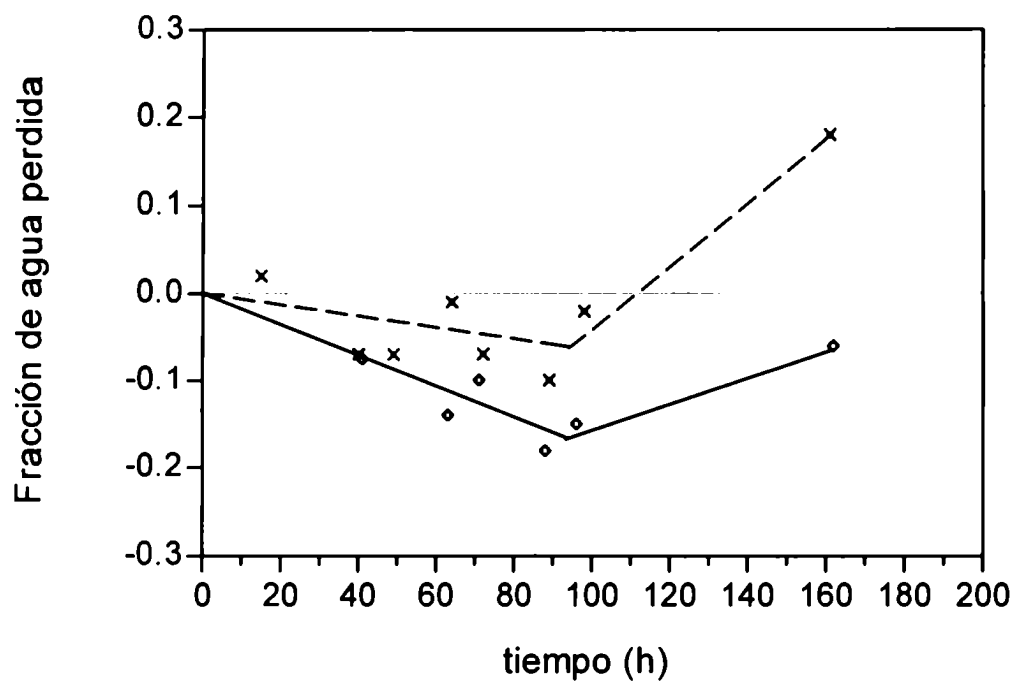


Figura III.38: Efecto de la temperatura sobre la evolución de la fracción de agua perdida de la FES. T: × 29°C, ◇ 37°C. H₀: 40%, pH₀: 6. Símbolos: datos experimentales promedio. Líneas: tendencias.

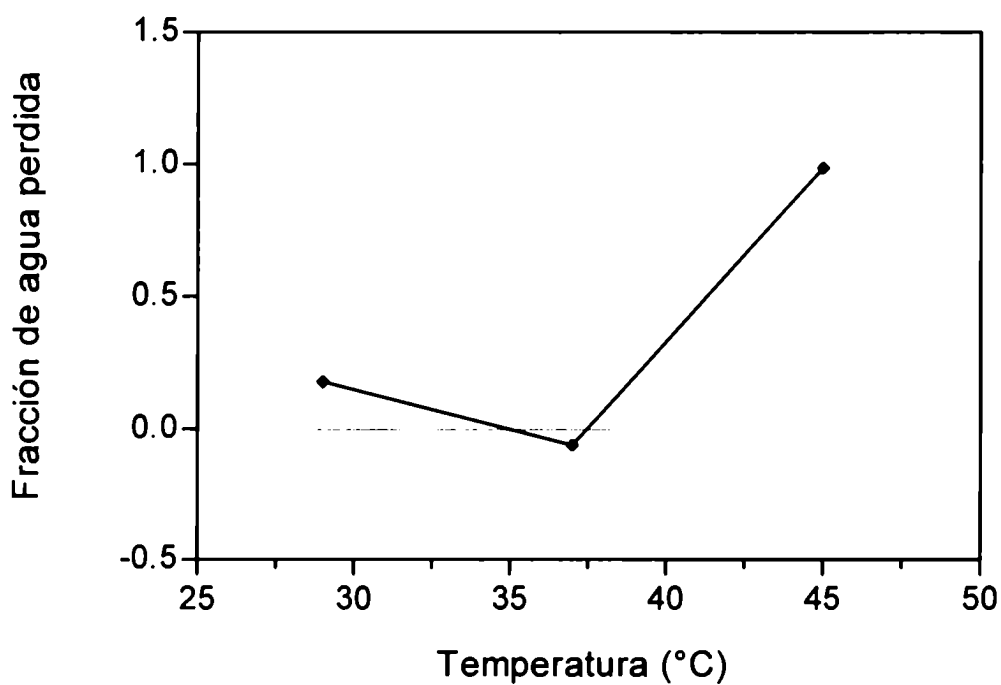


Figura III.39: Efecto de la temperatura sobre la fracción de agua perdida final de la FES. Símbolos: datos experimentales promedio. Línea: tendencia.

La observación de la fracción de agua perdida en el tiempo final de fermentación (162 horas), en el rango de temperaturas de incubación de 29°C a 45°C, indica que la misma se incrementa notablemente al aumentar la temperatura hasta 45°C. Esto es debido fundamentalmente al aumento de la evaporación a altas temperaturas, frente a la escasa agua metabólica producida por el crecimiento pobre del hongo ante una temperatura límite para el mismo (**Figura III.39**).

Por lo tanto se puede concluir que la mayor producción de enzima se produce a 37°C, en una optimizada relación de humedades relativas iniciales, interna y externa (aproximadamente 97% y 30% respectivamente), y con una ganancia neta de agua durante toda la evolución de la FES.

7. Efecto combinado de variación de la concentración de NaCl y del contenido de agua inicial del sustrato sobre la máxima producción de proteasa y conidios

Durante el screening en placas de agar leche se comprobó que el descenso del A_w del medio a 0,963 por agregado de NaCl, incrementaba la capacidad proteolítica de la cepa *Aspergillus niger* 91 respecto de la obtenida en el medio tal cual.

Por lo tanto con el objetivo de analizar el efecto de la adición creciente de NaCl a distintos niveles de humedad inicial del sustrato sobre la producción total de proteasa y conidios, se prepararon sistemas de FES combinando 3 niveles de H_0 : 37, 44 y 49 %, con 4 niveles de sal: 0; 0,047; 0,754 y 1,57 %, a 29°C y pH₀ 6.

Previamente se quiso descartar la existencia de efectos específicos de la sal sobre la capacidad hidrolítica de la enzima. Para ello se agregaron concentraciones de NaCl, similares a las que se pretendía agregar en las fermentaciones, a un extracto enzimático obtenido por fermentación en un medio sin sal. No se observaron diferencias significativas entre las actividades proteásicas medidas con o sin sal.

Los resultados obtenidos en FES fueron modelados mediante un análisis de Regresión Múltiple, obteniéndose buen ajuste para (III.24) producción de proteasa con R^2 : 0,96 $p < 0,0001$ y (III.25) para conidiación con R^2 : 0,88 $p < 0,0001$.

$$(III.24) \quad UP = 3354,68 \cdot H - 48,25 \cdot H^2 + 836,64 \cdot H \cdot Na - 27530 \cdot Na^2$$

$$(III.25) \quad Co = 2,78 \cdot 10^7 \cdot H^2 - 1,98 \cdot 10^{10} \cdot Na$$

Siendo:

UP: proteasa (unidades totales).
Co: número de conidios totales.
H: contenido de agua inicial %.
Na: concentración de NaCl %.

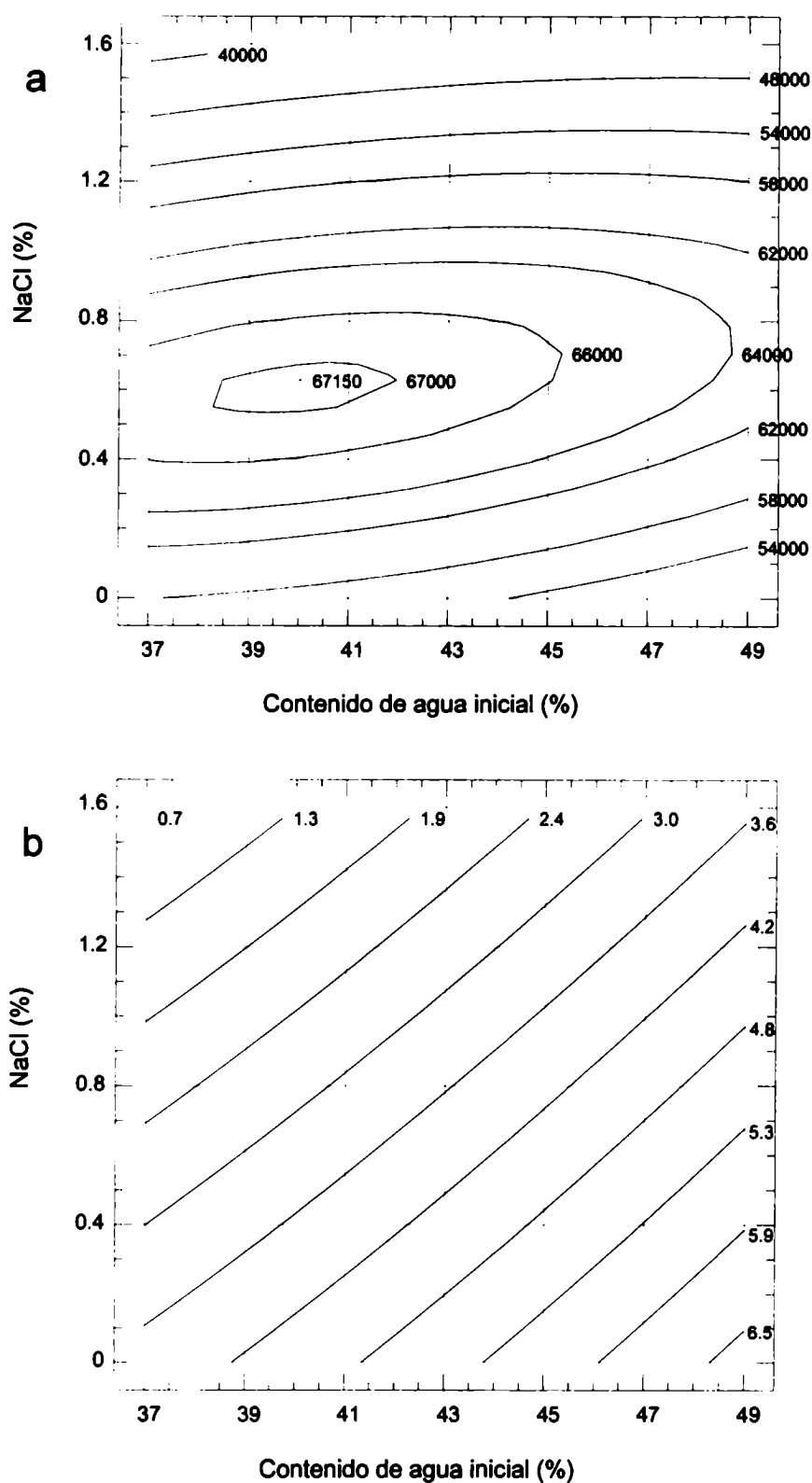


Figura III.40: Efecto combinado del contenido de agua inicial y adición de NaCl en la FES sobre:
a) producción de proteasa, **b)** conidiación.
 Las líneas de contorno unen puntos de igual producción de proteasa (UP total) o conidios (n° conidios totales $\times 10^{-10}$) según corresponda.

Del análisis estadístico del **modelo (III.24)** se desprende que si bien es el contenido de agua inicial del sustrato el parámetro de más peso en la producción de enzima, (explica un 91% de la variabilidad de los datos), existe un efecto sinérgico significativo del NaCl evidenciado en el término positivo de interacción (H.Na).

El análisis de las superficies de respuesta para la producción de proteasa en la **Figura III.40a** muestra que la adición de una concentración de hasta alrededor de un 1% de NaCl al sustrato incrementa la producción de proteasa hasta un 30% en el rango de humedad ensayado, disminuyendo la misma a mayores concentraciones de sal. Asimismo a menor contenido de agua inicial del medio es necesaria una menor adición de NaCl para alcanzar un mismo nivel de producción de enzima. El rango óptimo para la producción de proteasa es 38-42% H_0 y 0,5-0,7% NaCl, lo que se corresponde a una A_w de 0,950 a 0,963, inferior a 0,969 (40% H_0) para la cual se obtiene el máximo de producción de la proteasa sin agregado de sal al sustrato (**Figuras III.5a y b**).

La reducción del agua disponible por incremento de sal en el medio aumenta la producción de esta enzima, existiendo además un efecto estimulante del NaCl “per se” sobre su síntesis o bien sobre su secreción al medio externo.

Grajek (1987) observó que el A_w óptimo para la biosíntesis de β -glucosidasa en FES, dependía de la naturaleza del soluto depresor utilizado. La máxima producción de esta enzima fue hallada a A_w 0,98 usando NaCl y A_w 0,97 y 0,96 utilizando sorbitol y glicerol respectivamente.

Otros autores indican un efecto similar al aquí observado en cultivos en medio líquido.

Schilling (1996) encontró que la producción de fosfolipasa-C por *Listeria monocytogenes* era incrementada notablemente por adición de NaCl al medio de cultivo en un rango de temperaturas de 4 a 37°C.

Mildenhall (1983) atribuyó el rápido incremento de pectato liasa intracelular en *Erwinia chrysanthemi* a un aumento de su síntesis protéica como respuesta al cambio osmótico sucedido por disminución del A_w del medio a 0,99 con NaCl.

De igual modo el agregado de Na^+ y K^+ incrementó entre 30 y 50% la producción de proteasa y α -amilasa en cultivos de *Aspergillus oryzae* (Ustyuzhanina, 1984).

Oteng-Gyang (1980) menciona la existencia de efectos iónicos sobre la membrana celular que pueden estimular la liberación de enzimas extracelulares.

Por otro lado Kelavkar (1992) describió otro rol fisiológico de las proteasas ante condiciones de stress salino. La adición de NaCl 2M a un cultivo en medio líquido de *Aspergillus repens* causa incremento del pool de aminoácidos libres, de enzimas del metabolismo de carbohidratos que proveen intermediarios en la vía de biosíntesis de los aminoácidos, y de las proteasas intracelulares ácida, neutra y alcalina en todas las fases de crecimiento. La acumulación de aminoácidos permite atraer agua al interior de la célula y en el caso particular de los aminoácidos ácidos y de la prolina pueden asociarse con Na^+ o K^+ regulando el exceso de carga que puede ser deletérea.

El recambio de proteínas resulta fundamental en el proceso de adaptación de las células a las nuevas condiciones ambientales, de este modo el aumento de proteasas favorece por un lado la modificación de las proteínas y por otro lado su degradación, aumentando el pool de aminoácidos los que además de cumplir las funciones ya mencionadas serán utilizados en síntesis de nuevas proteínas.

Del análisis del **modelo (III.25)**, se concluye que mientras el aumento del contenido de agua inicial del sustrato estimula progresivamente la conidiación, la adición de NaCl ejerce un efecto negativo sobre la misma. El análisis de las superficies de respuesta para la conidiación (**Figura III.40b**) muestra el efecto negativo del NaCl sobre la misma a todos los niveles de H_0 llegando a reducirse en más del 80% (respecto del sustrato sin sal), en el nivel mínimo de H_0 y máximo de sal testeado (37% H_0 y 1,57% NaCl). Sin embargo este efecto negativo es menor a mayores niveles de H_0 , así por ejemplo la adición de 1,57% NaCl al sustrato con 49% H_0 disminuye la conidiación un 46%.

Considerando los resultados previos obtenidos donde se concluyó que la conidiación era máxima a contenidos de agua superiores al 40% (medio sin sal), la adición de sal al medio por debajo de este valor de H_0 disminuye el agua disponible, alejando aún más al sistema del A_w óptimo. Sin embargo a valores superiores de H_0 se hace evidente un efecto limitante del NaCl sobre la conidiación por sí mismo, más que a través de la reducción de la disponibilidad de agua. Este efecto del NaCl sobre la esporulación fue previamente observado en cultivos de *Aspergillus oryzae* (Ueno, 1987) y *Bacillus cereus* (Troller, 1980).

Los resultados indican que mediante el agregado de NaCl es posible mejorar la producción de proteasa y disminuir la de conidios, siendo esto de importancia dado que

no es deseable un gran desarrollo de los mismos en procesos de producción de metabolitos en FES.

Así con 40% H_0 y 0,6% NaCl (29°C), se incrementa la enzima en un 20% y se reduce la conidiación un 30% respecto del sustrato sin sal; sin embargo puede sacrificarse parcialmente la obtención máxima de proteasa en función de lograr mayor disminución aún de la conidiación. Considerando esto último y a modo de ejemplo, en un sistema con 38% H_0 y 1,05% NaCl la conidiación se reduce un 60% mientras que la producción de proteasa es semejante a la máxima obtenida en un sistema sin adición de sal (40% H_0). Variaciones similares en la conidiación a las aquí obtenidas han sido consideradas de significancia por otros autores en cultivos para producción de esporas de *Trichoderma harzianum* (Roussos, 1991), *Beauveria bassiana* (Ayala, 1996) y *Penicillium oxalicum* (Pascual, 1997).

El aumento de la temperatura de fermentación de 29 a 37°C permitía reducir la esporulación un 40% y alcanzar la máxima producción de proteasa en este sistema. Los resultados aquí obtenidos permiten especular que un efecto combinado de temperatura y concentración de NaCl óptimas lograría una disociación mayor entre la obtención de proteasa y la conidiación, mejorando las condiciones sanitarias de la FES y facilitando así la recuperación de la enzima.

CAPÍTULO IV

*Caracterización del extracto proteolítico de
Aspergillus niger 91 producido por FES*

1. Caracterización del extracto crudo

El seguimiento puntual de los datos experimentales en las condiciones óptimas de la FES en la **Figura IV.1**, al igual que en la mayoría de las distintas condiciones ambientales ensayadas, muestra la presencia de puntos de inflexión en la producción de proteasa a las 72 y 96 horas, que son generalmente evidenciados también en las curvas de biomasa.

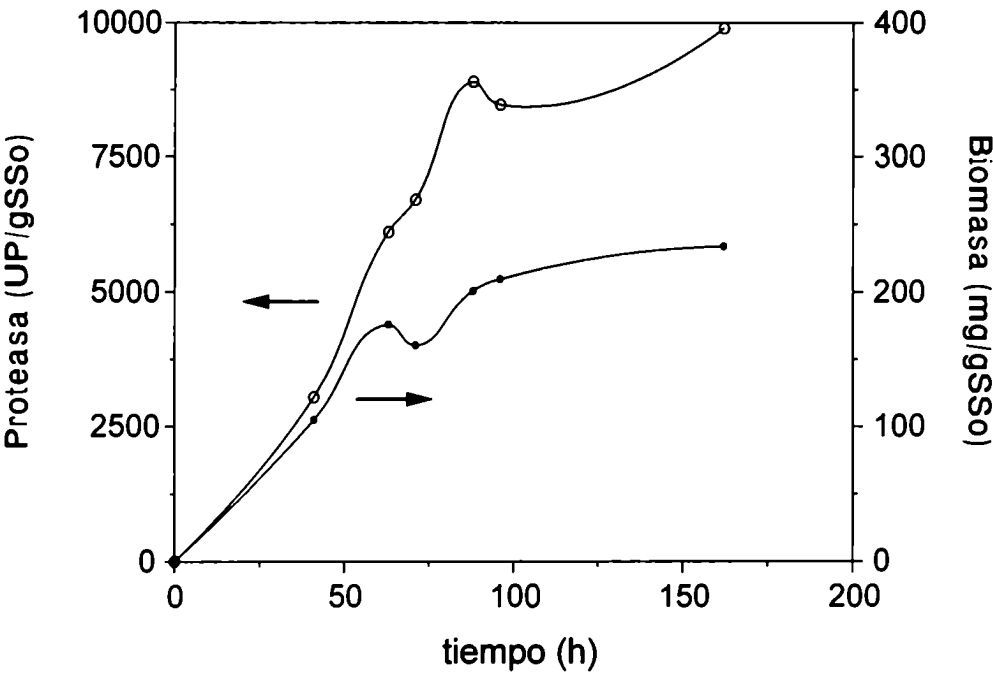


Figura IV.1 : Evolución experimental en FES de la producción de:
O proteasa y ● biomasa. T: 37°C, pH₀: 6 H₀: 40%.

Yang y Lin (1998) coincidieron en esta observación en un proceso de producción de proteasa ácida sobre efluentes de destilerías de arroz con cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori*. En ese caso, si bien la máxima producción de la enzima se alcanzaba en ocho días de fermentación, al cuarto día se producía una caída momentánea de la misma y de la masa seca fúngica obtenida atribuída en este caso a una deficiencia en la provisión de oxígeno.

Por lo tanto se consideró de importancia caracterizar el extracto a las 72 y 96 horas de fermentación, tiempos en los cuales aparecen los mencionados puntos de inflexión,

teniendo en cuenta además que próxima a este último tiempo se encuentra la máxima productividad de proteasa de la fermentación.

1.1. Temperatura óptima y estabilidad

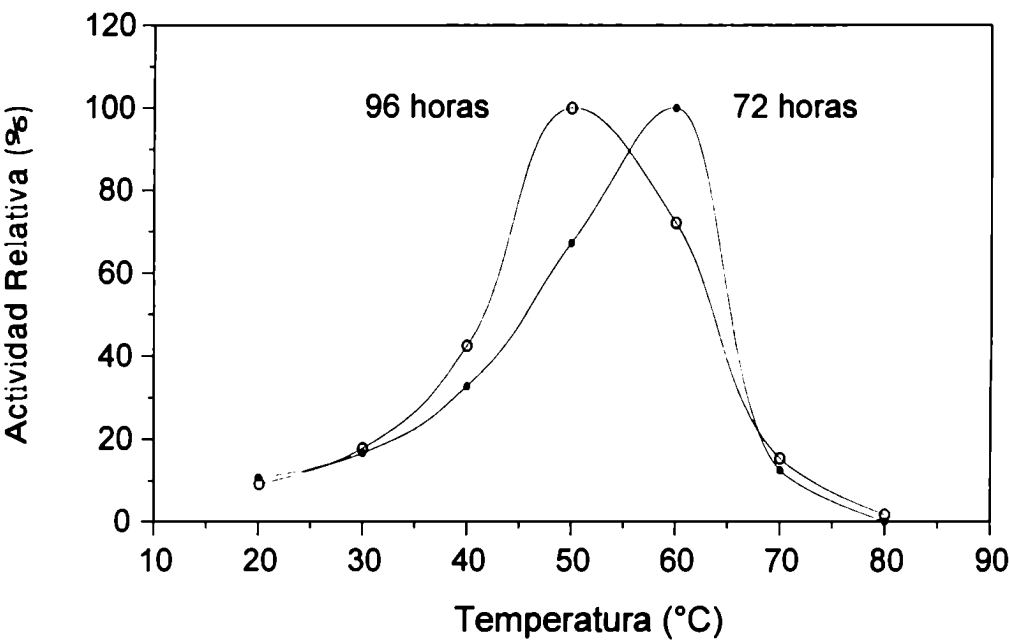


Figura IV.2 : Efecto de la temperatura de reacción en la actividad de proteasa ácida de *Aspergillus niger* 91.
Extractos de: ● 72 y ○ 96 horas de fermentación.
Actividad Relativa %: actividad relativa al óptimo de T (en cada extracto) x 100.

En la **Figura IV.2** se observa la variación de actividad proteásica ante distintas temperaturas de reacción entre 20 y 80°C. Los extractos de 72 y 96 horas de fermentación mostraron la misma baja actividad relativa al óptimo, en los extremos de temperatura, inactivándose a 80°C y mostrando una baja actividad (entre 10 y 20%) a 20-30 y 70°C. Sin embargo el resto del perfil es diferente. En el extracto de 72 horas la actividad es máxima a 60°C, siendo aún elevada a 50°C (70%) y teniendo 33% a 40°C. En el extracto de 96 horas el óptimo de temperatura es inferior (50°C), teniendo 72% a 60°C, y 43% a 40°C.

No se encontró diferencia entre estos óptimos de temperatura y los correspondientes a otras proteasas ácidas obtenidas tanto por fermentación sólida como líquida. Así

óptimos de actividad entre 50 y 60°C se han mencionado para proteasas provenientes de otras cepas de *Aspergillus niger* (Bosmann, 1973; Yang, 1986; Singh, 1994), *Penicillium camemberti* (Chrzanowska, 1995), *Mucor pusillus* (Somkuti, 1968) y *Rhizopus oligosporus* (Ikasari, 1996). Como una excepción puede mencionarse a la termopsina, una proteasa ácida extracelular producida por *Sulfobolus acidocaldarius* (bacteria termófila), la que presenta su máxima actividad a 90°C (Lin, 1992 y 1995).

Considerando proteasas comerciales producidas por *Aspergillus niger*, tanto la Proteasa ácida L de Biocon-Quest, como la Proteasa ácida fúngica de Deerland exhiben un óptimo a 60°C como el correspondiente al extracto de 72 horas de fermentación.

El análisis de la actividad residual en el tiempo incubando a distintas temperaturas, expuesto en las **Figuras IV.3a y b**, también mostró diferencias entre los extractos. Se observa que el extracto de 72 horas aún retiene el 80% de actividad durante 60 y 120 minutos de incubación a 30 y 40°C, mientras que el extracto de 96 horas retiene el 100% (valores superiores a este porcentaje pueden haberse producido por inactivación de algún inhibidor).

A 50°C el comportamiento del extracto de 72 horas es oscilante: luego de 30 minutos de incubación retiene un 76% de actividad, pero a los 60 minutos ésta se eleva al 100%, para caer nuevamente a los 120 minutos al 40%, hecho que podría estar indicando la existencia de un balance entre la pérdida de la actividad de la enzima y la activación por proteólisis de un precursor. A diferencia de éste, el extracto de 96 horas es más lábil y presenta una pérdida de actividad constante en el tiempo a 50°C, reteniendo 40% de actividad a los 30 minutos, y sólo 20 y 10% a los 60 y 120 minutos respectivamente.

A 60 y 70°C el extracto de 96 horas no retuvo actividad proteásica después de 5 minutos de incubación, mientras que el de 72 horas retuvo el 40% luego de 5 minutos a 60°C decayendo totalmente a los 20 minutos; a 70°C luego de 10 minutos también pierde totalmente su actividad. Estos resultados son compatibles con los mostrados en la **Figura IV.2** ya que la temperatura óptima de acción de la enzima representa un balance entre el aumento de la velocidad de reacción y de inactivación térmica con la temperatura. Así el extracto de 96 horas que se inactiva a menores temperaturas presenta una temperatura óptima menor.

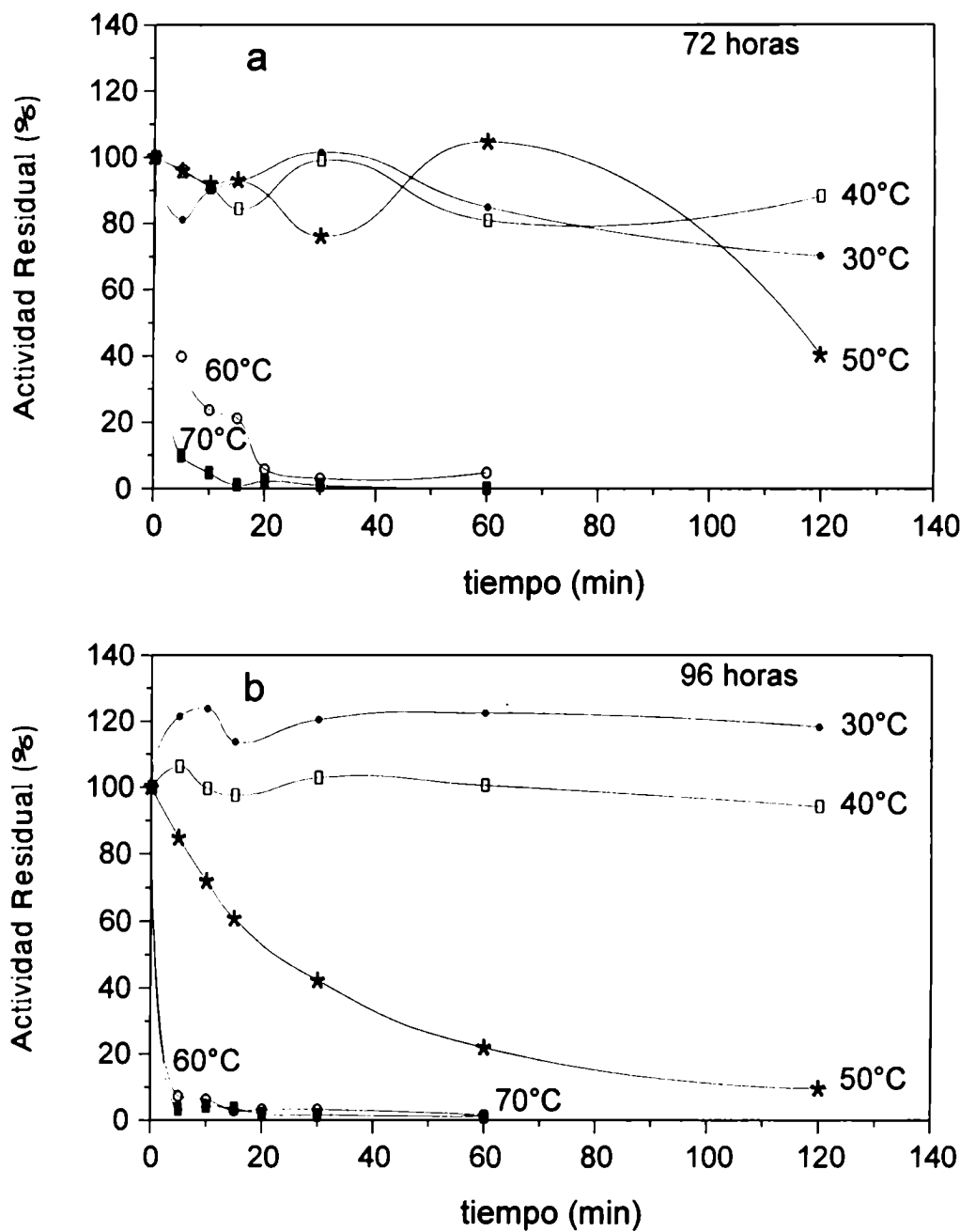


Figura IV.3 : Efecto de la temperatura en la estabilidad de la proteasa ácida de *Aspergillus niger* 91.
Extractos de: a) 72 y b) 96 horas de fermentación.
Los extractos fueron incubados a las temperaturas y tiempos indicados en el gráfico. La actividad residual determinada en condiciones estándar es expresada como porcentaje de la actividad inicial.

En general las proteasas ácidas muestran alta estabilidad hasta los 40°C, siendo ésta variable a partir de 50°C. Un perfil semejante al obtenido para el extracto de 72 horas de fermentación con alta estabilidad a 50°C y caída notable de actividad a 60°C ha sido

reportado para las proteasas ácidas de *Mucor pusillus* (Somkuti, 1968), y *Rhizopus oligosporus* (Ikasari, 1996). Inactivación total a partir de 60°C como en el extracto de 96 horas también fue observada para las proteasas ácidas de otras cepas de *Aspergillus niger* (Yang, 1986).

Proteasas ácidas termoestables fueron producidas por *Aspergillus fumigatus* (Piechura, 1989) y *Aspergillus niger* (Singh, 1994), con presencia de actividad residual a 70 y 80°C respectivamente.

Estas diferencias observadas en la estabilidad son independientes del sistema de fermentación empleado.

De modo similar a lo obtenido en el sistema de FES aquí analizado, las proteasas ácidas comerciales provenientes de *Aspergillus niger* (Biocon-Quest y Deerland), son estables hasta 50°C y se inactivan totalmente luego de 30 minutos a 60°C.

Wang (1970) comprobó la existencia de dos temperaturas óptimas de actividad proteolítica diferentes: 50 y 60°C en extractos fraccionados de fermentación sumergida de *Rhizopus oligosporus*, lo que estaba relacionado a un proceso de síntesis dependiente de las condiciones de cultivo, de diferentes formas de la enzima. Asimismo las fracciones con un óptimo de temperatura superior (60°C), eran más estables térmicamente y debían ser inactivadas a 70°C mientras que las restantes lo hacían a 60°C.

Tsujita (1976) también asoció diferencias en termoestabilidad observadas en un extracto proteolítico obtenido por fermentación de *Aspergillus oryzae* sobre salvado de trigo, a la presencia de dos proteasas ácidas distintas, una estable a 55°C mientras que la otra era inactivada totalmente a esa temperatura.

Por lo tanto dado el diferente comportamiento ante la temperatura de la actividad proteolítica de los extractos de 72 y 96 horas de fermentación de *Aspergillus niger* 91, se podría especular la existencia de al menos dos proteasas con distintos óptimos de temperatura y cuya proporción en el extracto varíe en el tiempo de cultivo y determine así las diferencias en estabilidad observadas.

El comportamiento térmico de los extractos fue también analizado a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC), en un intervalo de temperatura entre 20 y 120°C.

Graficando el flujo de calor en función de la temperatura de la muestra, se obtienen endotermas asociadas a la desnaturalización protéica y que se caracterizan por la temperatura de transición térmica (T_P) y la entalpía aparente involucrada ΔH , la cual se calcula a partir del área bajo la curva.

Para este análisis los extractos fueron ultrafiltrados (4°C) por membranas de 10000 Da de corte, luego liofilizados y resuspendidos en agua destilada para lograr una concentración mínima final de proteína de 15% P/V.

Las Figuras IV.4a-b y IV.5a-b, muestran los termogramas obtenidos para los extractos de 72 y 96 horas de fermentación a diferentes velocidades de calentamiento $\beta = 5$ y 10 °C/min respectivamente.

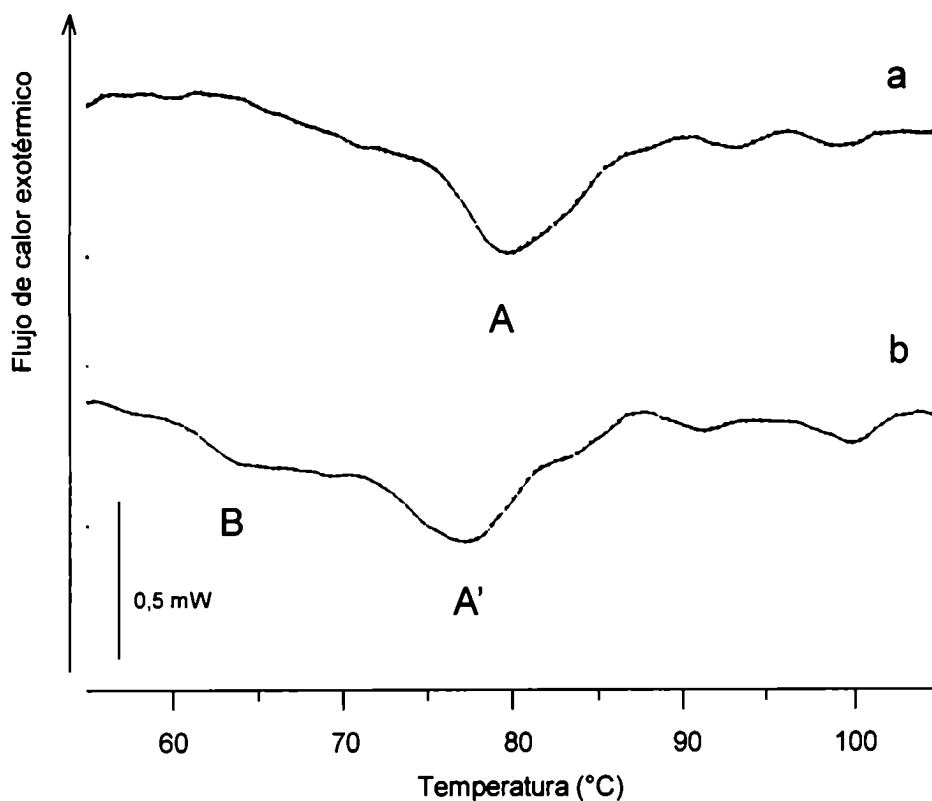


Figura IV.4 : Termograma (CDB) de extractos de FES de *Aspergillus niger* 91.
Calentamiento: 20-120°C, $\beta = 5^\circ\text{C/min}$. Extractos de:
a) 72 horas , materia seca 6,3 mg.
b) 96 horas , materia seca 6,3 mg.

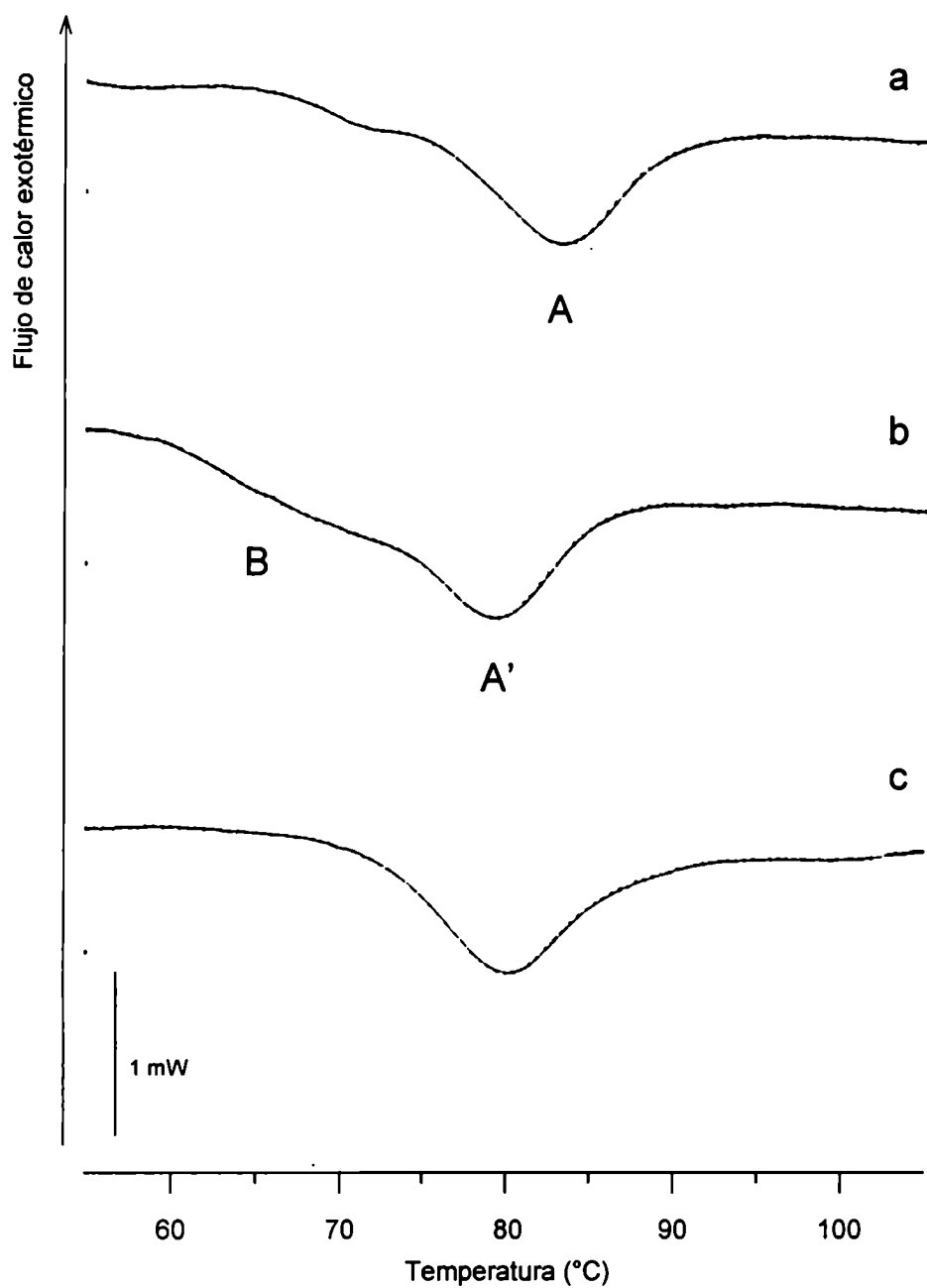


Figura IV.5 : Termograma (CDB) de extractos de FES de *Aspergillus niger* 91.

Calentamiento: 20-120°C, $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$. Extractos de:

a) 72 horas , materia seca 6,2 mg.

b) 96 horas , materia seca 6,3 mg.

c) 96 horas sometido a calentamiento inicial 20-70°C, enfriado, y calentamiento final 20-120°C, materia seca 6,2 mg.

En el extracto de 72 horas se observa una endoterma más simétrica (A) que en el de 96 horas (A'), evidenciándose en éste último una endoterma menor (B) a temperaturas de 63-66°C dependiendo de la velocidad de calentamiento.

Las transiciones térmicas correspondientes a los dos extractos se muestran en la **Tabla IV.1**. Las transiciones térmicas (T_p) indicadas como A y A', corresponderían a la misma fracción protéica. Las diferencias observadas en las T_p estarían asociadas a interacciones con la fracción B (Sessa, 1992).

La presencia de la endoterma B (solapada con A') en el extracto de 96 horas sugiere la existencia de algún componente protéico con menor estabilidad térmica. Para comprobarlo dicho extracto fue sometido a un calentamiento inicial de 20 a 70°C ($\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$) seguido de un enfriamiento rápido y nuevo calentamiento de 20 a 120°C ($\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$). La endoterma resultante observada en la **Figura IV.5c** se asemeja a la del extracto de 72 horas, confirmando la desnaturalización irreversible del componente de inferior termoestabilidad (endoterma B).

Tabla IV.1: Efecto de la velocidad de calentamiento (β) en los valores de T_p correspondientes a extractos de FES de *Aspergillus niger* 91.

		T_p	
Extracto	Componente	$\beta: 10^\circ\text{C}/\text{min}$	$\beta: 5^\circ\text{C}/\text{min}$
72 horas	A	$81,8 \pm 0,1$	$79,0 \pm 0,1$
96 horas	A'	$77,3 \pm 0,1$	$76,3 \pm 0,1$
	B	$65,9 \pm 0,1$	$63,4 \pm 0,1$

La velocidad de calentamiento es un parámetro que puede influir en la determinación de la temperatura de transición térmica, ya que la velocidad de desnaturalización de la proteína es relativa a la velocidad de entrada de calor a la muestra, y a velocidades altas se produce cierta inercia térmica (Wright, 1982).

Para eliminar este efecto, Bombara (1994) en su estudio sobre estabilidad térmica de una proteasa neutra de *Aspergillus oryzae* calculó la temperatura máxima de desnaturalización por extrapolación a $\beta= 0^\circ\text{C}/\text{min}$.

Si bien para realizar un análisis similar sobre los resultados obtenidos de los extractos de FES sería necesario tener información del comportamiento térmico de los mismos a un número mayor de velocidades de calentamiento, puede estimarse una tendencia a partir de los valores obtenidos en la **Tabla IV.1** que indica que la temperatura de desnaturalización de la fracción A o A' sería aproximadamente 15°C mayor que la correspondiente a la fracción B.

Asimismo y marcando una diferencia del mismo orden, las temperaturas de inicio de desnaturalización estimadas a partir de las endotermas obtenidas (**Figuras IV.4a-b**) son de $70 \pm 0,2^\circ\text{C}$ para el extracto de 72 horas y de $56,9 \pm 0,9^\circ\text{C}$ para el de 96 horas.

Esta variación entre extractos se corresponde por un lado con la diferencia existente entre las actividades residuales proteásicas medidas a distintas temperaturas de incubación, donde mientras el extracto de 96 horas era inactivado totalmente a corto tiempo a 60°C el de 72 horas lo era a 70°, y por otro con la existencia de un óptimo de actividad 10°C superior para este último extracto.

La desnaturalización se refiere a un cambio del plegado global de la proteína, es decir una ruptura de su estructura terciaria y frecuentemente secundaria, que constituye uno de los factores físicos de inactivación protéica. Siendo el incremento de la temperatura causal del desplegado de la molécula, la reversibilidad del proceso está definida en función de la capacidad de recuperar la estructura nativa sólo por disminución de la misma, siendo en cambio irreversible si resulta indispensable la participación de otro tipo de proceso para lograrlo (Manning, 1989).

Si bien las T_p obtenidas fueron similares a las reportadas para otras proteasas (Bombara, 1995) los ΔH resultan inferiores a éstos. A una velocidad de calentamiento de 10°C/min se obtuvo una entalpía de desnaturalización de $1,1 \pm 0,1$ J/g para el extracto de 72 horas, y de $2,3 \pm 0,1$ J/g para el de 96 horas, mientras que ΔH s de 7 J/g para proteasa neutra de *Aspergillus oryzae* (Bombara, 1994), y 10 J/g para quimotripsina (Öste-Triantafyllou, 1996) fueron reportados.

El incremento de temperatura durante la desnaturalización debilita primero las uniones H-H (reacción endotérmica) y favorece las interacciones hidrofóbicas por exposición de los grupos apolares ante el desdoblamiento de la molécula. Estas fuerzas presentan un máximo entre 60-80°C por encima del cual se debilitan provocando una disminución en

el valor entálpico por su exotermicidad. Estas dependencias opuestas con respecto al incremento de la temperatura constituyen la causa de desnaturalización de muchas proteínas en ese rango de temperatura. El bajo valor de entalpía hallado además de involucrar las posibles interacciones hidrofóbicas producidas durante el calentamiento, puede estar influenciado por otros factores de inestabilidad física que en general son considerados de naturaleza exotérmica como la asociación y agregación con aparición de intermediarios parcialmente desplegados (algunas veces seguidos por formación de uniones S-S intermoleculares), precipitación y adsorción a superficies (Manning, 1989; Mozhaev, 1993; Bombara, 1995).

También la inactivación química es favorecida por la exposición de la enzima ante el aumento de la temperatura pudiendo llevar a la pérdida irreversible de la actividad catalítica de la misma. Sin embargo dicha inactivación puede ocurrir sin el desplegado preliminar de la molécula.

Entre los distintos cambios en la estructura primaria cabe mencionar (Manning, 1989; Mozhaev, 1993):

- Deamidación por hidrólisis de amidas laterales unidas a residuos Gln o Asn para formar ácido carboxílico libre. Se ha postulado que juega un rol central en el envejecimiento, renovación y cambio de función de proteínas y que es responsable de la inactivación irreversible de algunas enzimas.

- Oxidación de cadenas laterales de Cys, Trp, Met, His y Tyr que ha sido asociado a la pérdida de actividad biológica en hormonas y cambios en parámetros cinéticos de enzimas con recuperación de su actividad luego de su reducción.

- Hidrólisis de uniones peptídicas por H^+ : fundamentalmente el carboxilo lateral de residuos Asp y también por mezclas de proteasas, llevando a inactivación irreversible.

- Reducción de uniones S-S por OH^- seguido por β -eliminación y reacción de los grupos SH formados con otras uniones S-S o con otros aminoácidos llevando a apareamientos y estructura tridimensional incorrectos.

- Modificación de grupos SH por mezclas de iones metálicos para formar mercáptidos.

- Racemización de aminoácidos.

En un intento de análisis de las cinéticas de inactivación térmica obtenidas (**Figuras IV.3a y b**) se observó que en la mayoría de los casos ésta no respondía a una cinética de primer orden donde la actividad enzimática es directamente proporcional a la forma enzimática nativa indicando un comportamiento más complejo. Si bien han sido descritos modelos de inactivación térmica para sistemas más complejos donde se tiene en cuenta la coexistencia de distintas poblaciones enzimáticas, de isoenzimas, de un equilibrio permanente de varios intermediarios o bien de reacciones reversibles e irreversibles (Vrábel, 1997), la aplicación de los mismos amerita la realización de ensayos más exhaustivos sobre ambos extractos.

Uno de los principales factores a tener en cuenta en dicha complejidad es la capacidad degradativa del extracto sobre sus propios componentes que debe sumarse a los procesos de desnaturalización u otros de inactivación ya mencionados. La existencia de autoproteólisis ha sido ampliamente reportada en hongos y bacterias, para la proteasa ácida A de *Aspergillus niger* (Takahashi, 1995), proteasa alcalina de *Cephalosporium* (Tsuchiya, 1987), serin proteasa de *Ophiostoma piceae* (Abraham, 1996), endoserin proteasa de *Arthrobacter aureus* (Michotey, 1994) y proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (Chellapandian, 1992).

Por otra parte la existencia de curvas oscilantes de actividad residual planteó la hipótesis de la activación de un precursor de la enzima en el tiempo de incubación.

La síntesis de diferentes tipos de proteasas provenientes de hongos y bacterias presenta un patrón común, esto es la traducción de la secuencia genómica correspondiente en una preproenzima. La preregión del polipéptido corresponde al péptido señal que es clivado durante la traslocación hacia la luz del retículo endoplásmico por una peptidasa señal. La proregión es la secuencia que existe entre el péptido señal y la región correspondiente a la proteasa madura y su función es enmascarar la actividad proteolítica de la enzima durante su transporte. Precursores de aspártico proteasas como pepsina, catepsina D y proteasa ácida A de *Aspergillus niger* muestran una estructura similar de la proregión con riqueza en aminoácidos básicos que pueden estabilizar la conformación de la proenzima a pH neutro dentro de la célula, por su interacción electrostática con los aminoácidos ácidos de la región de enzima madura o bien ser necesarios para el apropiado plegado del precursor (Inoue, 1991).

Tatsumi (1989 y 1991) a través del análisis de mutantes inactivos de una proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae* observó la acumulación del precursor dentro de las células, concluyendo que la secreción de la enzima era dependiente del procesamiento del mismo, ya fuera porque diferencias conformacionales de la proenzima le impedían atravesar la membrana o bien porque la proregión podía adherirse a la membrana y liberar la proteasa madura al medio.

Sin embargo el procesamiento previo a la secreción no ha sido evidenciado como necesario para una metaloproteasa neutra de *Aspergillus oryzae* (Tatsumi, 1991), una proteasa aspártica (renina) de *Mucor pusillus* (Hiramatsu, 1989), casos en los que se observó secreción de precursores al medio y también para la proteasa ácida A de *Aspergillus niger* (Takahashi, 1991; Inoue, 1991).

Tanto en los procesamientos intra o extracelulares se mencionó como responsable de la maduración del precursor a la capacidad autoproteolítica de la proteasa, o bien a la intervención de otra enzima procesante (peptidasa), sumando a los extracelulares la acidez del medio externo en hongos que secretan ácidos orgánicos lo que favorecería la hidrólisis química de la proregión.

A pesar de que la hipótesis resulta factible, estudios futuros de identificación del precursor de proteasa ácida en los extractos de *Aspergillus niger* 91 deberán realizarse.

1.2. pH óptimo y estabilidad

En la **Figura IV.6** se observa la variación de actividad proteásica ante distintos pHs de reacción.

Los extractos de 72 y 96 horas mostraron un mismo comportamiento: la actividad máxima se detectó a pH 2,5 , teniendo alta actividad entre 2 y 3,5 (70%), decayendo luego ante el aumento del pH, siendo mínima a pH 5.

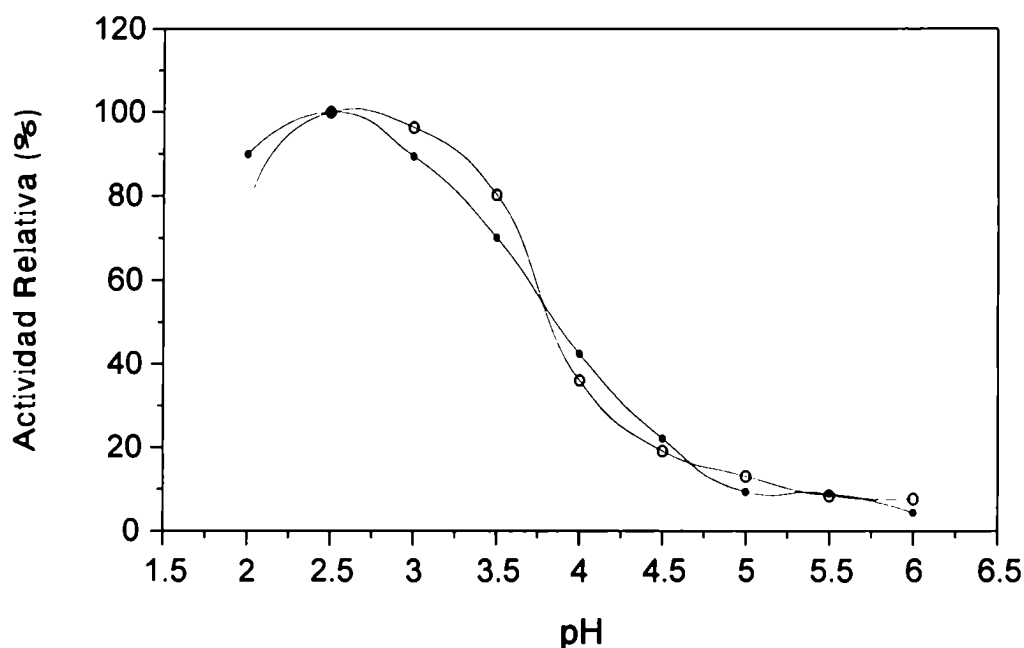


Figura IV.6 : Efecto del pH de reacción en la actividad de proteasa ácida de *Aspergillus niger* 91.

Extractos de: ● 72 y ○ 96 horas de fermentación.

Optimos de pH entre 2 y 3,5 fueron reportados para proteasa ácida de *Aspergillus niger* (Bosmann, 1973; Yang, 1986), *Rhizopus oligosporus* (Ikasari, 1996), *Penicillium camemberti* (Chrzanowska, 1995), *Mucor hiemalis* (Wang, 1967) y *Hebeloma crustuliniforme* (Zhu, 1994), mientras que máxima actividad a pH 1,1 fue informado para otra cepa de *Aspergillus niger* (Takahashi, 1995).

Las Figuras IV.7a-b muestran que incubando los extractos por 20 horas a distintos pHs a 26°C previo a la determinación de su actividad (a pH 3), la máxima estabilidad de las proteasas es a pH 5, siendo elevada en un rango de 4 a 5,5 (superior al 90%). Luego de 40 horas de incubación la caída de estabilidad de 20 a 40 horas a pH 5 es semejante para ambos extractos. Sin embargo la estabilidad del extracto de 96 horas a valores de pH entre 3 y 4,5 es elevada, comportamiento no observado en el extracto de 72 horas que presenta una actividad residual semejante (80%) en el rango de pHs de 3,5 a 5.

La conformación plegada de aspártico proteasas a bajo pH es estabilizada por una mínima repulsión de cargas, si bien también en esta condición es favorecida la hidrólisis del carboxilo lateral de residuos Asp que lleva a inactivación de la enzima. A alto pH aumenta la repulsión de cargas, la molécula tiende a desplegarse y se favorecen los

procesos inactivantes de deamidación, oxidación de residuos y destrucción de uniones disulfuro (Ikasari, 1996; Manning, 1989; Mozhaev, 1993).

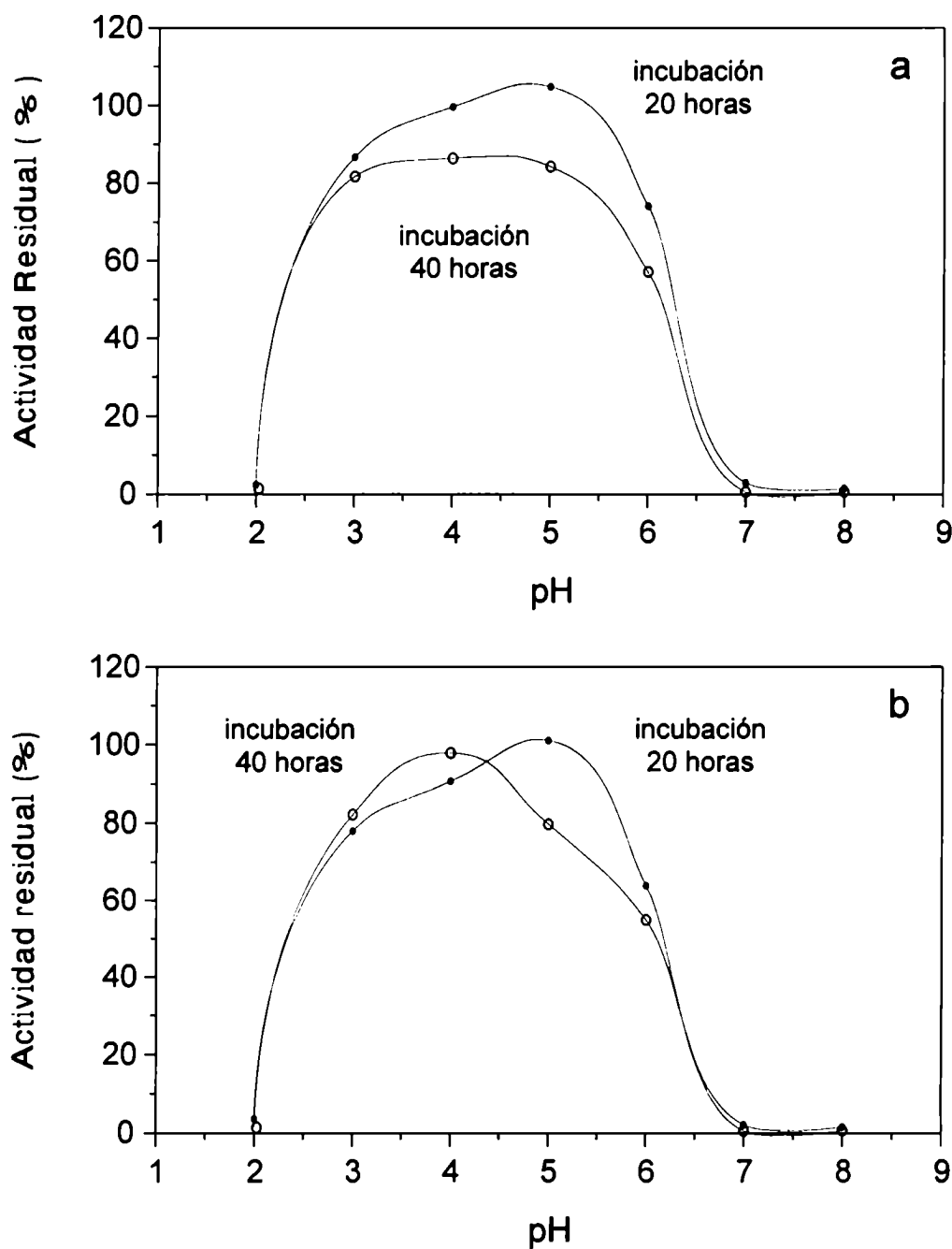


Figura IV.7 : Efecto del pH en la estabilidad de la proteasa ácida de *Aspergillus niger* 91.

Extractos de: a) 72 y b) 96 horas de fermentación.

El extracto enzimático fue llevado a los pHs indicados en la figura con HCl o NaOH, esterilizado por filtración, e incubado a 26°C durante: ● 20 y ○ 40 horas.

La actividad residual determinada en condiciones estándar es expresada como porcentaje de la actividad inicial.

Una estabilidad superior al 80% durante 20 horas entre pHs 3 y 5,5, fue observada en proteasa ácida de *Aspergillus niger* (Takahashi, 1995), *Rhizopus oligosporus* (Ikasari, 1996), *Mucor hiemalis* (Wang, 1967) y *Hebeloma crustuliniforme* (Zhu, 1994), y aún a valores de pH entre 6 y 7 para otra cepa de *Aspergillus niger* (Singh, 1994) y *Penicillium camemberti* (Chrzanowska, 1995).

Las proteasas ácidas comerciales de *Aspergillus niger* mencionadas previamente exhiben un pH óptimo de 3 y estabilidad entre pHs 3 y 5, semejante a la producida por *Aspergillus niger* 91.

El cambio del perfil de estabilidad del extracto de 96 horas a lo largo del tiempo de incubación, puede indicar la existencia de al menos dos formas proteásicas diferentes, hecho no evidenciado en el extracto de 72 horas.

Así la observación de dos picos de pH óptimo correspondió en algunos casos a la presencia de más de una proteasa ácida en un mismo extracto (Wang, 1965; Tsujita, 1976; Yang, 1986; Piechura, 1989) con pIs diferentes: 3,1 y 3,9 para proteasas de *Aspergillus oryzae* (Tsujita, 1976), 4,1 y 4,5 para las producidas por *Aspergillus niger* (Bosmann, 1973).

2. Purificación parcial y caracterización molecular del extracto

Un proceso simple de purificación fue aplicado sobre el extracto crudo obtenido en FES, teniendo como objeto principal profundizar la caracterización a nivel molecular de los componentes proteolíticos del extracto y observar posibles diferencias en éstos a 72 y 96 horas de fermentación, sin pretender por lo tanto una purificación exhaustiva de los mismos.

Extractos provenientes de 72 horas (pH: 4,6) y 96 horas (pH: 4,9) de fermentación fueron sometidos inicialmente a ultrafiltración a 4°C (corte = 10000 Da).

El pH del concentrado obtenido en cada caso fue ajustado a 5,2 con buffer acetato (concentración final = 0,01 M), ya que a ese pH la estabilidad de la proteasa es alta y además que, dada la información disponible y ya mencionada sobre los pI de proteasas ácidas, su carga neta a ese pH sería negativa.

Cada ultrafiltrado fue sembrado después en una columna (V = 6 ml) de intercambio aniónico DEAE-Sepharosa refrigerada y previamente equilibrada con dicho buffer. La columna fue lavada con 20 ml de buffer acetato 0,01 M pH 5,2 y se recolectaron fracciones de 2 ml; luego se continuó la elución con 80 ml de un gradiente lineal entre 0-0,4 M NaCl (20 fracciones), finalizando con 8 ml de 1 M NaCl (4 fracciones). Los resultados de este proceso han sido resumidos en la **Tabla IV.2a-b** y dado que el procesamiento paso a paso no fue exactamente igual, la comparación entre ambos extractos será principalmente de índole cualitativa.

Tabla IV.2: Análisis de resultados del proceso de purificación parcial de extractos proteolíticos de *Aspergillus niger* 91.

	Volumen (ml)	Actividad Total (AHUT)	Proteína (mg)	Actividad Específica (AHUT/mg)	Rendimiento (%) (b)	Purificación (veces) (c)
a - Extracto 72 horas						
1- Crudo	20,770	19313	9,72	1987	100	1
2- Ultrafiltrado	0,627	27816	8,89	3129	144	1,6
3- DEAE-S ^(a)	12	12172	3,65	3335	44	1,1
b - Extracto 96 horas						
1- Crudo	28,65	32649	17,67	1848	100	1
2- Ultrafiltrado	1,86	49866	15,37	3244	153	1,8
3- DEAE-S ^(a)	14	31076	7,35	4228	62	1,3

(a): Considerando pico de proteasa conteniendo el 99% de la actividad total eluida de la columna. Dada la eliminación de un inhibidor en un paso intermedio el rendimiento y el índice de purificación se calcularon según lo siguiente: (b): $(\text{Actividad total}_{n+1} / \text{Actividad total}_n) \times 100$
(c): $(\text{Actividad específica}_{n+1} / \text{Actividad específica}_n)$

La ultrafiltración del extracto crudo permitió en ambos casos una recuperación superior al 100% de la actividad proteásica: 144% para el extracto de 72 horas y 153% para el de 96 horas, con un incremento de 1,6 veces de su actividad específica en el primer caso y de 1,8 veces en el segundo. Asimismo la concentración de proteasa (AHUT/ml) aumentó 48 veces respecto del crudo para el extracto de 72 horas y 24 veces para el de 96 horas. La recuperación superior al 100% de actividad proteásica puede estar indicando la remoción de algún tipo de inhibidor, hecho ya observado en otros procesos de purificación de proteasas (Nickels, 1994).

Todo compuesto que decrece la tasa de hidrólisis de un sustrato es en principio un inhibidor. La función de los inhibidores reversible naturales es la prevención o regulación de la actividad proteolítica, actuando in vivo como reservorios de proteasas (Salvesen, 1989; Bieth, 1995).

Por lo tanto la eliminación por ultrafiltración de compuestos con pesos moleculares inferiores a 10000 Da, entre los que pueden encontrarse mezclas de péptidos y aminoácidos que estarían actuando como inhibidores de la actividad proteolítica permitió la recuperación de una mayor actividad en el extracto. Resultados similares fueron reportados para extractos de proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (Ferrero, 1995).

Las **Figuras IV.8a-b** muestran los perfiles de elución de proteína y actividad proteásica de la columna de DEAE-Sepharosa, correspondiente a los ultrafiltrados de 72 y 96 horas respectivamente.

Con el lavado inicial de la columna con buffer acetato 0,01 M pH 5,2 se observa la elución de un pico de proteína sin actividad proteásica (lo que indica que toda la proteasa sembrada se adsorbió a la columna), pero detectándose en él actividad glucoamilasa y la presencia de la mayor concentración de pigmentos del extracto. La proteína contenida en este pico representa un 0,06% (extracto de 72 horas) y 0,19% (extracto de 96 horas) del total de la proteína eluída de la columna.

Pequeñas diferencias fueron observadas en la elución del pico de actividad proteásica para los extractos de distintos tiempos de fermentación.

La máxima actividad proteásica eluye a 0,267 M NaCl (fracción 28) en el extracto de 72 horas y a 0,293 M NaCl en el extracto de 96 horas (fracción 32). Sin embargo los rangos de elución de ambos picos conteniendo el 99% del total de la actividad proteásica eluída de la columna se superponen parcialmente, siendo de 0,229-0,292 M NaCl para el extracto de 72 horas (fracciones 25-30) y de 0,253-0,333 M NaCl para el extracto de 96 horas (fracciones 29-35). En ambos casos la elución de este pico se asocia al pico mayoritario de proteínas del perfil y representa el 57% del total de proteína recuperada de la columna, no habiéndose detectado en él la presencia de actividad glucoamilolítica ni pectinolítica.

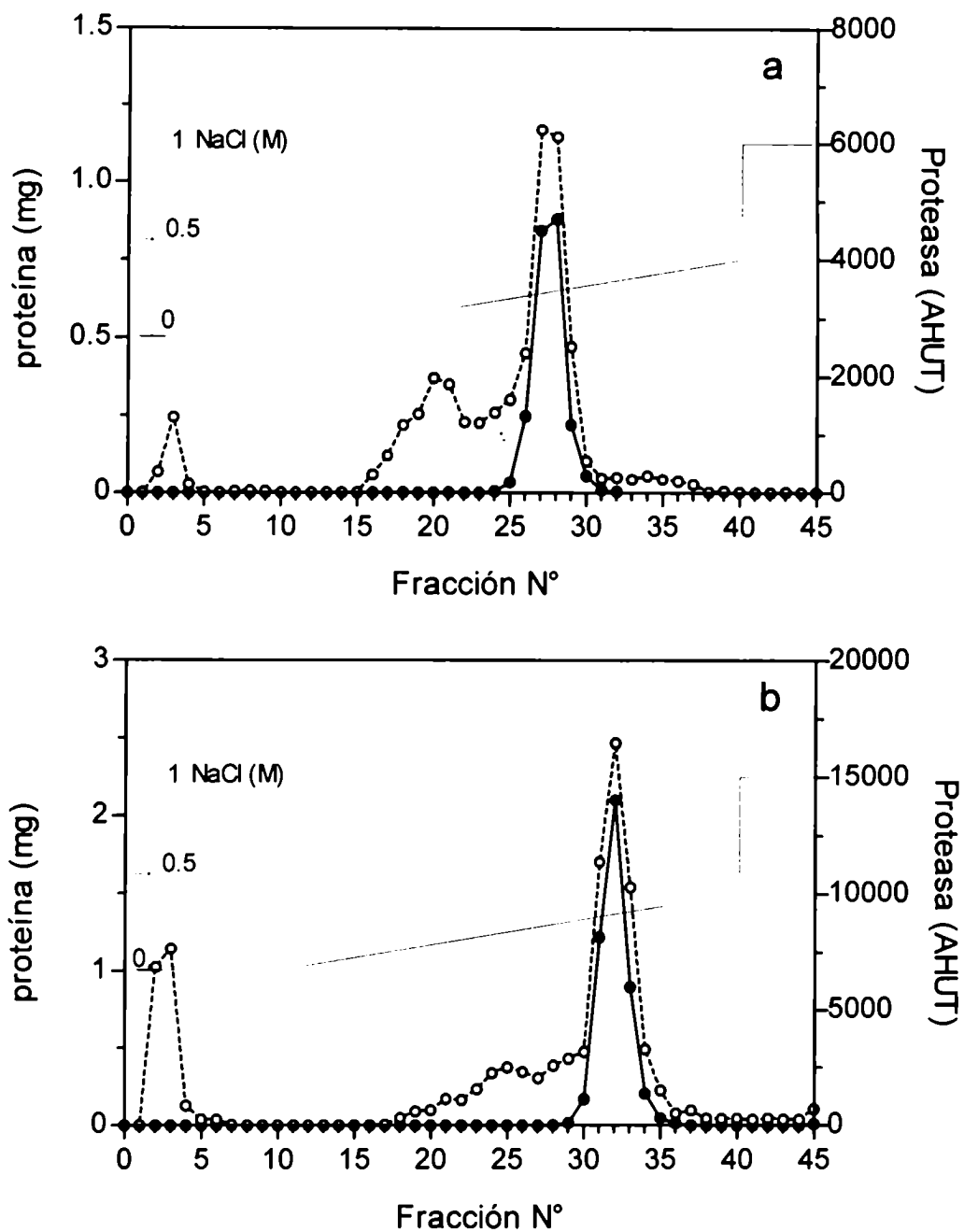


Figura IV.8 : Perfil de elución de proteasa ácida de *Aspergillus niger* 91 después de la cromatografía de intercambio aniónico sobre DEAE-Sepharosa. Extractos previamente ultrafiltrados de: a) 72 y b) 96 horas de fermentación. La columna fue eluida con buffer acetato 0,01 M pH 5,2 con un gradiente de NaCl desarrollado según se indica en el gráfico. Fracciones de 2 ml fueron recolectadas y en ellas se determinó: ● actividad proteásica y ○ proteínas.

El rendimiento en actividad obtenido fue superior para el extracto de 96 horas: 62% con un incremento de la actividad específica de la enzima de 1,3 veces, ambos considerados respecto del paso de ultrafiltrado; mientras que para el extracto de 72 horas los valores respectivos fueron 44% de recuperación de actividad y la proteasa fue purificada 1,1 veces.

La asociación observada entre la proteasa y la fracción mayoritaria de proteína durante la elución de los extractos de la DEAE-S y la obtención de bajos índices de purificación en el proceso total, permite inferir que dicha enzima ya era la proteína preponderante en el extracto crudo, evento similar en otros procesos de obtención de proteasas a partir de hongos (Abraham, 1996).

Con el interés de realizar un análisis molecular de los componentes del pico de actividad proteásica eluido de la columna, 20 μ l de las fracciones conteniendo el 95% de la actividad total eluida de la DEAE-S fueron sembrados en SDS-PAGE.

Dos geles fueron corridos en paralelo, uno revelado para actividad proteásica (conteniendo gelatina como sustrato en su matriz) donde se ven las bandas de actividad blancas sobre un fondo azul y que también permite visualizar bandas de proteínas inactivas (azules) y estimar pesos moleculares al sembrar proteínas de referencia (Heussen, 1979). El otro gel fue revelado para proteínas con Coomassie Blue R-250.

Los resultados se muestran en las **Figuras IV.9a y b** respectivamente.

De aquí se desprende que para las fracciones de DEAE-S de los extractos de 72 horas (calles 1-4) y de 96 horas (calles 5-8) la actividad visualizada en el gel no se corresponde con lo sembrado (determinado como AHUT). Asimismo que, tanto la proteína (μ g) como la actividad (AHUT) sembradas en dichos geles se corresponden con el perfil obtenido para la banda mayoritaria de proteína, banda **A** ($R_f = 0,34$), que se observa para ambos extractos. Además de esta banda principal inactiva aparentemente como proteasa, se detecta una zona de actividad proteolítica (blanca) con dos componentes: banda **B** ($R_f = 0,49$ y $0,59$) en las calles correspondientes al pico de proteasa de la DEAE-S de 96 horas, mientras que en las correspondientes a las 72 horas su presencia es sólo vestigial observándose únicamente una banda ($R_f = 0,49$) en una única fracción del pico de proteasa de la DEAE-S.

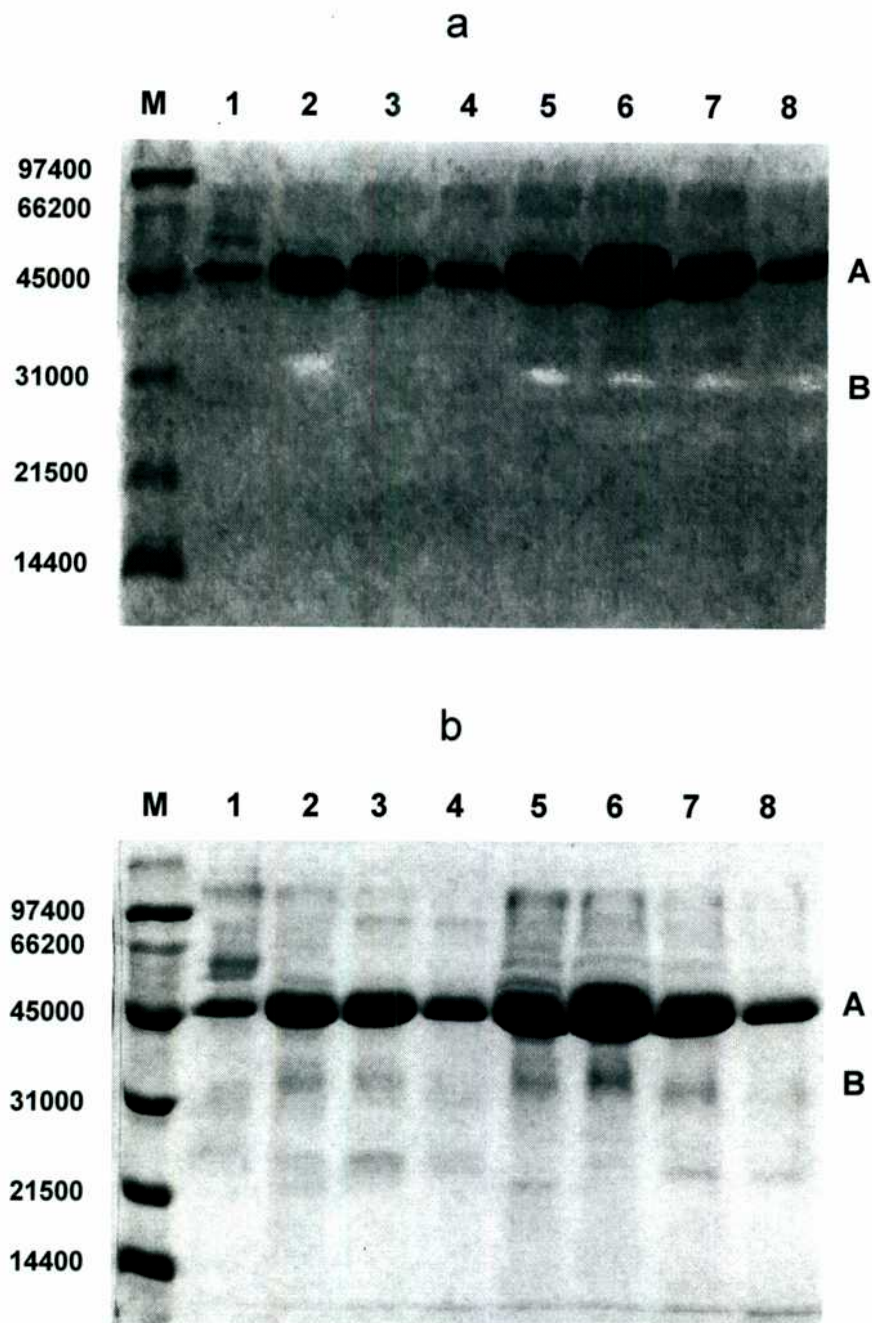


Figura IV.9 : Análisis por electroforesis del pico de actividad proteásica eluido de la DEAE-S de extractos de 72 y 96 horas de FES.

Geles revelados para: **a)** actividad (con gelatina), **b)** proteínas.

20 μ l de las fracciones conteniendo 95% de la actividad total eluida de la columna fueron sembrados en 11% SDS-PAGE.

Calle **M**: marcadores de peso molecular.

Calles: 1-4: fracciones 26-29 de Deae de extracto de 72 horas.

5-8: fracciones 31-34 de Deae de extracto de 96 horas.

	Siembra							
Calle	1	2	3	4	5	6	7	8
Proteína (μ g)	4,5	11,7	11,5	4,7	17,1	24,7	15,4	4,9
Actividad (AHUT)	13	45	47	12	81	140	60	14

Las **Figuras IV.10a-b** muestran los densitogramas del gel SDS-PAGE revelado para proteínas, correspondientes a las fracciones de máxima actividad proteásica eluidas de la DEAE-S del extracto de 72 horas (fracción 28) y de 96 horas (fracción 32).

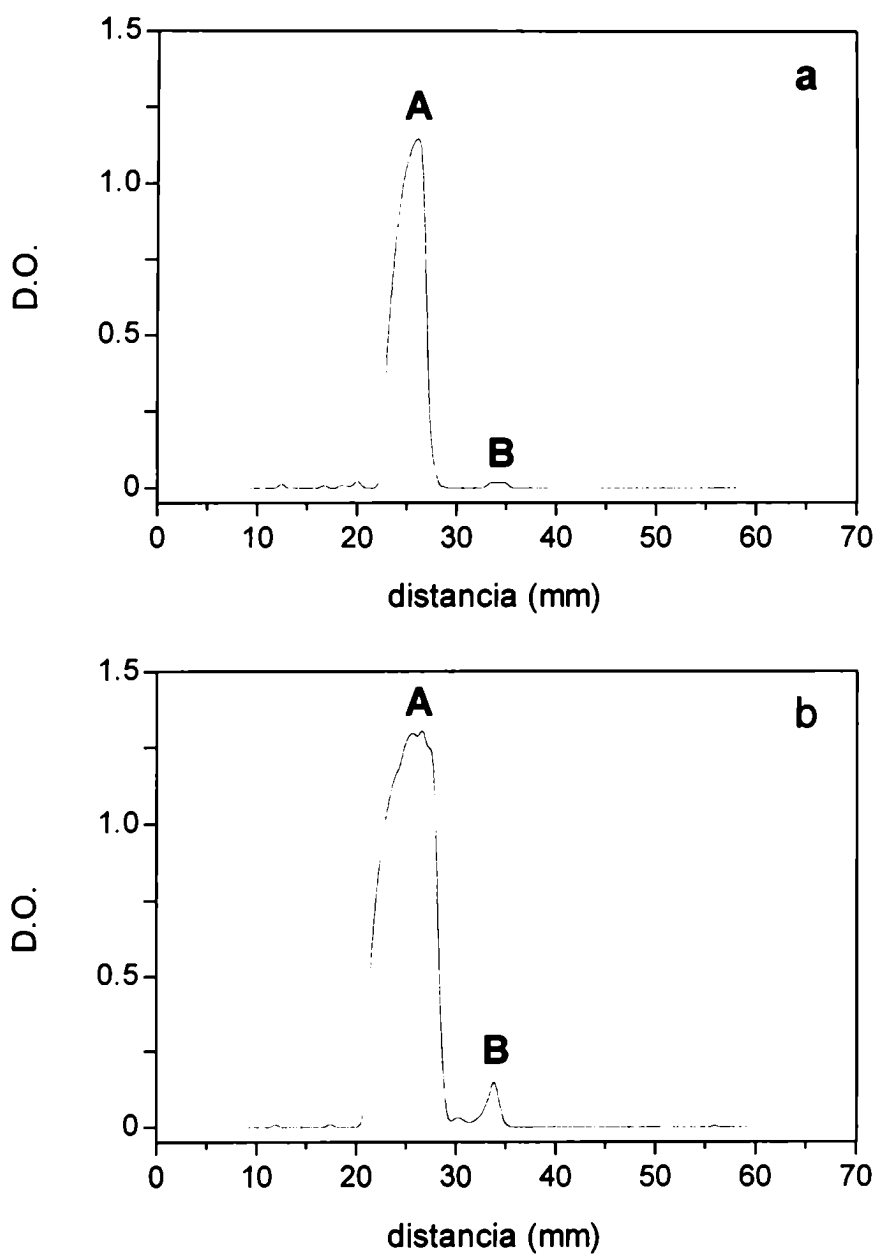


Figura IV.10 : Densitograma del máximo de actividad proteásica eluido de la columna DEAE-S y sembrado en SDS-PAGE.
Extractos de: a) 72 y b) 96 horas de fermentación.

Los R_f de los picos A y B se corresponden con los de las bandas de igual nombre señaladas en el gel.

En dichas figuras se señalan como **A** y **B** a los picos que se corresponden con los valores de R_f obtenidos para las bandas **A** y **B** de los geles descriptos. Según el análisis del área contenida bajo los picos, del total de la proteína presente en el pico de actividad eluido de la columna de 72 horas, la banda **A** representa el 97,5% y la **B** el 0,9%, mientras que para el extracto de 96 horas la banda **A** representa el 96,5% y la **B** el 2,8%.

Los pesos moleculares promedio estimados a partir de los geles fueron 45100 Da para la banda **A** y para los dos componentes de la banda **B**: 33500 y 26100 Da.

De acuerdo a lo observado en los geles, la actividad proteolítica aparece asociada sólo a un componente minoritario en los extractos. Sin embargo existen numerosas evidencias que demuestran que en las condiciones en las que se realiza la electroforesis la proteasa correspondiente a la banda **A** se inactivaría, no siendo entonces revelada como banda blanca.

Takahashi (1995) reportó la inactivación irreversible de la proteasa ácida de *Aspergillus niger* por incubación entre pHs 6 y 7. Ulteriormente se verificó si el pH alcalino de la electroforesis (pH 8-8,8) había inactivado la enzima, se ajustó el pH de alícuotas del extracto con NaOH 3N a dichos valores y se midió la actividad residual proteásica (en condiciones estándar) luego de incubarlas a 4°C durante 4 horas (iguales condiciones que la electroforesis), recuperándose sólo el 5% de la actividad.

Mattern (1992) analizando cepas mutantes de *Aspergillus niger* deficientes en proteasas extracelulares obtenidas a partir de una cepa parental (salvaje), describe el sistema proteolítico extracelular de este hongo. El perfil de proteínas secretadas obtenido en SDS-PAGE es muy similar al observado para los extractos de FES de la cepa *Aspergillus niger* 91. El autor indica entonces la existencia de una proteasa principal responsable del 80-85% de la actividad proteásica total de la cepa parental, identificada como aspergillopepsina A por su reacción con anticuerpos policlonales contra esta enzima en un Western Blot realizado en paralelo al SDS-PAGE revelado para proteínas. Esta enzima, codificada por el gen *pep A*, presenta un PM de 43000 Da, es inactivada a pHs superiores a 6,5 y es inhibible por pepstatin (inhibidor de aspártico proteasas). Cepas cuyo gen *pep A* ha sido mutado o deleteado aún presentan 15-20% de la actividad proteolítica de la cepa parental, actividad no afectada por la presencia de pepstatin en el

medio de cultivo. Esto evidencia entonces la existencia de otra proteasa ácida aspergillopepsina B, insensible a dicho inhibidor y existente en una menor proporción.

Por lo tanto en concordancia con estas observaciones y por los bajos índices de purificación obtenidos que indicaban que la proteasa se asociaba a una fracción mayoritaria de proteína en el extracto, se puede deducir que tanto la banda **B** (minoritaria) como la **A** (mayoritaria e inactivada irreversiblemente por el pH alcalino) son componentes proteolíticos del extracto de *Aspergillus niger* 91.

Para verificar la presencia de al menos dos componentes proteásicos en el extracto de 96 horas se analizó el mismo por cromatografía de filtración molecular.

El extracto crudo de 96 horas de fermentación fue liofilizado, resuspendido en buffer acetato 0,05 M NaCl 0,05 M pH 5, centrifugado para la eliminación de agregados protéicos y finalmente una alícuota del sobrenadante fue sembrada en una columna de Sephadex G-75 SF equilibrada con dicho buffer.

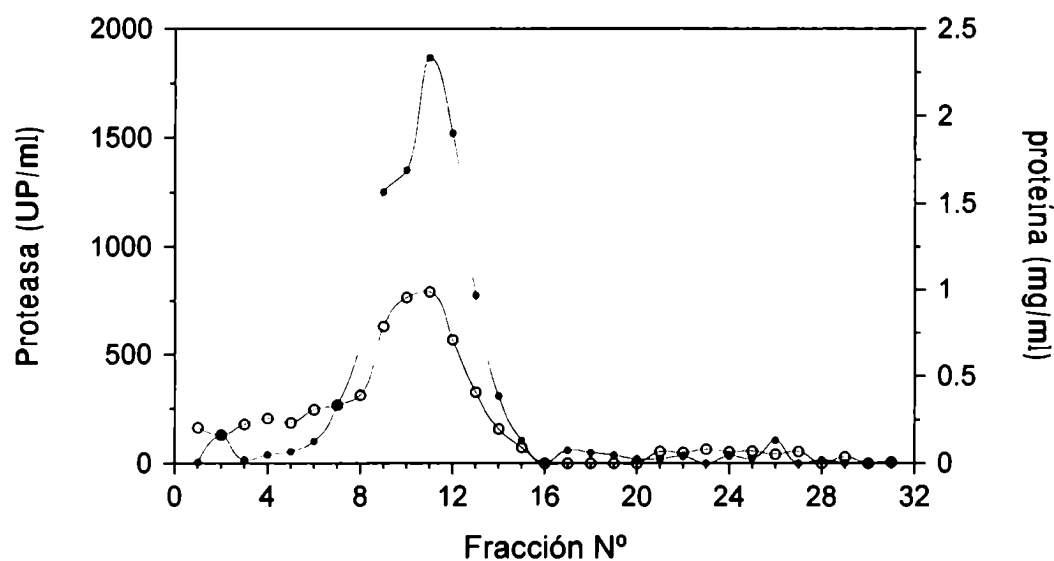


Figura IV.11 : Perfil de elución del extracto crudo de 96 horas de fermentación de *Aspergillus niger* 91 después de una cromatografía de filtración molecular por Sephadex G-75 SF. La columna fue eluida con buffer acetato 0,05 M NaCl 0,05 M pH 5. Fracciones de 0,5 ml fueron recolectadas y en ellas se determinó: ● actividad proteásica y ○ proteínas.

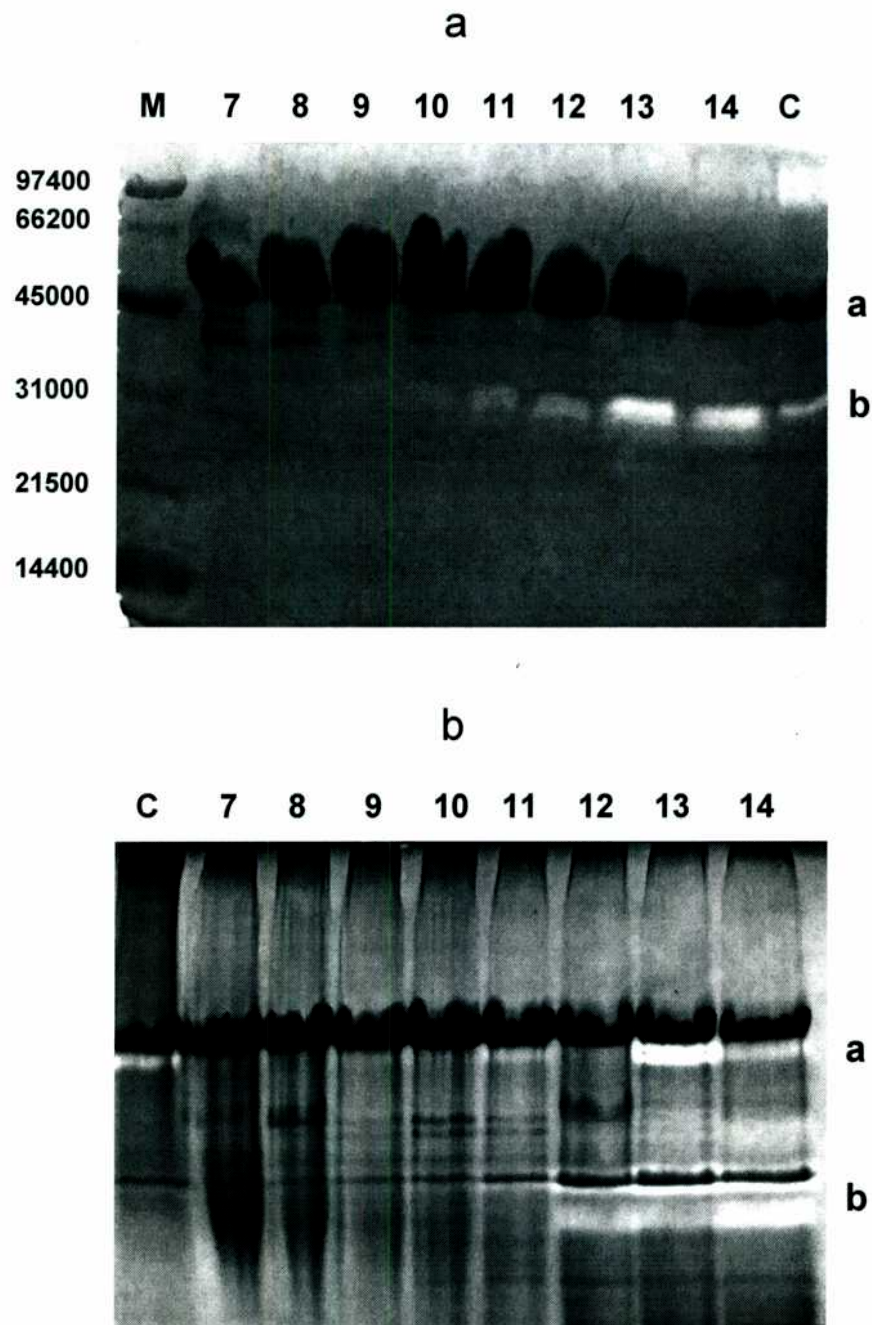


Figura IV.12 : Análisis por electroforesis del pico de actividad proteásica eluido de la Sephadex G-75 del extracto crudo de 96 horas. Geles revelados para actividad: **a)** SDS-PAGE 11% (con gelatina), siembra: 30µg proteína/calle; **b)** Gel nativo 10%, con posterior incubación en caseína, siembra: 20µg proteína/calle. Calle **M**: marcadores de peso molecular. Calle **C**: extracto crudo de 96 horas de fermentación. Calles (7-14): siembra de las respectivas fracciones de la columna.

En la **Figura IV.11** se observa el perfil de elución de la columna del extracto de 96 horas recolectado en 31 fracciones. El pico de actividad proteásica (fracciones 6-15), eluye conjuntamente con el pico mayoritario de proteínas (máximo en fracción 11). El pico de actividad pareciera estar formado por dos componentes con máximos en fracciones 9 y 11, siendo los PM calculados: 38800 y 30800 Da respectivamente.

Tanto el extracto crudo como fracciones conteniendo el 90% de la actividad total eluida de la columna fueron corridos en un gel SDS-PAGE con gelatina y en un gel nativo (sin SDS) incubado luego en caseína, ambos para revelado de actividad proteolítica. Los resultados se observan en las **Figuras IV.12a y b** respectivamente.

En el gel con gelatina y coincidiendo los R_f obtenidos con los resultados anteriores, se observa la banda **A** mayoritaria de proteína inactiva y la banda **B** con tres componentes activos de movilidades muy similares entre sí y al extracto crudo, siendo los PM calculados para éstos: 33300, 30400 y 27600 Da.

El pH de la electroforesis nativa fue modificado a 6,8 ya que la medición de la actividad residual de una alícuota del extracto cuyo pH había sido previamente ajustado a pH 7 con NaOH 3N, y que había sido incubado a 4°C durante 1 hora (condiciones de la electroforesis), dio como resultado un 45% de actividad residual.

En el gel nativo se detectan entonces dos bandas de actividad proteolítica sobre caseína: una de migración idéntica a la del crudo **a** : $R_f = 0,40$, asociada a la banda mayoritaria de proteína lo que estaría indicando que en las condiciones de corrida empleadas la inactivación de la banda A es parcial, y otra de mayor migración **b** : $R_f = 0,70$.

De este modo los dos componentes proteolíticos del pico de actividad eluido de la columna de filtración molecular se corresponden con los componentes **A** y **B** detectados en SDS-PAGE producto de la purificación parcial. Las diferencias observadas en la estimación de sus PM por ambos métodos puede deberse al carácter ácido de estas proteínas que determina migraciones electroforéticas atípicas, como también ha sido observado en otras proteasas producidas por microorganismos (Tsuchiya, 1987). De todos modos dichos PM están dentro del rango esperado para aspártico proteasas, grupo al que pertenecerían estas proteasas por sus características generales, si bien debería realizarse un estudio con inhibidores para aseverarlo (Kalisz, 1988).

Por lo tanto la cepa *Aspergillus niger* 91 en este sistema de FES secreta al medio al menos dos tipos de proteasas ácidas: una mayoritaria **A** y otra minoritaria **B**. Esta última presenta además microheterogeneidad electroforética, es decir formas alternativas estables producto de modificaciones post traduccionales como fosforilación, glicosilación o deamidación, evento reportado para distintas proteasas de *Aspergillus sojae* (Ichishima, 1986), *Aspergillus fumigatus* (Piechura, 1989), y *Ophiostoma piceae* (Abraham, 1996).

En función de los resultados obtenidos con respecto a la termoestabilidad, la fracción minoritaria **B** presente en el extracto de 96 horas sería la fracción más termolábil y la responsable de la diferente estabilidad al pH.

La presencia de ambas enzimas en el medio extracelular depende del tiempo de fermentación: mientras la proteasa **A** ya ha sido secretada en tiempos más tempranos de la fase exponencial, la presencia de **B** sólo es significativa al final de dicha fase. De modo similar variaciones en el patrón de actividad entre cultivos tempranos y estacionarios ha sido observado para proteasas neutras y alcalinas de *Ustilago maydis* (Hellmich, 1988) y por variación en la composición del medio de cultivo para aspártico proteasas de *Penicillium* (Chrzanowska, 1993).

Estas modificaciones en la composición molecular del extracto proteolítico dependientes del estado fisiológico del microorganismo o bien de modificaciones ambientales, son las que en definitiva determinan las variaciones observadas en la caracterización térmica o ante la variación del pH, por lo que el tiempo de cosecha deberá ser determinado teniendo en cuenta estos factores además de la productividad de la enzima.

CONCLUSIONES

La cepa seleccionada *Aspergillus niger* 91, resultó excelente para la producción de proteasa ácida en un sistema de fermentación en medio sólido. Dado el carácter GRAS de este tipo de microorganismo el proceso desarrollado sería apto para la producción de esta enzima para uso en el procesamiento de alimentos.

El estudio sistemático de la influencia de distintas variables del proceso permitió la optimización de las condiciones de fermentación para lograr una máxima producción de proteasa. La cepa *Aspergillus niger* 91 fermentando a 37°C en un sistema tipo bandeja sin aireación forzada, sobre el sustrato soja : afrechillo de arroz (7:3) con una humedad inicial del 40% y pH inicial 6, genera a las 160 horas de fermentación la máxima cantidad de biomasa: 235 mg/g SS₀ (370 mg/g msk), la que produce 10000 UP/g SS₀ (15800 UP/g msk) siendo estos valores muy superiores (100 veces) a los obtenidos en un sistema similar con una cepa productora de proteasa ácida *Aspergillus niger* ANH-15 sobre salvado de trigo (Villegas, 1993) y 4 veces superior a lo producido por *Rhizopus oligosporus* sobre afrechillo de arroz (Ikasari, 1996).

En estas condiciones las proteasas son las proteínas extracelulares mayoritarias secretadas por el hongo, siendo sus características similares a otras proteasas ácidas reportadas. Sin embargo la composición del extracto proteolítico varía con el tiempo de fermentación. La proteasa A (45000 Da) se secreta más tempranamente al medio y es la proteína mayoritaria aún en el extracto crudo; la proteasa B es heteromórfica (33000-26000 Da) y recién es detectada más significativamente a las 96 horas de fermentación. La diferencia en composición determina también diferencias de comportamiento ante la temperatura. Si bien a las 72 horas no se secretó aún la máxima cantidad de enzima, el extracto enzimático obtenido a este tiempo tiene mayor temperatura óptima y estabilidad térmica que el de 96 horas, presentando también diferencias de estabilidad al pH.

La ecuación logística permitió describir adecuadamente la cinética de producción de biomasa, proteasa ácida y conidios, y el consumo de sustrato de la cepa *Aspergillus niger* 91. Otros autores también confirman su validez en la descripción cinética de biomasa y productos en FES, para hongos filamentosos y levaduras creciendo sobre soportes naturales (Ngadi, 1992; Sargantanis, 1993; Smits, 1998; Terebiznik, 1999).

Los estudios aquí realizados sobre la cinética de producción de proteasa ácida en la fermentación y su interrelación con otras variables de proceso adquieren relevancia dada la escasa información existente al respecto.

La humedad (y/o A_w inicial) fue una de las variables más significativas en FES, afectando tanto las velocidades específicas como los valores máximos de producción de biomasa, proteasa y conidios. La producción de proteasa resultó máxima en un rango estrecho de humedad inicial (alrededor de 40%) o de A_w (0,969). Sin embargo tanto la generación de biomasa como de conidios fueron máximas en un rango más amplio entre 40 y 48% de humedad inicial.

Del análisis del balance de agua en el sistema FES desarrollado, sin aireación forzada, se infiere que en las óptimas condiciones de producción de proteasa se mantiene una ganancia neta de agua a lo largo de toda la fermentación. Es decir en una condición en que se promueve buen desarrollo inicial de biomasa, ésta genera agua metabólica en cantidad suficiente como para contrarrestar el agua perdida por evaporación y garantizar que aún al aumentar la generación de solutos que producen un descenso de la A_w , la misma no caiga rápidamente por debajo de valores que no soporten un desarrollo fúngico adecuado y producción de la enzima. En el caso de *Aspergillus niger* 91 y de otros hongos relacionados este valor límite de A_w se encuentra alrededor de 0,90.

El pH inicial de la fermentación influyó principalmente sobre las velocidades específicas de producción de biomasa, proteasa y conidios; sin embargo no modificó significativamente los máximos valores de biomasa y conidiación. La máxima producción de enzima en cambio disminuyó significativamente por debajo de 5,4. La escasa producción de proteasas observada en esta condición así como el análisis de la evolución del pH de la FES en relación a la producción de proteasa aporta cierta evidencia para plantear la hipótesis de un mecanismo de regulación por pH del medio extracelular sobre la expresión de proteasa ácida de *Aspergillus niger* 91, modelo que ha sido sugerido para la regulación de otras enzimas fúngicas extracelulares. Sin embargo estudios más específicos deben realizarse para su confirmación.

El aumento de la temperatura de la FES de 29 a 37°C permite incrementar significativamente la producción de biomasa y proteasa, disminuyendo en cambio la conidiación. Esta disociación entre ambos procesos es deseable ya que procesos con

baja conidiación mejoran la condición sanitaria de la FES y facilitan la recuperación de la enzima.

También en este mismo sentido se encontró que la adición de NaCl en concentraciones de hasta 1% en el medio de fermentación mejora la producción de proteasa y concomitantemente reduce la conidiación respecto del sustrato sin sal.

La pérdida de peso seco del sistema, que es una propiedad fácilmente medible resultó estar altamente correlacionada con la biomasa y proteasa producidas por lo cual se sugiere la utilización de este parámetro para el monitoreo de la evolución de la fermentación, dada la dificultad que presentan los sistemas FES en cuanto a la determinación de estos parámetros.

Por último la caracterización cinética del proceso FES así como el conocimiento de las características de las proteasas producidas por *Aspergillus niger* 91, constituyen la base para definir los criterios de control del proceso, decidir las estrategias a seguir de acuerdo a las características deseadas del extracto proteolítico (por ejemplo tiempo de cosecha) y generar criterios de escalado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah,A., Tengerdy,R., Murphy,V. (1985). Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering* 27, 20-27.
- Abiose,S., Allan,M., Wood,B. (1982). Microbiology and biochemistry of miso (soy paste) fermentation. *Advances in Applied Microbiology* 28, 240-265.
- Abraham,L., Breuil,C. (1996). Isolation and characterization of a subtilisin-like serine proteinase secreted by the sap-staining fungus *Ophiostoma piceae*. *Enzyme and Microbial Technology* 18, 133-140.
- Acuña-Arguelles,M., Gutiérrez-Rojas,M., Viniegra-González,G., Favela-Torres, E. (1994). Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnology Letters* 16, 23-28.
- Adler-Nissen,J. (1993). Proteases. In *Enzymes in Food Processing*, ed. Nagodawithana,T. and Reed,G., Academic Press, San Diego, 7, 159-203.
- Aidoo,K., Hendry,R., Wood,B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 12, 6-9.
- Aidoo,K., Hendry,R., Wood,B. (1982). Solid substrate fermentations. *Advances in Applied Microbiology* 28, 201-237.
- Alazard,D., Raimbault,M. (1981). Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 12, 113-117.
- Anson,M. (1938). Estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79-89.
- Aunstrup,Knud. (1980). Proteinases. In *Microbial Enzymes and Bioconversions*, ed. A.H.Rose, Academic Press, London, *Economic Microbiology*, 5, 49-114.
- Auria,R., Morales,M., Villegas,E., Revah,S. (1993). Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. *Biotechnology & Bioengineering* 41, 1007-1013.
- Ayala,L., Soccol,C., dos Santos,H., Todeschini,M. (1996). Produção de esporos do fungo entomopatogênico (*Beauveria bassiana*) por fermentação no estado sólido utilizando como substrato refugo de batata. XI Simpósio Nacional de Fermentações. Universidade Federal de São Carlos, 574-579.

- Battaglino,R., Huergo,M., Pilosof,A., Bartholomai,G. (1991). Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35, 292-296.
- Beever,R., Laracy,E. (1986). Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 168, 1358-1365.
- Bergmeyer,H., Grassl,M. (1983). Reagents for enzymatic analysis: enzymes α -glucosidase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. H.Bergmeyer, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 2, 205-206.
- Bierbaum,G., Karutz,M., Weuster-Botz,D., Wandrey,C. (1994). Production of protease with *Bacillus licheniformis* mutants insensitive to repression of exoenzyme biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 611-617.
- Bieth,J. (1995). Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. *Methods in Enzymology* 248, 81-84.
- Biocon. (1999). Página web: <http://www.biocon.com/biocon.htm>.
- Blakeman J, Mc Cracken,A., Seaby,D. (1988). Changes brought about in solid substrates after fermentations of mixtures of cereals and pulses with *Rhizopus oryzae*. *Journal of Sci. Food. Agric.* 45, 109-118.
- Blazej,A., Ottová,A. (1989). Mathematical modelling in biotechnology. *Progress in Biotechnology* 6, 345-357.
- Bombara,N. (1995). Modificación de las propiedades de la harina de trigo mediante hidrólisis enzimática. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Mar del Plata. 198 p.
- Bombara,N., Pilosof,A., Añón,M. (1994). Thermal stability of a neutral protease of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Biochemistry* 18, 31-41.
- Bosmann,H. (1973). Protein catabolism II. Identification of neutral and acidic proteolytic enzymes in *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta* 293, 476-489.
- Boyce,C. (1986). Enzyme classes. In *Novo's Handbook of Practical Biotechnology*, ed. Boyce,C., Novo Industri A/S, Denmark, 63-69.
- Bradford,M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

- Brakhage, A. (1997). Molecular regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus (Emericella) nidulans*. FEMS Microbiology Letters 148, 1-10.
- Brown, R. (1993). Dairy Products. In Enzymes in Food Processing, ed. Nagodawithana, T. and Reed, G., Academic Press, San Diego, 13, 347-361.
- Bull, A., Trinci, A. (1977). The physiology and metabolic control of fungal growth. Advances Microbial Physiology 15, 1-84.
- Caddick, M., Brownlee, G., Arst, H. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. Molecular General Genetics 203, 346-353.
- Cannel, E., Moo-Young, M. (1980). Solid state fermentation systems. Process Biochemistry 15, 2-7.
- Carretero, C., Trujillo, A., Mor-Mur, M., Pla, R., Guamis, B. (1994). Electrophoretic study of casein breakdown during ripening of goat's milk cheese. J. Agric. Food Chem. 42, 1546-1550.
- Carrizales, V., Jaffe, W. (1986). Solid state fermentation: An appropriate biotechnology for developing countries. Interciencia 11, 1, 9-15.
- Cousin, M. (1995). Chitin as a measure of mold contamination of agricultural commodities and foods. Journal of Food Protection 59, 1, 73-81.
- Chellapandian, M., Sastry, C. (1992). Vermiculite as an economic support for immobilization of neutral protease. Bioprocess Engineering 8, 27-31.
- Chirife, J., Resnik, S. (1984). Unsaturated solutions of sodium chloride as reference sources of water activity at various temperatures. Journal of Food Science 49, 1486-1488.
- Chrzanowska, J., Kolaczowska, M., Dryjanski, M., Stachowiak, D., Polanowski, A. (1995). Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: Purification, properties, and substrate specificity. Enzyme and Microbial Technology 17, 719-724.
- Chrzanowska, J., Kolaczowska, M., Polanowski, A. (1993). Production of exocellular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*. Enzyme and Microbial Technology 15, 140-143.
- Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M., Durand, A. (1991). Biomass estimation in solid state fermentation. I. Manual biochemical methods. Applied Microbiology and Biotechnology 35, 200-205.

- Dorta,B., Bosch,A., Arcas,J., Ertola,R. (1994). Water balance in solid-state fermentation without forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 562-565.
- Dorta,B., Ertola,R., Arcas,J. (1996). Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 19, 434-439.
- Elliott,J. (1983). Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. In *Freshwater Biological Association Scientific Publication*, E.Le Cren, N°25, 1-156.
- Escobar,J., Barnett,S. (1993). Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 1009-1013.
- Espeso,E. (1993). PH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *The EMBO Journal* 12, 10, 3947-3956.
- Ferrero,M. (1995). Estudios de producción de proteasas en especies del género *Bacillus*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina. 138 p.
- Fiedurek,J., Ilczuk,Z., Lobarzewski,J. (1989). Influence of the mycelium growth conditions on the production of amylolytic, proteolytic and pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger* C. *Acta Biotechnologica* 9, 4, 355-361.
- Fiedurek,J., Rogalski,J., Ilczuk,Z., Leonowicz,A. (1986). Screening and mutagenesis of moulds for the improvement of glucose oxidase production. *Enzyme and Microbial Technology* 8, 734-736.
- Fukushima,Y., Itoh,H., Fukase,T., Motai,H. (1989). Continuous protease production in a carbon-limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30, 604-608.
- Gente,S., Durand-Poussereau,N., Fevre,M. (1997). Controls of the expression of aspA, the aspartyl protease gene from *Penicillium roqueforti*. *Molecular General Genetics* 256, 557-565.
- Gervais,P., Molin,P., Grajek,W., Bensoussan,M. (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology & Bioengineering* 31, 457-463.
- Ghildyal,N., Lonsane,B., Sreekantiah,K., Murthy,V. (1985). Economics of submerged and solid state fermentations for the production of amyloglucosidase. *Journal of Food Science Technology* 22, 171-176.

- Godfrey,T., Reichelt,J. (1983). Introduction to industrial enzymology. In Industrial Enzymology, ed. Godfrey,T. and Reichelt,J., The Nature Press, New York.
- González,H., Resnik,S., Vaamonde,G. (1988). Influence of temperature on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. International Journal of Food Microbiology 6, 179-183.
- Govind,N., Merta,B., Sharma,M., Modi,V. (1981). Phytochemistry 20, 2483.
- Grajek,W. (1994). Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. Folia Microbiologica 39, 1, 29-32.
- Grajek,W., Gervais,P. (1987). Effect of the sugar-beet pulp water activity on the solid-state culture of *Trichoderma viride* TS. Applied Microbiology and Biotechnology 26, 537-541.
- Grajek,W., Gervais,P. (1987). Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 9, November, 658-662.
- Gutiérrez-Rojas,M., Auria,R., Benet,J., Revah,S. (1995). A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. The Chemical Engineering Journal 60, 189-198.
- Hahn-Hägerdal,B. (1986). Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. Enzyme and Microbial Technology 8, 322-327.
- Hang,Y., Woodams,E. (1987). Microbial production of citric acid by solid state fermentation of kiwifruit peel. Journal of Food Science 52, 1, 226-227.
- Hansen,D. (1995). Mayor flexibilidad significará más descubrimientos. In BioTimes, eds. Hansen,D., Goddard,P., Porcelli,K., Novo Nordisk A/S, 4.
- Hansen,D. (1997a). A range of proteases. A range of properties. In BioTimes, eds. Hansen,D., Goddard,P., Porcelli,K., Novo Nordisk A/S, 2.
- Hansen,D. (1997b). The mildness of soap. The effect of detergent. In BioTimes, eds. Hansen,D., Goddard,P., Porcelli,K., Novo Nordisk A/S, 4.
- Hansen,D. (1997c). Four steps where enzymes improve skins and hides. In BioTimes, eds. Hansen,D., Goddard,P., Porcelli,K., Novo Nordisk A/S, 2.

- Hansen,D. (1998a). The cool new protease. In BioTimes, eds. Hansen,D., Goddard,P., Porcelli,K., Novo Nordisk A/S, 2.
- Hansen,D. (1998b). The “hungry hides” of Portugal. In BioTimes, eds. Hansen,D., Goddard,P., Porcelli,K., Novo Nordisk A/S, 3.
- Hansen,D. (1998c). Cleaner blue stock with acid enzymes. In BioTimes, eds. Hansen,D., Goddard,P., Porcelli,K., Novo Nordisk A/S, 4.
- Hansen,D. (1998d). Catering for a pet’s taste. In BioTimes, eds. Hansen,D., Goddard,P., Porcelli,K., Novo Nordisk A/S, 4.
- Hartley,B. (1960). Proteolytic enzymes. Annual Review of Biochemistry 29, 45-72.
- Hellmich,S., Schauz,K. (1988). Production of extracellular alkaline and neutral proteases of *Ustilago maydis*. Experimental Mycology 12, 223-232.
- Hesseltine,C. (1987). Solid state fermentation- An overview. International Biodeterioration 23, 79-89.
- Heussen,C., Dowdle,E. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates. Analytical Biochemistry 102, 196-202.
- Hiramatsu,R., Aikawa,J., Horinouchi,S., Beppu,T. (1989). Secretion by yeast of the zymogen form of *Mucor* rennin, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, and its conversion to the mature form. Journal of Biological Chemistry 264, 16862-16866.
- Ichishima,E., Hanzawa,S., Watanabe,M.,Takeuchi,M. (1986). Electrophoretic heterogeneity and age-related change of serine proteinase from *Aspergillus sojae*. Current Microbiology 13, 231-235.
- Ikasari, L., Mitchell,D. (1996). Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 19, 171-175.
- Inoue,H., Kimura,T., Makabe,O., Takahashi,K. (1991). The gene and deduced protein sequences of the zymogen of *Aspergillus niger* Acid Proteinase A. Journal of Biological Chemistry 266, 29, 19484-19489.
- Jarai,G., Buxton,F. (1994). Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. Current Genetics 26, 238-244.

- Kalisz,H. (1988). Microbial Proteinases. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 36, 1-63.
- Kato,M., Aoyama,A., Naruse,F., Kobayashi,T., Tsukagoshi,N. (1996). An *Aspergillus nidulans* nuclear protein, AnCP, involved in enhancement of taka-amylase A gene expression, binds to the CCAAT containing *taaG2*, *amdS* and *gatA* promoters. Molecular and General Genetics 254, 119-126.
- Kelavkar,U., Chhaptar,H. (1992). Role of amino acids in halotolerant *Aspergillus repens*. Fungal genetics newsletters, 39.
- Khan,M., Bashir,R., Ullah,K. (1984). Protease production by *Aspergillus niger* in surface culture. Journal of Natural Sciences and Mathematics 25, 1, 59-64.
- Klapper,B., Jameson,D., Mayer,R. (1973). Factors affecting the synthesis and release of the extracellular protease of *Aspergillus oryzae* NRRL 2160. Biochimica et Biophysica Acta 304, 513-519.
- Kozakiewicz,Z. (1989). *Aspergillus* species on stored products. Mycological Papers N°161. CAB International, Wallingford, Oxon, UK
- Laemmli,U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Larroche,C., Gros,J. (1992). Characterization of the behavior of *Penicillium roquefortii* in solid state cultivation on support by material balances. Journal of Fermentation and Bioengineering 74, 5, 305-311.
- Lin,X., Liu,M., Tang,J. (1992). Heterologous expression of thermopsin, a heat-stable acid proteinase. Enzyme and Microbial Technology 14, 696-701.
- Lin,X., Tang,J. (1995). Thermopsin. Methods in Enzymology 248, 156-168.
- Löffler,A. (1986). Proteolytic Enzymes: sources and applications. Food Technology, January, 63-70.
- Lonsane,B., Ghildyal,N. (1992c). Exoenzymes. In Solid Substrate Cultivation, ed. H.Doelle, D.Mitchell, C.Rolz, Elsevier Applied Science, London and New York, 11, 191-209.
- Lonsane,B., Ghildyal,N., Budiatman,S. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 7, 258-265.

- Lonsane,B., Ghildyal,N., Ramakrishna,M. (1992a). Health and safety aspects of working with solid substrate processes. In Solid Substrate Cultivation, ed. H.Doelle, D.Mitchell, C.Rolz, Elsevier Applied Science, London and New York, 20, 385-401.
- Lonsane,B., Saucedo-Castaneda,G., Raimbault,M., Roussos,S., Viniegra-Gonzalez,G., Ghildyal,N., Ramakrishna,M., Krishnaiah,M. (1992b). Scale-up strategies for solid state fermentation systems. Process Biochemistry 27, 259-273.
- MacKenzie,D.A., Jeenes,D.J., Belshaw,N.J., Archer,D.B. (1993). Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. Journal of General Microbiology 139, 2295-2307.
- Malathi,S., Chakraborty,R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. Applied and Environmental Microbiology 57, 3, 712-716.
- Manning,M., Patel,K., Borchardt,R. (1989). Stability of protein pharmaceuticals. Pharmaceutical Research 6, 11, 903-918.
- Maps. (1999). Página web: <http://www.maps-enzymes.com/backgrd.htm#top>.
- Mattern,I., Van Noort,J., Van Den Berg,P., Archer,D.,Roberts,I., Van Den Hondel,C. (1992). Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. Molecular and General Genetics 234, 332-336.
- Michotey,V., Blanco,C. (1994). Characterization of an endoserine protease secreted by *Arthrobacter aureus*. Applied and Environmental Microbiology 60, 1, 341-343.
- Mildenhall,J., Prior,B. (1983). Water relations of *Erwinia chrysanthemi*: Intracellular and extracellular pectate lyase production. Journal of General Microbiology 129, 3019-3025.
- Mitchell,D. (1992a). Biomass determination in solid-state cultivation. In Solid Substrate Cultivation, ed., H.Doelle, D.Mitchell, C.Rolz, Elsevier Applied Science, London and New York, 4, 53-63.
- Mitchell,D. (1992b). Growth patterns, growth kinetics and the modelling of growth in solid-state cultivation. In Solid Substrate Cultivation, ed., H.Doelle, D.Mitchell, C.Rolz, Elsevier Applied Science, London and New York, 6, 87-114.
- Mitchell,D., Lonsane,B. (1992d). Definition, characteristic and potential. In Solid Substrate Cultivation, ed., H.Doelle, D.Mitchell, C.Rolz, Elsevier Applied Science, London and New York, 1, 1-16.

- Mitchell,D., Lonsane,B., Durand,A., Renaud,R., Almanza,S., Maratray,J., Desgranges,C., Crooke,P., Hong,K., Tanner,R., Malaney,G. (1992e). General principles of reactor design and operation for SSC. In Solid Substrate Cultivation, ed., H.Doelle, D.Mitchell, C.Rolz, Elsevier Applied Science, London and New York, 7, 115-139.
- Mitchell,D., Targonski,Z., Rogalski,J., Leonowicz,A. (1992c). Substrates for processes. In Solid Substrate Cultivation, ed., H.Doelle, D.Mitchell, C.Rolz, Elsevier Applied Science, London and New York, 3, 29-52.
- Mitchell.D., Doelle,H., Greenfield,P. (1988). Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 28, 598-602.
- Montes,A. (1981). Bromatología. Ed. Universitaria de Buenos Aires.
- Montgomery,D. (1984). Design and analysis of experiments. Eds. J.Wiley & Sons, U.S.A, 540 p.
- Morihara,K. (1974). Comparative specificity of microbial proteinases. Advances in Enzymology 41, 179-243.
- Mozhaev,V. (1993). Mechanism based strategies for protein thermostabilization. Tibtech 11, 88-95.
- Mudgett,R. (1986). Solid state fermentations. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, ed. A.L.Demain & H.A.Solomon, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 7, 66-83.
- Nakadai,T., Nasuno,S. (1988). Culture conditions of *Aspergillus oryzae* for production of enzyme preparation. Journal of Fermentation Technology 66, 5, 525-533.
- Nandakumar,M., Thakur,M., Raghavarao,K., Ghildyal,N. (1996). Substrate particle size reduction by *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 18, 121-125.
- Narahara,H., Koyama,Y., Yoshida,T., Atthasampunna,P., Taguchi,H. (1984). Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Journal of Fermentation Technology 62, 5, 453-459.
- Narahara,H., Koyama,Y., Yoshida,T., Pichangkura,S., Ueda,R., Taguchi,H. (1982). Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Journal Fermentation Technology 60, 4, 311-319.

- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
- Ngadi, M., Correia, L. (1992). Kinetics of solid-state ethanol fermentation from apple pomace. *Journal of Food Engineering* 17, 97-116.
- Nickels, J., Schepis, L., Yavelow, J. (1994). Partial purification and properties of a serine protease from transformed C3H/10T1/2 cells. *Journal of Food Biochemistry* 18, 1-15.
- Nishio, N., Tai, K., Nagai, S. (1979). Hydrolase.
- North, M. (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganism. *Microbiological Reviews* 46, 3, 309-340.
- Novo Nordisk. (1999a). The history of enzyme technology. Página web: <http://www.novo.dk/enzymes/Technology.htm>.
- Novo Nordisk. (1999b). The brewing industry. Página web: <http://www.novo.dk/enzymes/Industries.htm>.
- Novo Nordisk. (1999c). The food functionality industry. Página web: <http://www.novo.dk/enzymes/Industries.htm>.
- Okazaki, N., Sugama, S., Tanaka, T. (1980). Mathematical model for surface culture of koji mold. *Journal of Fermentation Technology* 58, 5, 471-476.
- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzales, G. (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27, 498-503.
- Ornstein, L., Davis, J. (1962). Disc electrophoresis. Distillation Products Ind., Rochester and Canalco, brochures, Bethesda, unpublished.
- Öste-Triantafyllou, A., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1996). Calorimetric studies on solid α -chymotrypsin preparations in air and in organic solvents. *Biochimica e Biophysica Acta* 1295, 110-118.
- Oteng-Gyang, K., Moulin, G., Galzy, P. (1980). *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9, 129-132.
- Oxenboll, K. (1994). *Aspergillus* enzymes and industrial uses. In *The Genus Aspergillus*, de. Powell, K., Plenum Press, New York, 147-153.

- Padmanabhan,S., Ramana Murthy,M., Lonsane,B. (1993). Potential of *Aspergillus oryzae* CFTRI 1480 for producing proteinase in high titres by solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 499-503.
- Pandey,A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 27, 109-117.
- Paredes-Lopez,O., Gwyneth,I. (1988). Food biotechnology review: traditional solid state fermentations of plant raw materials-application, nutritional significance, and future prospect. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 27, 3, 159-187.
- Park,J., Nemoto,Y., Homma,T., Jing,W., Chen,Y, Matsuoka,H., Ohno,H., Takatori,K., Kurata,H. (1993). Adaptation of *Aspergillus niger* to short-term salt stress. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 40, 394-398.
- Pascual, S., Melgarejo,P., Magan,N. (1997). Induction of submerged conidiation of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48, 389-392.
- Peleg,M. (1996). A model of microbial growth and decay in a closed habitat based on combined Fermi's and the logistic equations. *Journal Sci. Food. Agric.* 71, 225-230.
- Peñaloza,W., Molina,M., Brenes,R., Bressani,R. (1985). Solid state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffe pulp. *Applied and Enviromental Microbiology* 49, 388-393.
- Piechura,J., Kurup,V., Daft,L. (1989). Isolation and immunochemical characterization of fractions from membranes of *Aspergillus fumigatus* with protease activity. *Canadian Journal of Microbiology* 36, 33-41.
- Power,J. (1993). Enzymes in brewing. In *Enzymes in Food Processing*, ed. Nagodawithana,T. and Reed,G., Academic Press, San Diego, 17, 439-457.
- Prakash,J. (1996). Rice bran proteins: properties and food uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, 6, 537-552.
- Prior,B., Du Preez,J., Rein,P. (1992). Environmental Parameters. In *Solid Substrate Cultivation*, ed., H.Doelle, D.Mitchell, C.Rolz, Elsevier Applied Science, London and New York, 5, 65-85.
- Prosser,J. (1982). Growth of fungi. In: Bazin MJ (ed) *Microbial Population Dynamics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 125-166.

- Raimbault, M. (1997). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. In International Training Course Solid State Fermentation. FMS97. Curitiba, Paraná, Brasil.
- Raimbault, M., Alazard, D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 9, 199-209.
- Ramakrishna, N., Lacey, J., Smith, J. (1993). Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. Mycological Research 97, 11, 1393-1402.
- Ramana Murthy, M., Karanth, N., Raghava Rao, K. (1993). Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. Advances and Applied Microbiology 38, 99-147.
- Ramesh, M., Lonsane, B. (1990). Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation system. Applied Microbiology and Biotechnology 33, 501-505.
- Raper, K., Fennell, D. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Rawlings, N., Barrett, A. (1995). Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. Methods in Enzymology 248, 7, 105-120.
- Roche, N., Venague, A., Desgranges, C., Durand, A. (1993). Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. Biotechnology Advances 11, 677-683.
- Rodriguez Leon, J. (1997). Desarrollo del estudio de la cinética de los procesos fermentativos en estado sólido. In International Training Course Solid State Fermentation. FMS97. Curitiba, Paraná, Brasil.
- Roukas, T., Kotzekidou, P. (1986). Production of citric acid from brewery wastws by surface fermentation using *Aspergillu niger*. Journal of Food Science 51, 1, 225-228.
- Roussos, S. (1997). Continuous enzymes and fungal metabolites production in solid state fermentation using a counter-current reactor. In International Training Course Solid State Fermentation. FMS97. Curitiba, Paraná, Brasil.
- Roussos, S., Aquiahualt, M., Brizuela, M., Olmos, A., Rodriguez, W., Viniegra, G. (1989). Production, conservation and viability of filamentous fungi inoculum for solid state fermentation. Micol. Neotrop. Apl. 2, 3-17.

- Roussos,S., Olmos,A., Raimbault,M., Saucedo-Castaneda,G., Lonsane,B. (1991). Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques* 5, 6, 415-420.
- Salvesen,G., Nagase,H. (1989). Inhibition of proteolytic enzymes. In *Proteolytic enzymes A practical approach*, ed. R.J.Beynon and J.S.Bond, IRL Press, Oxford University Press, England, 5, 83-104.
- Sargantanis,J., Karim,M., Murphy,V., Ryoo,D., Tengerdy,R. (1993). Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 149-158.
- Sarkar,S., Caddick,M.X., Bignell,E, Tilburn,J., Arst,H.N. (1996). Regulation of gene expression by ambient pH in *Aspergillus*: genes expressed at acid pH. *Biochemical Society Transactions* 24, 360-363.
- Sarrete,M., Nout,M., Gervais,P., Roumbouts,F. (1992). Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 420-425.
- Schilling,L., Milo,L., Martin,S. (1996). Phospholipase C production of *Listeria monocytogenes* SLCC 5764 cultured with various salt concentrations, pHs, and temperatures. *Journal of Food Protection* 59, 5, 472-475.
- Seaby,D., McCracken,A., Blakeman,J. (1988). Experimental determination of requirements for the growth of edible *Rhizopus* species for use in solid substrate fermentation systems. *Journal of Sci. Food Agric.* 44, 289-299.
- Sekine,H., Nasuno,S., Iguchi,N. (1969). Isolation of highly proteolytic mutants from *Aspergillus sojae*. *Agr. Biol.Chem.* 33, 10, 1477-1482.
- Sessa,D. (1992). Hydration effects on the thermal stability of proteins in cracked soybeans and defatted soy flour. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 25,4.
- Shinmyo,A., Davis,I., Nomoto,F., Tahara,T., Enatsu,T. (1978). Catabolite repression of hydrolases in *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 5, 59-68.
- Singh,A., Ghosh,V., Ghosh,P. (1994). Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiology* 18, 177-180.
- Smith Lang,K., Steimberg,M. (1981). Linearization of the water sorption isotherm for homogeneous ingredients over A_w 0.3-0.95. *Journal of Food Science* 46, 5, 1450-1452.

- Smits,J., Rinzema,A., Tramper,J., van Sonsbeek,H., Hage,J., Kaynak,A., Knol,W. (1998). The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 50-57.
- Soccol,C. (1997a). Some experiments for the valorization of agro-industrial residues by solid state fermentation. III- Citric acid production from cassava bagasse. In International Training Course Solid State Fermentation. FMS97. Curitiba, Paraná, Brasil.
- Soccol,C. (1997b). Some experiments for the valorization of agro-industrial residues by solid state fermentation. I- Biotransformation of residues from cassava starch production by *Rhizopus* genus. In International Training Course Solid State Fermentation. FMS97. Curitiba, Paraná, Brasil.
- Soccol,C., Iloki,I., Marin,B., Raimbault,M. (1994). Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentations. *Journal of Food Science and Technology* 31, 4, 320-323.
- Soccol,C., Stertz,S., Raimbault,M., Pinheiro,L. (1995). Biotransformation of solid waste from cassava starch production by *Rhizopus* in solid state fermentation. Part II - Optimization of the culture conditions and growth kinetics. *Arq. Biol. Tecnol.* 38, 4, 1311-1318.
- Somkuti,G., Babel,F. (1968). Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. *Journal of Bacteriology* 95, 4, 1407-1414.
- Sproessler,B. (1993). Milling and Baking. In *Enzymes in Food Processing*, ed. Nagodawithana,T. and Reed,G., Academic Press, San Diego, 11, 293-320.
- Statistix version 4.1. User's manual. (1994). Analytical Software, 330 p.
- Steinke,F. (1992). Nutritional value of soybean protein foods. In *New protein foods in human health: nutrition, prevention and therapy*, ed. F.Steinke, D.Waggle and M.Volgarev, CRC Press, Boca Raton, FL, 59-66.
- Swift,M. (1973). The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi. *Soil Biol. Biochem.* 5, 321-332.
- Takahashi,K. (1995). Proteinase A from *Aspergillus niger*. *Methods in Enzymology* 248, 146-155.
- Takahashi,K., Inoue,H., Sakai,K., Kohama,T., Kitahara,S., Takishima,K., Tanji,M., Athauda,S., Takahashi,T., Akanuma,H., Mamiya,G., Yamasaki,M. (1991). The

- primary structure of *Aspergillus niger* Acid Proteinase A. Journal of Biological Chemistry 266, 29, 19480-19483.
- Tani,Y., Vongsuvanlert,V., Kumnuanta,J. (1986). Raw cassava starch digestive glucoamylase of *Aspergillus* sp.N-2 isolated from cassava chips. Journal of Fermentation Technology 64, 5, 405-410.
- Taragano,V., Pilosof,A. (1999). Application of Dohler designs for water activity, pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid- state and submerged fermentation. Enzyme and Microbial Technology 25, 411-419.
- Tatsumi,H., Murakami,S., Tsuji,R., Ishida,Y., Murakami,K., Masaki,A., Kawabe,H., Arimura,H., Nakano,E., Motai,H. (1991). Cloning and expression in yeast of a cDNA clone encoding *Aspergillus oryzae* neutral protease II, a unique metalloprotease. Molecular and General Genetics 228, 97-103.
- Tatsumi,H., Ogawa,Y., Murakami,S., Ishida,Y., Murakami,K., Masaki,A., Kawabe,H., Arimura,H., Nakano,E., Motai,H. (1989). A full lenght cDNA clone for the alkaline protease from *Aspergillus oryzae*: Structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and General Genetics 219, 33-38.
- Teramoto,Y., Saigusa,N., Yoshida,Y.,Ueda,S. (1994a). Production and characteristics of red rice sake. J. Inst. Brew. 100, 3-6.
- Teramoto,Y., Saigusa,N.,Ueda,S. (1994b). Effects of proteolytic activity on the characteristics of aromatic red rice wine. J. Inst. Brew. 100, 163-166.
- Terebiznik,M. (1998). α -amilasa de *Aspergillus oryzae*: estudios de producción por fermentación en sustrato sólido, purificación y estabilización. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires. 222 p.
- Terebiznik,M., Pilosof,A. (1999). Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. Biotechnology Techniques 13, 215-219.
- Troller,J. (1980). Influence of water activity on microorganism in foods. Food Technology, May, 76-80,82.
- Tsuchiya,K., Arai,T., Seki,K., Kimura,T. (1987). Purification and some properties of alkaline proteinases from *Cephalosporium* sp.KM388. Agric.Biol.Chem. 51, 11, 2959-2965.

- Tsuji,A., Kinoshita,T., Hoshino,M. (1969). Analytical-chemical studies of amino sugars. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone-hydrazone hydrochloride. Chem. Pharm. Bull. 17, 1505-1510.
- Tsujita,Y., Endo,A. (1976). Purification and characterization of the two molecular forms of *Aspergillus oryzae* acid protease. Biochimica et Biophysica Acta 445, 194-204.
- Ueda,S., Teramoto,Y. (1995). Design of microbial processes and manufactures based on the specialities and traditions of a region: a kumamoto case. Journal of Fermentation and Bioengineering 80, 5, 522-527.
- Ueki,T., Noda,Y., Teramoto,Y., Ohba,R., Ueda,S. (1994a). Practical soy sauce production using a mixed koji-making system. Journal of Food Fermentation and Bioengineering 78, 3, 262-264.
- Ueki,T., Noda,Y., Teramoto,Y., Ohba,R., Ueda,S. (1994b). Increasing glutaminase activity in shoyu koji using a mixed culture of two koji molds. World Journal of Microbiology & Biotechnology 10, 694-696.
- Ueno,S., Miyama,M., Ohashi,Y., Izumiya,M., Kusaka,I. (1987). Secretory enzyme production and conidiation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid culture. Applied Microbiology and Biotechnology 26, 273-276.
- Uhlig,H. (1998). The market for technical enzyme preparations. In Industrial Enzymes and their Applications, ed. John Wiley & Sons, USA-Canada, 8, 425-426.
- Ustyuzhanina,S., Yarovenko,V. (1985). Synthesis of protease and α -amilase by the fungus *Aspergillus oryzae* 251-90. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya 20, 5, 616-621.
- Villegas,E., Aubague,S., Alcantara,L., Auria,R., Revah,S. (1993). Solid State Fermentation: acid protease production in controlled CO₂ y O₂ environments. Biotechnology Advances 11, 387-397.
- Villettaz,J-C. (1993). Wine. In Enzymes in Food Processing, ed. Nagodawithana,T. and Reed,G., Academic Press, San Diego, 16, 423-437.
- Viniegra,G., Augur,C. (1997). Mutagenesis and adapted strains to the growth in liquid or solid substrates. In International Training Course Solid State Fermentation. FMS97. Curitiba, Paraná, Brasil.
- Viniegra,G., Augur,C. (1997). Production of enzymes by SSF, relation substrate/enzyme and induction/catabolic repression. In International Training Course Solid State Fermentation. FMS97. Curitiba, Paraná, Brasil.

- Vrábel,P., Polakovic,M., Stefuca,V., Báles,V. (1997). Analysis of mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Evaluation of multitemperature data applied to inactivation of yeast invertase. *Enzyme and Microbial Technology* 20, 348-354.
- Wainwright,M. (1992). Obtención de productos químicos a partir de hongos. En *Introducción a la Biotecnología de los Hongos*, ed. Acribia, Zaragoza, 3, 41-56.
- Wang,D., Cooney,C., Demain,A., Dunnill,P., Humphrey,A., Lilly,M. (1979). Fermentation kinetics. In *Fermentation and Enzyme Technology*, eds. John Wiley & Sons, Wiley-Interscience, New York Chichester Brisbane Toronto, 6, 57-97.
- Wang,H., (1967). Release of proteinase from mycelium of *Mucor hiemalis*. *Journal of Bacteriology* 93, 6, 1794-1799.
- Wang,H., Hesseltine,C. (1965). Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. *Canadian Journal of Microbiology* 11, 727-732.
- Wang,H., Hesseltine,C. (1970). Multiple forms of *Rhizopus oligosporus* protease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 140, 459-463.
- Wang,H., Vespa,J., Hesseltine,C. (1974). Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. *Applied Microbiology* 27, 5, 906-911.
- Whiting,R., Buchanan,R. (1994). Microbial Modeling. *Food Technology* 48, 6, 113-120.
- Wright,D., (1989). Application of scanning calorimetry to the study of protein behaviour in foods. In *Developments in Food Proteins-I*, ed. Hudson,B, Applied Science Publishers, London-New Jersey, 61-89.
- Yang,F-C., Lin,I-H. (1998). Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 397-402.
- Yang,S-S., Chiu,W-F. (1986). Protease production with sweet potato residue by solid state fermentation. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* 19, 276-288.
- Yasuhara,A., Ogawa,A., Tanaka,T., Sakiyama,T., Nakanishi,K. (1994). Production of neutral protease from *Aspergillus oryzae* by a novel cultivation method on a microporous membrane. *Biotechnology Techniques* 8, 4, 249-254.
- Zhu,H., Dancik,B., Higginbotham,K. (1994). Regulation of extracellular proteinase production in an ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. *Mycologia* 86, 2, 227-234.