Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

# Pectinasas fúngicas : estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados

Taragano, Viviana M.

2000

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:
Taragano, Viviana M.. (2000). Pectinasas fúngicas : estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3253_Taragano.pdf

Cita tipo Chicago:
Taragano, Viviana M.. "Pectinasas fúngicas : estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3253_Taragano.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

FCE y N BIBLIOTECA

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

# Pectinasas fúngicas: estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados

**Autora: Lic. Viviana M. Taragano**

**Directora: Dra. Ana M. R. Pilosof**

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

2000

3253
Nº 3253

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

FCEyN BIBLIOTECA

# Fungal pectinases: comparative studies of production from submerged and solid state fermentation and stability in dehydrated systems

Author: Lic. Viviana M. Taragano

Director: Dra. Ana M. R. Pilosof

Doctoral thesis

Universidad de Buenos Aires

2000

# RESUMEN

## Pectinasas fúngicas: estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados

Se optimizaron las condiciones de fermentación en medio líquido (FEL) y sólido (FES) para obtener extractos con alta actividad pectinliasa y poca pectinesterasa a partir de la cepa *Aspergillus niger 148*, seleccionada entre 165 cepas.

Se caracterizaron cinéticamente las fermentaciones para: azúcares reductores y proteínas en el medio de fermentación; biomasa (ajustó al modelo logístico siendo inversa a la evolución del pH); producción de las tres enzimas del complejo pectinolítico y conidiación (en FES)

En FEL, se estudió el efecto combinado de la $a_w$ y la represión catabólica por glucosa, observándose efectos diferenciales en cada enzima.

Los pesos moleculares de las pectinasas se determinaron por SDS-PAGE siendo: pectinliasa: 48,2 kDa; poligalacturonasa: 39,1 kDa; pectinesterasa: 26,9 kDa.

Se utilizó un diseño experimental de red de Doehlert y una metodología de superficies de respuesta, para comparar el efecto de pH, $a_w$ y tiempo en la producción de pectinasas por FES y FEL. Una FES realizada a $a_w$ 0,981 y pH 7 por 3 días permitió obtener un extracto rico en pectinliasa (65% de las proteínas totales).

Se caracterizo la entalpía y temperatura de desnaturalización y la temperatura de transición vítrea de la pectinliasa deshidratada y parcialmente purificada en función de la humedad .

Estudios cinéticos comparativos de la desnaturalización y pérdida de actividad pectinliasa del extracto deshidratado o en solución, indicaron que el principal mecanismo de pérdida de actividad enzimática en solución sería la desnaturalización a diferencia del sistema deshidratado, donde la pérdida de actividad de la enzima no se vio asociada con la desnaturalización



Palabras clave: pectinasas; fermentación sumergida; fermentación en estado sólido; represión catabólica; conidiación; desnaturalización,inactivación

# ABSTRACT

Fungal pectinases: comparative studies of production by submerged and solid state fermentation and stability in dehydrated systems

*Aspergillus niger* 148 was selected between 165 strains and fermentations in solid (SSF) and submerged (SmF) state were carried out in order to optimize the production of pectinolytic extracts rich in pectinlyase and with low pectinesterase activity.

Kinetics of: reducing sugars and proteins in fermentation medium; biomass (it fitted to the logistic model and was inverse to pH evolution); production of the three pectinolytic enzymes and conidiation (in SSF) were determined.

Combined effect of $a_w$ and catabolite repression by glucose in SmF was studied. Differential effects for each enzyme were observed.

Molecular weights of pectinases were determined by means of SDS-PAGE: pectinlyase: 48,2 KDa; polygalacturonase: 39,1 KDa; pectinesterase: 26,9 KDa.

A Doehlert experimental design and a surface response methodology were used in order to compare pH, $a_w$ and time effects in SSF and SmF. The following conditions for SSF allowed the production of a rich pectinlyase extract (65% of total proteins): $a_w$: 0,981; pH: 7 and 3 days of fermentation.

Enthalpy and denaturation temperatures, as well as glass transition temperature, were determined in the dehydrated and partially purified rich pectinlyase extract as affected by moisture.

Comparative kinetic studies of denaturation and pectinlyase activity loss in dehydrated and solubilized pectinlyase extract indicated that denaturation might be the main mechanism of activity loss in solution. Contrarily, activity loss in dehydrated extract was not associated with denaturation.



Key words: pectinases; solid state fermentation; submerged fermentation; catabolite repression; conidiation; denaturation; inactivation.

*mis*

# Agradecimientos

*A Ana Pilosof, que me guió con inteligencia y afecto en el trabajo intelectual y de laboratorio.*

*A Marta Segovia de Huergo, por permitirme realizar gran parte del trabajo experimental en el Laboratorio de Microbiología Industrial que dirige.*

*A Mauricio Terebiznik, que con su eterno buen humor y buena disposición, hizo más llevaderos todos los problemas cotidianos.*

*A Dina Carp, que además de compañera de laboratorio se transformó en una entrañable amiga.*

*A mis compañeros de grupo Virginia Sánchez, Beatriz Elizalde, Vanesa Zylberman y Rosa Baeza por las diacusiones productivas y los almuerzos cotidianos.*

*A toda la gente del Laboratorio de Microbiología Industrial por la buena onda y los momentos compartidos: Patricia Cerrutti, Maria del Carmen Castro, Patricia Lodato, Silvia Cardona y Silvia.*

*A María Elena Chaparro y María del Carmen Castro por ayudarme con Lucía bebé.*

*A los buenos vecinos del laboratorio 211, con quienes compartimos seminarios, equipos, conversaciones y tortas de cumpleaños: Pilar Buera, Carolina Schebor (con quien además compartimos las mismas vivencias en este período de formación), Florencia Mazzobre y Leila Burin.*

*A Pablo por ayudarme con los problemas de hardware y Software y por quererme mucho.*

# *Indice*

**INTRODUCCIÓN** ..... **4**
**1. ENZIMAS DE USO INDUSTRIAL: CONSIDERACIONES GENERALES** ..... **5**
**2. PECTINA Y PECTINASAS** ..... **7**
**3. TECNOLOGIAS DE FERMENTACIÓN** ..... **10**
3.1. FERMENTACIÓN SUMERGIDA O EN ESTADO LÍQUIDO (FEL) ..... 11
3.2. FERMENTACIÓN EN SUSTRATO O ESTADO SÓLIDO (FES) ..... 12
3.3. COMPARACIÓN ENTRE FERMENTACIÓN EN ESTADO LÍQUIDO Y FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO ..... 12
3.4. HISTORIA, APLICACIONES ACTUALES Y PERSPECTIVAS DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO ..... 18
3.5. VARIABLES DE PROCESO EN FEL ..... 25
3.6. VARIABLES DE PROCESO EN FES ..... 27
**4. ESTABILIZACIÓN DE ENZIMAS** ..... **30**
4.1 INACTIVACIÓN TÉRMICA DE ENZIMAS ..... 30
4.2 ESTRATEGIAS DE ESTABILIZACIÓN ..... 35
4.2.1 Teoría de la transición vítrea ..... 38
4.2.2 Mecanismos responsables de la estabilización de enzimas en matrices de baja humedad. ..... 43

**OBJETIVOS** ..... **45**

**MATERIALES Y MÉTODOS** ..... **47**
**1. SELECCIÓN DE CEPAS PECTINOLÍTICAS** ..... **48**
1.1 CRECIMIENTO DE CEPAS ..... 48
1.1.1 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE SCREENING ..... 48
1.1.2 SELECCIÓN ..... 49
**2. ENSAYOS BIOQUÍMICOS** ..... **50**
2.1 ACTIVIDAD PECTINLIASA ..... 50
2.2 ACTIVIDAD PECTINESTERASA ..... 50
2.3 ACTIVIDAD POLIGALACTURONASA ..... 51
2.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES ..... 52
2.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ..... 52
2.6 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA ..... 52
**3. FERMENTACIONES** ..... **53**
3.1 FERMENTACIONES EN ESTADO LÍQUIDO (FEL) ..... 53
3.1.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE FERMENTACIÓN ..... 53
3.1.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO ..... 54
3.1.3 FERMENTACIÓN ..... 55
3.1.4 EFECTO COMBINADO DE GLUCOSA Y $a_w$: MODELADO MATEMÁTICO ..... 55
3.2 FERMENTACIONES EN ESTADO SÓLIDO (FES) ..... 56
3.2.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE FERMENTACIÓN ..... 56
3.2.2 ISOTERMAS DEL SUSTRATO DE FERMENTACION ..... 57
3.2.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO ..... 57
3.2.4 FERMENTACIÓN ..... 57
3.2.5 DETERMINACIÖN DE PESO SECO Y HUMEDAD ..... 57
3.2.6 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO ..... 58
3.2.7 ESTUDIO DE LA CONIDIACIÓN ..... 58
3.3 COMPARACIÓN ENTRE FES Y FEL ..... 58
3.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL ..... 58
3.3.2 COMPARACIÓN ENTRE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN AMBOS TIPOS DE FERMENTACIÓN ..... 62
**4. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA** ..... **62**
4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ..... 62

4.2 ISOTERMA DEL EXTRACTO DESHIDRATADO ..... 63
4.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) ..... 63
4.4 CINETICA DE DESNATURALIZACIÓN ..... 64
4.5 ENSAYOS DE INACTIVACION TÉRMICA DE PECTINLIASA. ..... 65
4.6 EFECTO DEL pH EN LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA ..... 66
**5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS ..... 66**

**RESULTADOS ..... 67**

**Capítulo 1: Fermentación ..... 68**
**1.SELECCIÓN DE UNA CEPA PARA LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS ..... 69**
1.1 ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA EN PLACAS DE PETRI ..... 69
I.2 SELECCION EN PLACA DE CEPAS PECTINOLÍTICAS ..... 71
**2. FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO ..... 73**
2.1. COMPARACIÓN DE CEPAS PECTINOLÍTICAS EN DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACIÓN ..... 73
2.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE PL ..... 75
2.2.1 Efecto de la concentración de inductor en la producción de pectinasas ..... 75
2.2.2 Efecto del tamaño de inóculo en la producción de pectinasas ..... 77
2.2.3. Efecto del pH inicial en la producción de pectinasas ..... 78
2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ..... 79
2.3.1 Crecimiento fúngico y evolución del pH en el medio de fermentación ..... 80
2.3.2 Evolución de los azúcares reductores en el medio de fermentación ..... 82
2.3.3 Evolución de las proteínas solubles en el medio de fermentación ..... 84
2.3.4. Producción de pectinasas ..... 85
2.4. EFECTO COMBINADO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA Y LA REPRESIÓN CATABÓLICA EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS ..... 89
2.4.1. Elección del depresor de $a_w$ ..... 89
2.4.2. Efecto del $PEG_{200}$ "per se" sobre la actividad pectinolítica ..... 91
2.4.3. Represión catabólica de pectinasas por glucosa ..... 92
2.4.4. Efecto combinado de la $a_w$ y la glucosa en la evolución de la fermentación ..... 94
Efecto de la $a_w$ y la glucosa en la producción de biomasa ..... 95
Evolución del pH ..... 98
Evolución de proteínas solubles ..... 99
Evolución de los azúcares reductores en el medio de fermentación ..... 100
Producción de PL ..... 102
Producción de PE ..... 104
Producción de PG ..... 106
2.5 EFECTO DE LA $A_w$ Y EL pH DE FERMENTACIÓN EN LA INCORPORACIÓN DE AZÚCARES ..... 110
**3. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO ..... 113**
3.1. EVALUACIÓN DE DISTINTOS SUSTRATOS PARA FES ..... 114
3.2. ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE SALVADO –PECTINA ..... 117
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ..... 119
3.3.1. Crecimiento fúngico ..... 119
3.3.2. Evolución del pH en el medio de fermentación ..... 121
3.3.3. Producción de pectinasas por FES ..... 122
3.3.4. Estudio de la conidiación en FES: Efecto de la $a_w$, pH inicial y tiempo de fermentación ..... 125
**4. CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PECTINASAS ..... 132**
**5. COMPARACIÓN ENTRE FES Y FEL: EFECTO DE LA $A_w$, pH Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS ..... 138**
5.1 CRECIMIENTO FÚNGICO ..... 139
5.2. PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR FES Y FEL ..... 144

5.2.1. MODELO DE REGRESIÓN ..... 147
Fermentación en estado sólido ..... 148
Fermentación en estado líquido ..... 150
5.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO PECTINOLÍTICO RICO EN PL ..... 150
5.4. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS DE REGRESIÓN ..... 154
5.5. PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS EN FES Y FEL ..... 156

**CAPÍTULO 2: Estabilidad de la pectinliasa ..... 158**
**1. ESTUDIO DE LAS TRANSICIONES TÉRMICAS DEL EXTRACTO PECTINOLÍTICO. ..... 159**
1.1. ISOTERMA DE SORCIÓN DEL EXTRACTO PECTINOLÍTICO DESHIDRATADO ..... 161
1.2. EFECTO DE LA HUMEDAD Y $A_w$ EN LAS TRANSICIÓNES TÉRMICAS DEL EXTRACTO DESHIDRATADO ..... 161
1.2.1. Temperatura de desnaturalización ..... 161
1.2.2. Temperatura de transición vítrea ..... 165
1.2.3. Entalpía de desnaturalización ..... 167
1.3. CINÉTICA DE DESNATURALIZACIÓN Y PÉRDIDA DE ACTIVIDAD DE PL DESHIDRATADA ..... 171
1.4. CINÉTICA DE DESNATURALIZACIÓN Y PÉRDIDA DE ACTIVIDAD DE PL EN SOLUCIÓN ..... 182
**2. EFECTO DEL pH EN LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO DESHIDRATADO. ..... 187**
**3. EFECTO DEL AGREGADO DE ADITIVOS EN LA ESTABILIDAD DE PL DESHIDRATADA ..... 189**

**CONCLUSIONES GENERALES ..... 195**

**BIBLIOGRAFÍA ..... 198**

**ANEXO ..... 230**
**DISEÑO EXPERIMENTAL ..... 231**

# *Introducción*

# 1. ENZIMAS DE USO INDUSTRIAL: CONSIDERACIONES GENERALES

En los últimos 20 años la producción y venta de enzimas de uso industrial ha crecido enormente. El uso de las enzimas en la industria representó en 1980 U$S 300 millones de los cuales 45 millones estuvieron relacionados con la industria alimenticia y de estos, 0,25 millones estuvieron representados por las pectinasas (Sakai,1993; Tucker, 1996).

En 1998 se han facturado en el mundo cerca de U$S 1000 millones en relación a la venta de enzimas de uso industrial y este mercado ha crecido más de un 10% anual en los últimos 4 años. Los mercados de mayor crecimiento en este período han sido Latinoamérica y Asia (excluido Japón) (página de Novo en Internet).

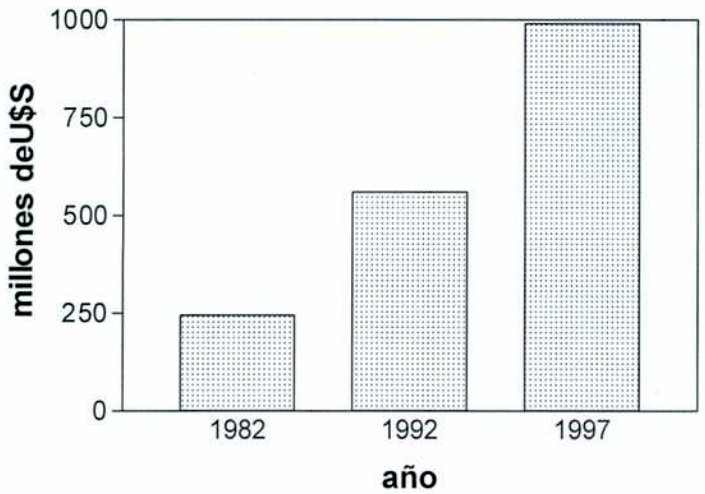



Figura 1: Venta mundial total de enzimas de uso industrial.
Fuente: Reporte anual 1998 de Novo Nordisk en Internet.

Debido a los avances biotecnológicos de los últimos 20 años (incluyendo el desarrollo de proteínas recombinantes), ha habido un crecimiento considerable en el uso de las enzimas como catalizadores industriales, herramientas de diagnóstico clínico, en la industria farmacéutica,en biología molecular (por ejemplo enzimas de restricción) y otras diversas aplicaciones analíticas.

En la Figura 2, se muestra el consumo de enzimas por parte de distintas industrias (en cuanto a dinero gastado en su compra). Se puede apreciar el crecimiento general en el consumo de enzimas y se ve que el rubro que más ha crecido es el de investigación y biotecnología, casi equiparando a la de los detergentes y superando a la industria alimentaria.

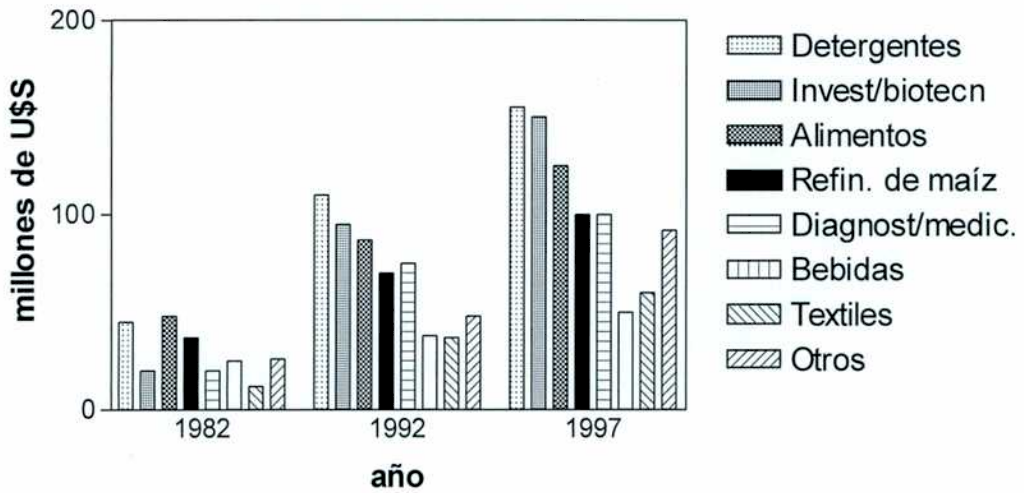



Figura 2 : Ventas mundiales de enzimas de uso industrial Fuente: International Food Ingredients (1998)

En la Figura 3, se muestra el porcentaje (en cuanto a volumen de ventas de enzimas) presentado por la empresa NOVO Nordisk. Se puede apreciar que esta empresa produce mayoritariamente enzimas de uso para la fabricación de detergentes, y en menor medida, para las industrias textil y del almidón.

Ya que la obtención de enzimas de fuentes vegetales o animales es costosa y presenta problemas de estacionalidad y variabilidad biológica, actualmente las enzimas se obtienen mayoritariamente a partir de microoganismos (principalmente hongos y bacterias). Su obtención en gran escala es más barata y su calidad más uniforme que en el caso de las enzimas de origen animal o vegetal. Se producen principalmente por fermentación sumergida aerobia convencional, que permite un buen control de las condiciones del proceso y un alto volumen de producción (Poutanen, 1997). La mayoría de las enzimas microbianas de uso industrial son extracelulares por lo cual es más fácil aislarlas y purificarlas (Wiseman, 1985).

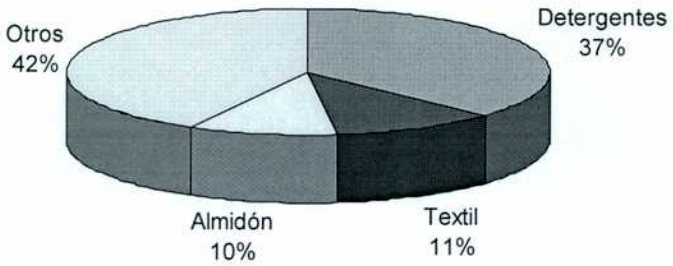



Figura 3: Ventas mundiales de enzimas de uso industrial.
Fuente: Reporte anual 1998 de Novo Nordisk en Internet.

En la industria, las enzimas provenientes de hongos filamentosos representan aproximadamente un 40% de las ventas totales y comprenden principalmente amilasas, celulasas, hemicelulasa y pectinasas (Archer y Peberdy, 1997).

Los microoganismos que se utilizan como productores de enzimas deben cumplir con ciertas restricciones para ser aceptados como fuentes de moléculas de uso humano y deben ser consideradas como GRAS (Generally Recognized As Safe). Entre los hongos que cuentan con este status se encuentra el hongo filamentoso *Aspergillus niger* (Taylor, 1979; Bigelis, 1987) organismo que ha sido utilizado en este trabajo como fuente de pectinasas.

## 2. PECTINA Y PECTINASAS

Las pectinasas son un complejo de enzimas que degradan en conjunto a la pectina. La pectina es un polisacárido de función estructural en vegetales. Tiene un alto peso molecular (entre 10000 y 400000 Da). Es el componente mayoritario de la lámina media (una fina capa que actúa como cementante entre las células vegetales) y se encuentra en las paredes celulares de células no suberificadas. Además constituye una parte importante de la pared celular (Sakai, 1993).

Químicamente, las pectinas son escencialmente polisacáridos ramificados que contienen entre unos pocos cientos y cerca de mil monosacáridos. El esqueleto principal es de ácido D-galacturónico α 1-4. Algunos de los grupos carboxilo de los ácidos galacturónicos se encuentran metoxilados. El grado de metoxilación depende de la fuente y el estado de madurez y varía entre 3 y 70%. Algunos de los grupos $OH^-$ de los $C_2$ o $C_3$ pueden estar acetilados (Alkorta y col., 1998). También se encuentran zonas ricas en L-ramnosa y las cadenas laterales son generalmente de xilosa, galactosa o arabinosa.
La pectina es degradada naturalmente en el proceso de maduración de los frutos por pectinasas producidas por la propia planta y también puede ser degradada por enzimas de parásitos (hongos y bacterias).

Las pectinasas se clasifican en tres grupos mayoritarios (Sakai y col, 1993; Alkorta y col, 1998):

⇒ Esterasas: Remueven los metoxilos del esqueleto de la pectina liberando metanol al medio. La pectina totalmente desesterificada se conoce como ácido poligalácturonico. La enzima que cataliza esta reacción se llama pectinesterasa (PE: E. C. 3.1.1.11) .

⇒ Hidrolasas: Cortan por hidrólisis las uniones α 1,4 entre dos residuos de ácido galacturónico siempre y cuando ninguno de ellos esté esterificado. Por lo tanto para una completa degradación de la pectina se necesita de la acción conjunta de estas enzimas (llamadas poligalacturonasas o PG: E. C. 3.2.1.15) y la PE. Dentro de las poligalacturonasas existe una subdivisión según degraden desde el extremo reductor ordenadamente (exo-poligalacturonasa) o hidrolicen al azar en cualquier zona de la cadena (endo-poligalacturonasas).

⇒ Liasas: Cortan por transeliminación (generando una doble ligadura) las uniones α 1-4 entre los ácidos galacturónicos independientemente de su esterificación. Las enzimas que actúan de este modo se llaman pectinliasas (PL: E. C. 4.2.2.10) y al igual que las PG se subdividen en exo-PL y endo-PL.

En la Figura 4, se describe de modo esquemático, la acción de los principales tipos de pectinasas.

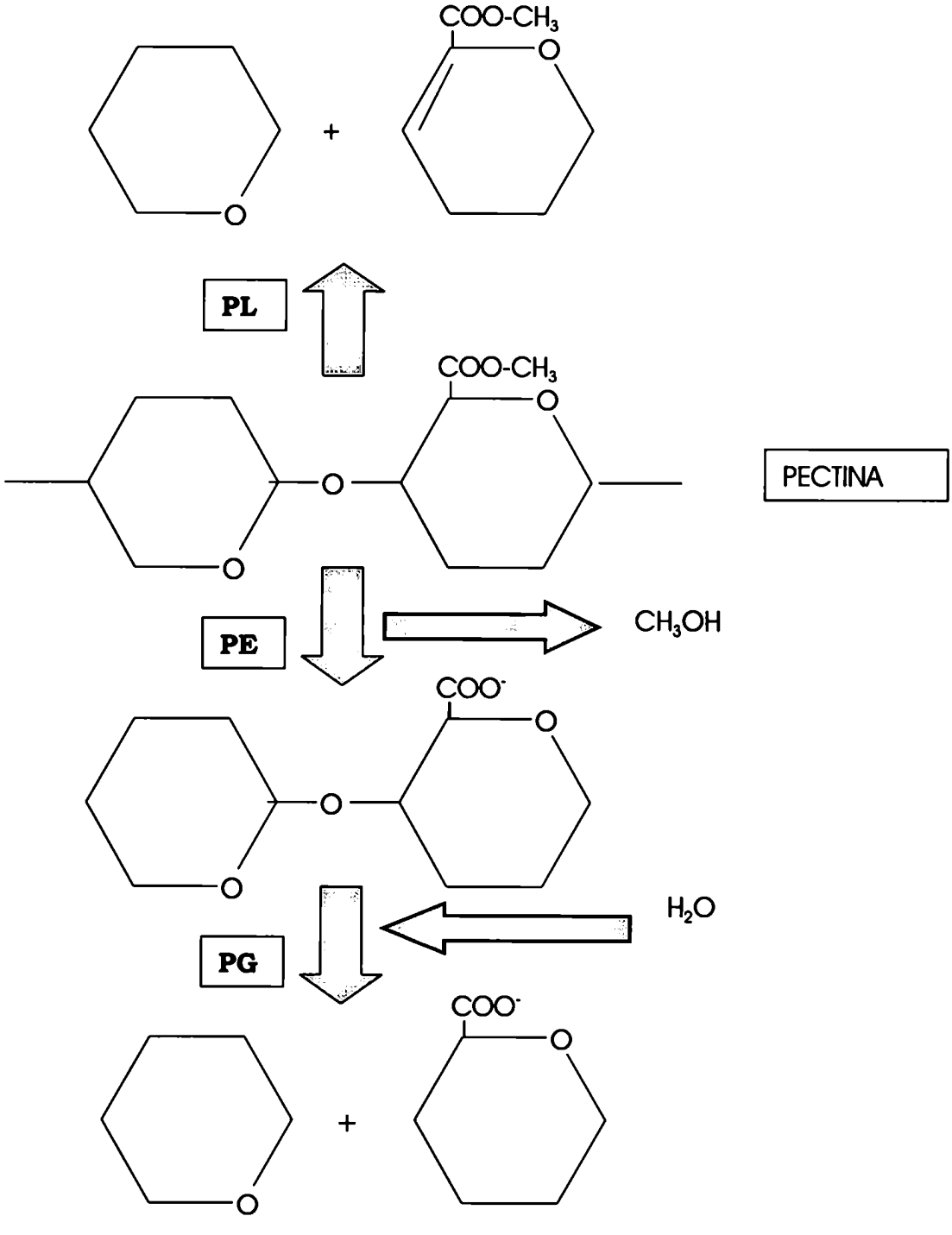



Figura 4: Acción de los tres principales tipos de pectinasas sobre una porción de molécula de pectina (Adaptado de Serra y col, 1992)

A nivel industrial las pectinasas son muy usadas sobre todo en la industria alimentaria (Sakai y col, 1993) y en algunos casos se usan en la industria textil para el desaprestado de telas (por ejemplo jeans) (Baracat Pereira y col, 1994). En la alimentación su uso más común es en la clarificación de jugos y vinos como así también en la reducción de su viscosidad (NOVO'S Handbook, 1988); también se utilizan para facilitar la extracción de jugos, aromas y sabores, de vinos, café, té (Taylor y Richardson,1979) y para facilitar el pelado de cítricos (Rouhana y Manheim, 1994). Otro uso importante es en la extracción de aceites de oliva, colza, coco, palta, maní y girasol (Domínguezy col, 1994).

Los usos más importantes de las pectinasas están ligados a la alimentación. Es por ello que la degradación de la pectina por el conjunto PE + PG ha sido señalada como no recomendable, ya que implica la liberación de metanol al medio. Dado que éste es muy volátil, probablemente la mayor parte se evapore al fin de diferentes procesos térmicos a los que es sometido el alimento. Otro incoveniente es que la pectina parcialmente desesterificada por la PE puede precipitar con el calcio endógeno de las frutas originando flóculos u opacidad no deseada (Navarro del Cañizo y col, 1994; Delgado y col, 1992).

Es por ello que varios autores sugieren enriquecer una preparación enzimática en PL en detrimento de la PE (Delgado y col, 1992; Brumano y col, 1993; Navarro del Cañizo y col, 1993; Spagna y Pifferi, 1993).

## 3. TECNOLOGIAS DE FERMENTACIÓN

La obtención industrial de metabolitos de interés producidos por hongos implica generalmente el crecimiento de especies seleccionadas de alta producción en un medio adecuado contenido en tanques, vasijas o bandejas, según éste sea sólido o líquido (Wainwright,1992).

Las pectinasas de venta industrial son generalmente producidas por hongos filamentosos, considerados organismos GRAS (Generally recognized as safe) por la FDA. La tecnología de producción de pectinasas más utilizada

industrialmente es la de fermentación en medio líquido ya que es mucho más sencilla de implementar y más fácil de controlar que la fermentación en sustrato sólido (Ward, 1989).

## *3.1. Fermentación sumergida o en estado líquido (FEL)*

A nivel industrial, la fermentación más utilizada es en medio líquido, debido al mayor desarrollo tecnológico de fermentadores para este tipo de proceso, a la facilidad de control de variables de proceso como pH, remoción del calor metabólico, aireación, etc. , y a los grandes volúmenes que pueden manejarse.

El hongo crece en un medio líquido apropiado en grandes tanques o vasijas con agitación para aumentar la aireación . La remoción del calor metabólico y el control de la temperatura óptima se logra mediante el encamisado del fermentador. Se controlan fácilmente el pH, disponibilidad de nutrientes y oxigenación, agregando los reactivos necesarios según los requerimientos (Ward, 1989).

Las fermentaciones en medio líquido pueden realizarse en cultivos discontinuos (batch) o en continuos según el hongo y la molécula a producir (Cliffe, 1989; Ward, 1989).

En los procesos en batch o discontinuos, todo el sustrato se coloca al comienzo de la fermentación y la formación eficiente de producto tiene lugar sólo durante una fracción del ciclo de la fermentación.

En los procesos continuos, se eliminan los efectos de represión por fuentes de carbono rápidamente utilizables ya que éstas se agregan en pequeñas cantidades; se reduce la viscosidad del medio y los efectos de constituyentes tóxicos y además se hace que la etapa de formación de producto sea lo más larga posible. Es por ello que este tipo de fermentación es el más utilizado en la industria y está particularmente adaptado a los procesos en los que el producto se produce mayoritariamente después de la fase de crecimiento exponencial (Ward, 1989).

## 3.2. Fermentación en sustrato o estado sólido (FES)

Ésta supone el crecimiento de los hongos sobre material orgánico sólido en ausencia de agua libre. En este proceso se usan como sustratos granos de cereales, legumbres o materiales lignocelulósicos.

En el caso de las pectinasas existen dos sustratos que por su alto contenido de pectina (inductor de la síntesis de pectinasas) son más utilizados: la manzana (Hang y Woodams, 1994; Friedrichy col, 1987) y los cítricos (Siessere y Said, 1989; Hart y col, 1991). También existen reportes en los que se utilizaron otros sustratos como salvado (Solís Pereira y col, 1993) o pulpa de café (Roussos y col., 1993).

Los microorganismos que crecen bien en este sistema son los que toleran bien actividades de agua ($a_w$) reducidas, por lo que se utilizan principalmente para crecimiento de hongos, disminuyendo así la posibilidad de contaminación por bacterias.

Se deben facilitar las condiciones que permitan la transferencia de oxígeno y la eliminación de calor metabólico y $CO_2$ eficientemente para garantizar el crecimiento y la productividad del hongo.

Los tipos de reactores diseñados para este tipo de fermentación (aunque no ampliamente utilizados) son los de tambor rotatorio, bandejas con flujo de aire forzado, reactores de lecho fluidizado o empaquetado y sistemas con agitación por paletas o tornillos (Ward, 1989; Sato y Sudo, 1999).

## 3.3. Comparación entre fermentación en estado líquido y fermentación en estado sólido

En la Tabla 1 se detallan las principales características de ambos tipos de fermentación (Mitchel y Lonsane, 1992). Las diferencias entre ambas tecnologías surgen fundamentalmente de:

⇒ La disponibilidad del agua (que al ser baja limita los procesos difusivos de gases y nutrientes con la consecuente generación de gradientes que hacen al medio inhomogéneo)

⇒ La relación del agua con el sustrato

⇒ El tipo de sustrato empleado

⇒ Cómo ocurre la remoción de calor metabólico.

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

Tabla 1: Principales diferencias entre la fermentación en sustrato sólido y en medio líquido.

Diversos autores han señalado las ventajas y desventajas de la FES con respecto a la fermentación en medio líquido (Aidoo y col, 1982; Mudgett 1986; Carrizales y Jaffe, 1986; Carrizales,1987; Hesseltine, 1987; Mitchell, 1992; Sato y Sudo, 1999). 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 básico de este tipo de procesos (como consecuencia de la dificultad de control y monitoreo de las variables del mismo) así como la falta de desarrollos tecnológicos 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 1992; Sato y Sudo, 1999):

⇒ Si bien pueden ser agregados nutrientes suplementarios, por lo general los sustratos sólidos son simples y suelen requerir solamente la adición de agua. Algunos pretratamientos aplicados al sustrato son la precocción con el agua de humectación, la ruptura de la superficie del sustrato o la molienda del mismo y se realizan con el solo objeto de incrementar la accesibilidad de este 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, siendo más compleja la formulación de los medios utilizados.

⇒ 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 y menor costo de operación.

⇒ Se pueden utilizar esporas como inóculo y por lo tanto no se requieren etapas previas que involucren grandes volúmenes y tanques para el desarrollo del inóculo.

⇒ La baja humedad y/o actividad de agua reduce el problema de contaminación especialmente con bacterias. Sumado a ello la posibilidad de utilizar inóculos mucho más concentrados que en la fermentación en medio líquido, desplaza las posibles contaminaciones. Es por esto que los procesos de FES pueden desarrollarse en condiciones de menor asepsia que los procesos en medio líquido.

⇒ Las condiciones para el crecimiento de hongos en FES son similares a las de su hábitat natural. Por ello los hongos filamentosos son especialmente aptos para utilizarse en esta tecnología de fermentación.

⇒ 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 necesaria la aplicación de aireación forzada a alta presión ni mecanismos de agitación violenta del 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.

⇒ Para la extracción se requiere poco solvente en comparación con la FEL y en algunos casos no es necesario adicionarlo sino que el extracto se obtiene directamente por por prensado del sustrato fermentado.

⇒ Los procesos de purificación de los productos se ven simplificados por la mayor concentración de éstos en el líquido de extracción.

⇒ Se genera menor volúmen de residuos, los cuales una vez secados pueden utilizarse para alimento de ganado o fertilizante.

Las desventajas que presenta la FES frente a la fermentación en medio líquido pueden ser resumidas en las siguientes consideraciones (Mitchell 1992); Sato y Sudo, 1999):

⇒ 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 debido a la baja conductividad térmica del sustrato sólido.

⇒ La naturaleza sólida del sustrato dificulta la medición y control de los parámetros de la fermentación en forma rápida. Esto hace que sea difícilmente automatizable y que la FES esté restringida a procesos batch.

⇒ 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.

⇒ Ya que la agitación del sustrato es muy difícil, las distribuciones de biomasa, nutrientes, humedad y gases son en forma de gradientes, con lo que el medio es heterogéneo a nivel físico-químico y fisiológico. Esta complejidad hace muy difíciles los procesos de control.

⇒ Muchos de los aspectos importantes, básicos y de naturaleza ingenieril, no están muy desarrollados o comprendidos en FES, lo que hace que sea un proceso empírico que depende en gran medida de la experiencia del operador:

* 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.

Una de las principales variables que afectan el crecimiento y productividad de metabolitos de los microorganismos es la actividad de agua ($a_w$) que representa la proporción del agua presente en el medio que está disponible para el crecimiento del mismo. Normalmente no se observa crecimiento de hongos xerofílicos por debajo de una $a_w$ de 0,85 y de 0,93 para hongos no xerotolerantes, aunque sí puede observarse germinación de esporas a $a_w$ menores que 0,62, las cuales no prosperan . En condiciones de baja $a_w$ el crecimiento es extremadamente lento (Corry, 1987). También se observa disminución del crecimiento como consecuencia de una disminución pequeña de la $a_w$ (Ramakrishna y col, 1993; Beever y Laracy, 1986; Sarrette y col, 1992; Bassit y col, 1993; Mildenhall y col, 1981). Al ser la disminución de $a_w$ una situación de "stress" para el organismo, éste reacciona para enfrentarse a ella. Los mecanismos más frecuentes son la acumulación de metabolitos que aumentan la presión osmótica intracelular evitando que el organismo se deshidrate (por ejemplo glicerol, sorbitol, manitol, arabitol, trehalosa, sacarosa, glucosa, aminoácidos, $Na^+$, $K^+$, $Mg^{+2}$, $Ca^{+2}$, $Cl^-$, etc.) (Luard, 1982a, 1982b; Gadd,1984; Corry, 1987). Existen también varias referencias de que la disminución de $a_w$ afecta la estructura y el transporte a través de la membrana plasmática (Bassit y col, 1993; Acuña Arguelles y col, 1994; Lesage y col, 1993).

Existen diversas maneras de disminuir la $a_w$ de un medio líquido: agregándole sales, azúcares o alcoholes (Corry, 1987). Sin embargo, la producción, actividad y tolerancia de microorganismos y enzimas a esta situación de "stress" depende del depresor utilizado, sobre todo si éste es permeable a la membrana del microorganismo (Grajek y Gervais, 1987).

En un medio sólido se puede reducir la $a_w$ controlando la humedad del sustrato (por efecto del fenómeno de sorción de agua) o por agregado de

solutos depresores de la $a_w$ como en el caso del medio líquido (Grajek y Gervais, 1987; Doelle y col., 1992).

## *3.4. Historia, aplicaciones actuales y perspectivas de la fermentación en estado sólido*

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 miles 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 común (aec) y hasta 3000 años aec 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 y Gwyneth, 1988). La Tabla 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, 1987).

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 iniciador de procesos fermentativos (Lonsane y col, 1992 a y b).

El Koji es preparado tradicionalmente en bandejas. En éstas se distribuye el sustrato cuidando que la profundidad no sea superior a 7 cm (esto permite una buena disipación del calor metabólico y aireación del cultivo). Las bandejas se disponen en hileras con cierta separación entre si, lo cual facilita la circulación de aire. La temperatura se mantiene entre 25 y 30 °C y la humedad entre 80 y 90%, lo cual es fácil de lograr en una región de clima tropical (Carrizales, 1987).

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, etc.) y a su vez el proceso fue enriquecido con distintos aportes tecnológicos (nuevos diseños de fermentadores etc.) 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.

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

Tabla 2: Alimentos tradicionales producidos por FES (condensado de Paredes-López, 1988)

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 y col (1992 b) como un error histórico. El autor fundamenta esta conclusión en la ventaja comparativa en el 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 (ácido giberélico, enzimas , aromas, etanol, tetraciclina, penicilina, etc.), aplicando esta tecnología aún en el caso de fermentaciones mediadas por levaduras y bacterias.

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 y col, 1992), facilita la generación de gradientes y dificulta la medición y el control de variables durante el desarrollo de la FES.

Mitchell (1992 y col) 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 y col (1993), quienes consideran 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 etc.) y el desarrollo de la misma (Doelle y col, 1992; Pérez Correa y col, 1997; Raimbault y col, 1980 y 1997).

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, 1992)

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 ycol (1985). Estos autores encontraron 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 $m^3$ 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 liquido 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.

Shah y col (1991) encontraron que la producción de α-amilasa de *Aspergillus oryzae* en FES empleando salvado de trigo como sustrato es más eficiente y económico que la producción 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, 1992). Las aplicaciones socioeconómicas de la FES ofrecen la posibilidad de un aumento significativo de 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 socioeconómicas de la FES son la producción de tempeh (mediante hongos del género *Rhizopus* se fermenta soja precocida lo cual lleva a un enriquecimiento de esta en niacina, riboflavina, ácido pantoténico y vitamina B6), compost (tratamiento de residuos que permite la degradación microbiana de desechos tóxicos para luego ser empleados como abono o relleno de suelos o bien la producción de metano).

Las aplicaciones de carácter comercial de la FES incluyen la producción de enzimas y alimentos fermentados en gran escala y el ensilaje, proceso por el cual, los productos agrícolas son fermentados por micoflora productora de ácido láctico. La disminución del pH del sustrato fermentado ayuda a su preservación. 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 socioeconómico. 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 (1992) :

⇒ 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 sino 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 biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos del suelo como pesticidas y herbicidas por medio de microorganismos requiere grandes cantidades de inóculo. El mismo puede conseguirse por FES.

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 necesaria 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, etc) como biológicos (interrelación del microorganismo con el sustrato, agua, crecimiento, pH, inducción, represión, etc.) y el aspecto técnico (como modelado matemático, agitación, extracción de productos, cinética de crecimiento y de aparición de productos, etc.), 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 y Ghyldal, 1992).

## *3.5. Variables de proceso en FEL*

En esta tecnología de fermentación, deben considerarse las siguientes como variables críticas a monitorear (Ward, 1989):

⇒ Temperatura

⇒ Concentración de nutrientes

⇒ pH

⇒ Aireación (composición de $CO_2$ y $O_2$ en las fases líquida y gaseosa)

La mayoría de estos parámetros son determinados "on line" mediante sensores ubicados en el reactor. En caso de que estos parámetros se aparten de valores prefijados, se dispara la respuesta del sistema (agregado de nutrientes, de soluciones de ácido o álcali, cambio en la velocidad de agitación, etc.) tendiente a llevar el sistema al valor deseado.

La temperatura es sensada en continuo usando una termocupla ubicada en el interior del fermentador y se ajusta fácilmente a la óptima cambiando el flujo y/o temperatura del agua del encamisado.

La presión que soporta el fermentador está relacionada con su contenido en peso y volumen (líquido entrante y saliente en sistemas continuos y producción de biomasa). Para cada sistema fermentador-microorganismo existe un rango de presiones óptimo para la obtención del metabolito de interés.

La producción de muchas moléculas de interés económico es regulada por el fenómeno de represión catabólica mediada por la presencia de hidratos de carbono de fácil incorporación. Por ello, estas fuentes de carbono se deben agregar en el transcurso de la fermentación sin superar determinados niveles.

El pH de las fermentaciones puede variar enormemente en el transcurso de ésta, sobre todo si el hongo está produciendo un ácido (por ejemplo ácido cítrico). Habitualmente este parámetro se controla "on line" y se ajusta en el tiempo mediante el agregado de soluciones de ácido o álcali a los valores óptimos para aumentar la producción del metabolito de interés.

La mayor información acerca del estado de la fermentación se obtiene con el análisis de $CO_2$ y $O_2$ tanto de los gases de salida como de los gases disueltos en el medio de fermentación. El coeficiente respiratorio ($CO_2$ producido/$O_2$ consumido) debe ser cercano a 1 para garantizar la viabilidad del crecimiento de hongos ya que estos son aeróbicos. En el caso de que el coeficiente respiratorio sea mayor que 1, se debe aumentar la aireación del sistema ya sea aumentando el flujo de entrada de gases y/o la agitación.

Existen parámetros como la concentración de nutrientes, metabolitos, enzimas, biomasa, etc.que se miden "off line" (se toma una muestra en forma aséptica que se analiza en el laboratorio) con el consecuente riesgo de contaminación y retardo en corregir los parámetros de ser necesario. Por ello la tendencia actual es automatizar cada vez más los sistemas por lo que continuamente se desarrollan metodologías que permitan la medición cuantitativa de moléculas biológicas "on line".

En la Figura 5, se muestra un bioreactor típico para fermentación en medio líquido.

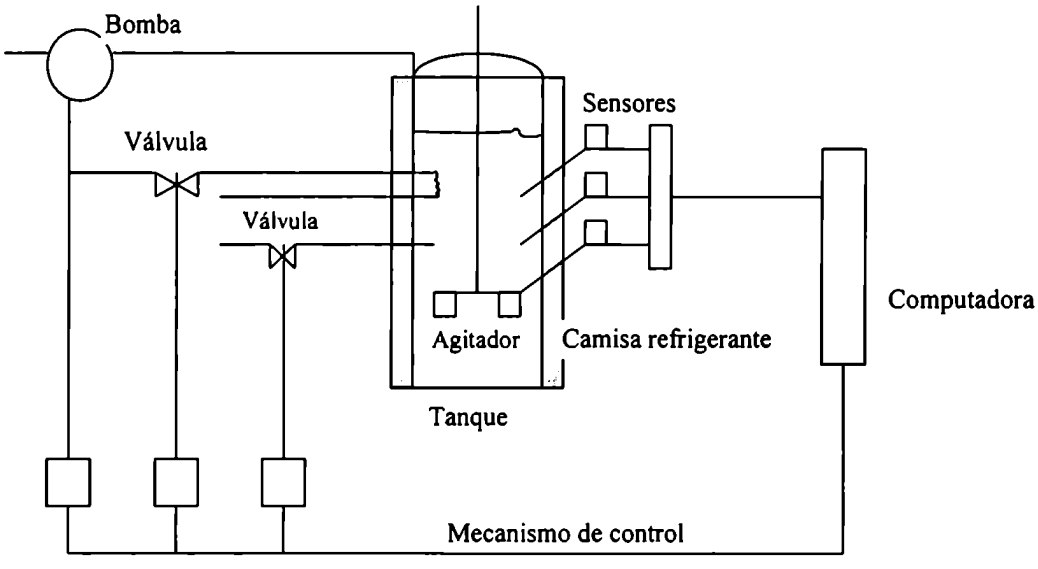



Figura 5: Reactor para fermentación en medio líquido (Adaptado de Ward, 1989)

## *3.6. Variables de proceso en FES*

En un proceso de FES se pueden considerar como variables críticas, en cuanto a su control y monitoreo a:

⇒ La humedad

⇒ La $a_w$

⇒ El intercambio de calor

⇒ El pH

⇒ La aireación.

(Pandey,1992; Prior y col,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 y Gervais, 1987). Sin embargo el efecto del contenido agua es indicado en forma mas acertada por la actividad de agua ($a_w$), que da idea del agua disponible para el microorganismo en el sistema (Battaglino y col, 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 mandioca (Raimbault y Alazard, 1980) y salvado de trigo (Nishio y col, 1979) alcanzó un valor óptimo con niveles de humedad considerablemente menores que los observados en sustratos como pulpa de café (Peñaloza y col, 1985) o bagazo de caña de azúcar (Roussos y col, 1989), probablemente debido a la mayor capacidad de retención de agua de éstos últimos sustratos.

La $a_w$ óptima 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 .

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 y col, 1988), por lo tanto el mantenimiento de la $a_w$ 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 gradientes 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 y Alazard,1980) pero en general se prefiere que el microorganismo a utilizar se caracterize por un rango de pH óptimo amplio (Mitchell y col, 1988).

La importancia de la aireación en FES radica principalmente en mantener las condiciones aeróbicas, desorber anhidrido carbónico y regular la temperatura del sustrato y los niveles de humedad.

El reactor más simple para FES es la bandeja sin aireación forzada. Este sistema está basado en el método tradicional de fermentación Koji (Aidoo, 1981). Las características básicas de este sistema según Mitchell (1992) son:

⇒ Una capa relativamente fina de sustrato es esparcida en un área horizontal considerable.

⇒ La aireación 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 el 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 y Ramesh, 1992).

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 arriba. 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, 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 la $a_w$ 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 rendimiento de la producción de un metabolito.

# 4. ESTABILIZACIÓN DE ENZIMAS

## *4.1 Inactivación térmica de enzimas*

Las enzimas de uso industrial son almacenadas luego de producidas, ya sea por el fabricante hasta su comercialización o por el usuario hasta su utilización.

Durante el período de almacenamiento, y dependiendo de las condiciones en que éste se realice, el producto puede deteriorarse y las enzimas van perdiendo su actividad.

Para que esto ocurra lo más lentamente posible y el producto sea apto durante un período de tiempo prolongado, se pueden realizar distintos procesos luego de la fermentación con el objeto de aumentar su estabilidad al almacenamiento.

En general, la mayoría de las enzimas son inestables en solución frente a aumentos de temperatura, agregado de desnaturalizantes químicos o cambios de pH y/o fuerza iónica, ya que el agua permite la formación de estructuras proteicas incorrectas y, al aumentar la flexibilidad, hace a la proteína más sensible a la desnaturalización (Saraiva y col., 1996). Por esta razón, la deshidratación es una práctica común en la industria, ya sea por secado spray de baja intensidad, secado al vacío, aplicación de sistemas multi-etapas o liofilización (Strumillo, 1992). Además, la deshidratación de la enzima facilita la comercialización (reduciendo drásticamente el volumen y haciendo menos críticas las condiciones de almacenamiento de la enzima) y asegura una vida media prolongada del producto (Papamichael y Hustadet, 1989; Parkin, 1993).

La elección del método de secado depende del volumen de producción, las propiedades de las enzimas y el costo. La liofilización se utiliza para productos de alto valor agregado, que se producen en poca cantidad (por ejemplo productos farmacéuticos). El secado spray o por atomización, se utiliza para la deshidratación de enzimas que se producen en gran cantidad (Yamamoto y Sano, 1992).

Sin embargo, algunas enzimas pueden inactivarse total o parcialmente durante el secado, por lo que el diseño del proceso de secado debe ser optimizado para garantizar la recuperación de un alto nivel de actividad.

En general, la actividad recuperada luego del secado depende de:

⇒ La composición inicial del líquido a ser deshidratado,

⇒ Los parámetros del proceso,

⇒ Las características físico-químicas de la enzima (Dumoulin y Bimbenet, 1998).

Por ello, no pueden establecerse reglas generales, y el secado de cada sistema enzimático debe tratarse individualmente ( Sadykov y col., 1997).

En general, se asume que la inactivación enzimática sigue una cinética de primer orden (Luyben y col., 1992; Meerdnik y van't Riet,1995; Yamamoto y Sano, 1992; Banga y Singh, 1994; Mohr y Loehn, 1992; Terebiznik, 1997; Terebiznik y col., 1997) cuya dependencia con la temperatura puede ser descripta mediante la ecuación de Arrhenius (Ecuación 1) (Dumoulin y Bimbenet, 1998; Sadykov y col., 1997; Meerdnik y van't Riet,1995)

$$K_{(T)} = z.\exp(-E_a / RT) \qquad (1)$$

Donde: z: factor preexponencial

R: constante de los gases

T: Temperatura (K)

$E_a$: Energía de activación.

Sin embargo, la asunción de que la dependencia de la constante de inactivación es descripta por la ecuación de Arrhenius en sistemas de baja humedad, debe ser comprobada, ya que pueden existir quiebres en los gráficos de Arrhenius, como consecuencia de la transición vítrea del sistema en que está incluida la enzima (Terebiznik y col., 1997).

Las reacciones enzimáticas presentan siempre una temperatura óptima de reacción. Esto se debe a que tanto la velocidad de reacción de la enzima como la velocidad de inactivación térmica de la misma se ven incrementadas con la temperatura. Este tipo de dependencia con la temperatura diferencia a las reacciones enzimáticas de la mayoría de las reacciones no enzimáticas, cuyas velocidades aumentan en forma continua con la temperatura debido a la mayor probabilidad de choque de los reactantes como consecuencia del incremento de la temperatura de reacción. La Ea correspondiente a la inactivación enzimática en sistemas deshidratados varía entre valores de 40 a 130 Kcal / mol siendo este rango coincidente con las Ea de la desnaturalización de las proteínas (Cheetham, 1985 y Parkin, 1993 ). Para las enzimas en sistemas líquidos, estas Ea tienen valores entre 10 y 40 Kcal/mol (Gupta, 1991).

La desnaturalización es un cambio de la estructura nativa de la proteína que no altera su secuencia de aminoácidos. La misma, puede causar la inactivación reversible de la enzima. La exposición de una enzima a altas temperaturas durante tiempos prolongados favorece distintas reacciones químicas, como deamidación de asparagina o eliminación de residuos de cisteína, o bien reacciones de agregación entre las moléculas y/o adopción de una configuración molecular no activa por parte de las proteínas desnaturalizadas. Este tipo de reacciones, producirá la pérdida irreversible de la actividad catalítica de la enzima.

La inactivación enzimática es descripta típicamente en bibliografía de dos maneras:

1. Como una reacción de un paso en el que la forma nativa de la enzima (N) origina la forma inactiva (I) :

$$N \xrightarrow[K(T)]{} I \qquad (2)$$

2. Como una reacción de dos pasos (Tombs, 1985; Ahern y Klibanov, 1988), el primero reversible de la forma nativa (N) a la desnaturalizada (D) por ruptura de interacciones débiles, y el segundo irreversible hacia la forma inactiva de la enzima (I), por distintos mecanismos como agregación, formación de estructuras mezcladas, ruptura de puentes disulfuro inestables, hidrólisis de enlaces peptídicos, deamidaciones, etc. (Gupta, 1991). En este caso, la Ea y la constante de inactivación (k) observadas estarán relacionadas a las Ea y k de las diferentes etapas del proceso y reflejarían la reacción más lenta.

$$N \longleftrightarrow D \longrightarrow I \qquad (3)$$

En el caso en que el pasaje al estado D sea homogéneo en toda la población proteica, todas las constantes involucradas pueden unificarse en una única constante K dependiente de la temperatura.

Si la actividad enzimática (A) es directamente proporcional a la forma enzimática nativa, es de esperar que la inactivación muestre un comportamiento de primer orden:

$$A_{(t)} = A_0 \exp(-K_{(T)} t) \qquad (4)$$

Donde ($K_T$) es la constante de velocidad de inactivación dependiente de la temperatura.

Este modelo de inactivación supone que no existen estados intermedios entre la condición de enzima activa e inactiva o bien si existen, no llegan a representar una población lo suficientemente significativa como para alterar el ajuste al modelo (Capeland, 1994). En este sentido, Lozano y col (1994) sostienen que la estructura multifacética de la molécula de proteína durante el proceso de inactivación permite aseverar que ocurren complejos eventos internos durante las transiciones conformacionales de la proteína. Debido a ello el análisis de la inactivación enzimática como una reacción de un solo paso y primer orden, requiere que la inactivación enzimática sea homogénea y por ende, ocurra independientemente de las condiciones microambientales de la proteína.

A pesar de lo expuesto arriba, la inactivación de una proteína puede mostrar comportamientos complejos del tipo bifásicos o períodos lag los cuales, además, pueden resultar reversibles o irreversibles. En general este tipo de comportamiento está asociado a proteínas multiméricas donde cada monómero tiene un patrón de inactivación propio y a su vez las diferentes subunidades pueden interaccionar entre sí dando reacciones de agregación o bien facilitando la reacción entre distintos residuos aminoacídicos (Lencki, 1994).

## *4.2 Estrategias de estabilización*

En procesos biotecnológicos la termosensibilidad juega un papel fundamental, obteniéndose provecho tanto de la termolabilidad como de la estabilidad a altas temperaturas (Janecek, 1993 y Lencki 1994 ).

El aumento de la termoestabilidad de una enzima es de significativa importancia desde un punto de vista tecnológico ya que permite obtener una gran variedad de ventajas operacionales en los procesos en que ésta es utilizada:

La posibilidad de incrementar la temperatura de reacción de una enzima permite (Mohazev, 1988):

- ⇒ Mayores velocidades de conversión.
- ⇒ Reducción del desarrollo de contaminaciones microbianas.
- ⇒ Mayor solubilidad del sustrato (en general los polisacáridos son poco solubles en agua).
- ⇒ Reducción de la viscosidad del medio de reacción favoreciendo los fenómenos de transporte de materia.

Como consecuencia del aumento de la estabilidad térmica de una enzima, frecuentemente se logra una mayor estabilidad a condiciones desnaturalizantes como proteólisis, deshidratación o medios orgánicos (Gupta, 1991). El incremento de la estabilidad de la enzima permite a su vez un mayor rendimiento en los procesos industriales de bioseparación; al disminuir la inactivación por ser las enzimas más resistentes a las condiciones de extracción empleadas, se incrementa el rendimiento final y la eficiencia de separación del proceso (Lencki, 1994).

Las estrategias para obtener enzimas termoestables pueden ser resumidas en los siguientes puntos (Gupta, 1991; Manning y col., 1989):

⇒ Búsqueda de fuentes biológicas cuyo hábitat coincida en condiciones ambientales con las del proceso en que la enzima será utilizada.

⇒ Ingeniería genética para lograr proteínas más estables a partir de las ya existentes: sustitución de aminoácidos para mejorar las interacciones internas, aumento de la estabilidad de las α hélices; introducción de puentes disulfuro para estabilizar la conformación nativa; reemplazo de sitios potenciales de degradación, etc.

⇒ Estabilización de las enzimas preexistentes. Este último punto se basa en disminuir la Ea de la inactivación enzimática básicamente de tres formas :

1. Modificaciones químicas de la enzima (por ejemplo bloqueando grupos inestables con polioles, agregado de lípidos o guanidización para modificar los residuos básicos)

2. Estabilización de la enzima por medio de uniones a soportes inertes o por cross-linking

3. Modificación del medio en que se encuentra la enzima:

⇒ Agregado de ligandos, sustrato, sales, azúcares, polioles etc.

⇒ Deshidratación del medio en que se encuentra la enzima (ya sea por agregado de solventes orgánicos anhidros o por eliminación del agua por algún método de secado).

⇒ Atrapamiento en matrices poliméricas.

Desde un punto de vista económico la estabilidad enzimática afecta tanto a la reacción que ésta cataliza como a su vida media y condiciones de almacenamiento. Las enzimas de uso industrial son comercializadas en su gran mayoría como proteínas nativas, en medio líquido o deshidratadas (enzimas para detergentes, para alimentos o para uso en diagnóstico).

En el caso de productos líquidos, la estrategia de estabilización radica principalmente en el agregado de aditivos solubles, que como en el caso de polioles, aumentan la estabilidad de un variado numero de enzimas. Muchos de estos aditivos son utilizados en forma empírica mientras que en otros casos se han dado distintas explicaciones a su funcionamiento como por ejemplo cambios en la estructura y disposición del agua alrededor de la proteína, aumento de energía libre de desnaturalización o interacciones de tipo específicas o no específicas con la enzima (Graber, 1989, Lozano y col, 1994; de Cordt y col., 1994).

En el caso de extractos enzimáticos deshidratados, se reduce drásticamente la movilidad de la proteína, lo que permite preservar su actividad durante el almacenamiento. Esto se fundamenta en que los cambios conformacionales que dan lugar a la desnaturalización de una enzima, así como las reacciones intra e intermoleculares que conducen a su inactivación, se ven disminuidos al reducirse la movilidad molecular. El agua aumenta la movilidad molecular de las proteinas debido a su efecto plastizante y por lo tanto la termosensibilidad de las enzimas está relacionada con el contenido de agua del sistema.

La deshidratación de materiales biológicos en presencia de aditivos (azúcares, polisacáridos y sistemas mixtos formados por carbohidratos y proteínas), de tal forma que estos una vez deshidratados formen una matriz sólida que los incluya, permite aumentar considerablemente su estabilidad; lo cual tiene distintas implicancias prácticas en una gran variedad de áreas tecnológicas. Esta metodología permite estabilizar en forma eficiente a enzimas sumamente lábiles como las enzimas de restricción así como enzimas de características más robustas como invertasas o lactasa, mantener la viabilidad de microorganismos y estabilizar biomembranas (Crowe y col, 1987; Colaço y col, 1992; Leslie y col, 1994; Bell y Hageman, 1996; Bell y col, 1997; Schebor y col, 1996; Mazzobre y col, 1997; Rossi y col, 1997; Terebiznik y col, 1997). Además, mejora considerablemente el comportamiento del material biológico deshidratado en cuanto a la actividad recuperada luego del proceso de secado, la estabilidad térmica y su vida media durante el almacenamiento.

Los mecanismos que harían efectivo a un aditivo como estabilizador de enzimas deshidratadas son fundamentalmente descriptos por las siguientes hipótesis:

⇒ Hipótesis de reemplazo del agua: Los azúcares y polioles estabilizan a las proteínas gracias a la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con ellas del mismo modo que el agua, lo que mantiene la conformación de la proteína nativa evitando reacciones intermoleculares (como la agregación) e intramoleculares entre grupos reactivos de la enzima que se producirían por cercanía y llevarían a su inactivación (Crowe, 1987; Carpenter y col., 1993).

⇒ Hipótesis de vitrificación: Las proteínas serían inmovilizadas mecánicamente en una matriz vítrea y sólida durante la deshidratación. La restricción de movilidad prevendría la desnaturalización y la separación espacial entre las moléculas de proteína, prevendría la agregación (Crowe, 1987; Hanckock y Zografi, 1997). Esta hipótesis se encuadra dentro de la teoría de la transición vítrea descripta por Slade y Levine (1988; 1991), la cual aplica conceptos de la ciencia de polímeros a la interpretación de la estabilidad de alimentos y materiales biológicos deshidratados.

### 4.2.1 Teoría de la transición vítrea

La estructura física de un sistema sólido es función de la propiedades de sus principales componentes (lípidos, carbohidratos, proteínas, agua, etc.) así como de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) en las que se encuentra. Estas últimas pueden inducir transiciones de fase de primer o segundo orden de los componentes. Ejemplo de este tipo de transiciones son (Ross y Karel, 1992): evaporación, congelamiento del agua y fusión del hielo; fusión y solidificación de grasas y aceites; gelatinización del almidón; desnaturalización de proteínas; cristalización y fusión de azúcares (transiciones de primer orden) y; transición vítrea de carbohidratos y proteínas amorfos (transiciones de segundo orden).

En alimentos deshidratados, la transición vítrea de proteínas e hidratos de carbono, es un cambio de estado particularmente importante debido a su efecto en las propiedades físicas y estabilidad del producto.

Según esta teoría, la estabilidad del material biológico deshidratado, puede ser explicada en función de la existencia de estados térmodinamicamente inestables caracterizados por una alta estabilidad estructural y química debido a la alta viscosidad de estos sistemas (Slade y Levine, 1991).

La Figura 6 muestra la formación de un sólido amorfo y un sólido cristalino a partir de una solución del sólido en cuestión.

En la solución inicial, el solvente (agua) y las moléculas de soluto (por ejemplo un azúcar) se encuentran en forma azarosa. El azúcar sólido se obtiene mediante la remoción del agua. Dependiendo de la velocidad de remoción el sólido será amorfo o cristalino. El sólido cristalino se obtiene si la remoción del agua es lenta, dado que se permite que las moléculas de azúcar se ordenen formando un estructura cristalina en la cual prevalece la interacción con otras moléculas de azúcar. El cristal resultante se encuentra en un estado termodinámicamente estable caracterizado por una movilidad relativamente escasa y con poco espacio intermolecular.

Se obtiene un sólido amorfo cuando las moléculas de azúcar en solución son inmovilizadas por un congelamiento o una deshidratación rápida como por ejemplo sucede durante la liofilización o la atomización. Como consecuencia de estos procedimientos el sistema experimenta un rápido aumento de la viscosidad y por ende una importante disminución de la movilidad molecular. Por esta razón las moléculas de azúcar no pueden ordenarse en un estado cristalino y permanecen en un estado desordenado denominado estado amorfo. Un sólido amorfo dependiendo de la temperatura y su contenido de agua, puede encontrarse en estado vítreo o estado gomoso. La transición entre dichos estados se denomina transición vítrea y ocurre a una temperatura característica denominada temperatura de transición vítrea (Tg). Por debajo de Tg, el sólido se encuentra como un vidrio altamente viscoso.

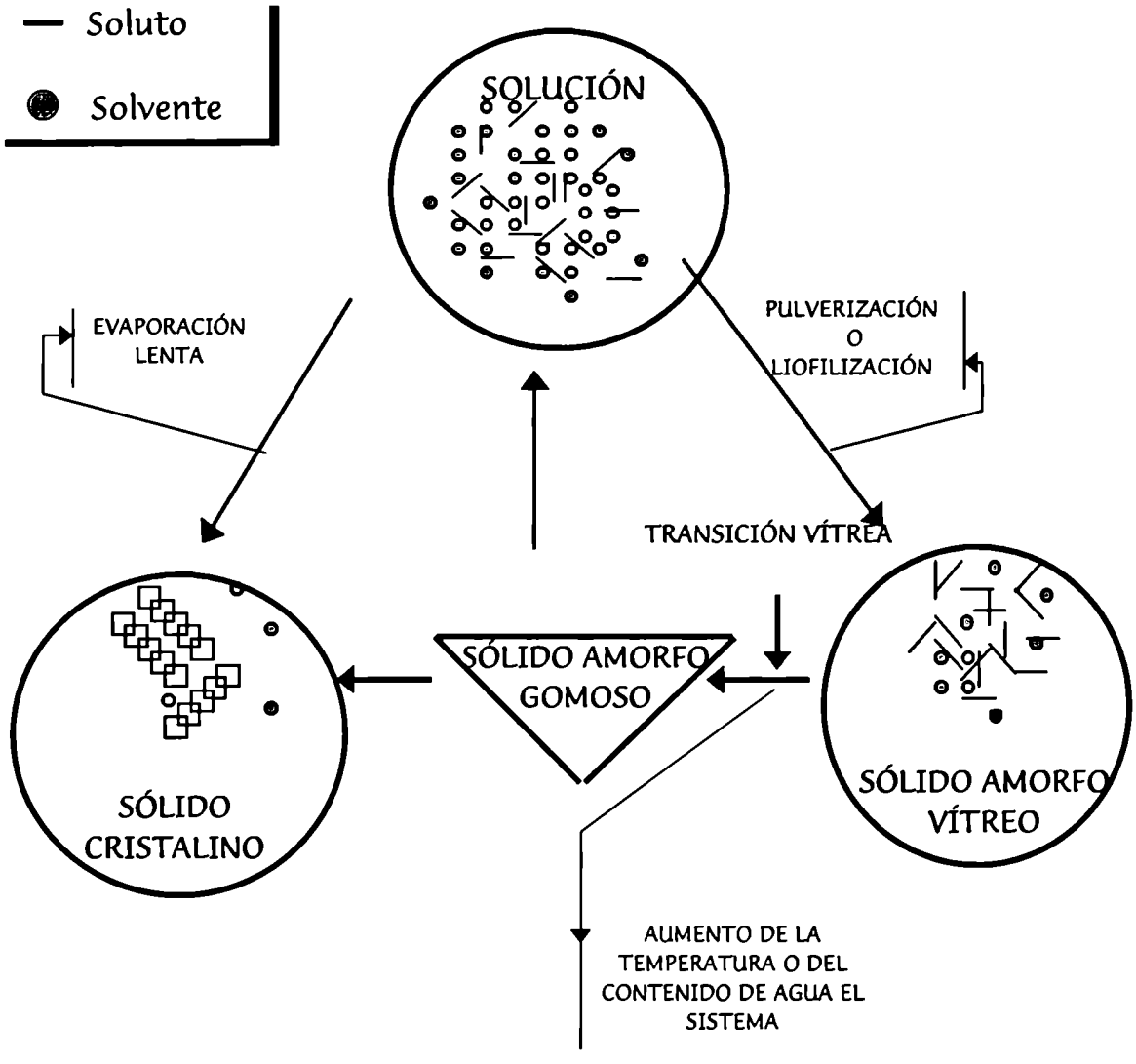



Figura 6: Formación de un sólido cristalino o amorfo a partir de una solución (adaptado de Karmas , 1994)

Diversas propiedades del sistema como viscosidad, entalpía, constante dieléctrica, calor especifico etc., cambian con la transición vítrea por lo cual pueden ser utilizados para identificar el valor de Tg de un sistema. El cambio en el calor especifico del sólido amorfo puede ser detectado al calentar en forma continua al sólido vítreo mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC).

El valor de Tg es mayor cuanto mayor es el peso molecular del sólido. La relación entre Tg y peso molecular fue propuesta originalmente para series homólogas de polímeros y es descripta por la ecuación de Fox y Flory (Fox, 1950).

$$Tg = Tg(\infty) - KgM^{-1} \qquad (5)$$

Donde: M= peso molecular

Kg= constante

Tg(∝)= valor límite de Tg para polímeros de alto peso molecular.

La Tg de un sistema deshidratado es función de sus componentes. La ecuación de Gordon-Taylor relaciona la Tg de mezclas de polímeros con la concentración relativa de los componentes individuales de la mezcla y sus respectivas Tg. Esta ecuación, ha sido aplicada para modelar sistemas formados por mezclas anhidras de dos componentes distintos así como mezclas de un sólido con diferentes contenidos de humedad (Roos y Karel, 1991 a; Buera y col, 1992).

$$Tg_{mezcla} = \frac{W_1 Tg_1 + W_2 Tg_2}{W_1 + KW_2} \qquad (6)$$

Donde: $Tg_{mezcla}$ = Tg observado para una mezcla binaria

$Tg_1$ y $Tg_2$ = Tg de los componentes en su estado puro

$W_1$ y $W_2$ = pesos moleculares de los componentes en su estado puro.

$K$=constante

El agregado de carbohidratos inertes de alto peso molecular a un sistema deshidratado puede ser utilizado para alterar su Tg y por ende retardar cambios físicos y reacciones químicas deteriorativas. La cantidad de polímero necesaria para lograr un aumento de la Tg apropiado, puede ser calculado mediante la ecuación de Gordon-Taylor. En general, es necesario una mínima cantidad de polímero para aumentar significativamente la Tg de un sistema sólido formado por un azúcar de bajo peso molecular (más del 20%),

mientras que una pequeña cantidad de azúcar puede disminuir sensiblemente la Tg de una matriz polimérica (Terebiznik, 1997).

Debido a que la movilidad en un sistema vítreo está restringida, éste es considerado estable en lo concerniente a cambios físicos y químicos (Roos, 1998). Por lo tanto, aunque un sólido vítreo no es termodinámicamente estable, puede ser considerado cinéticamente estable o en un estado metaestable. Por sobre la Tg, el sistema adquiere mayor movilidad y como resultado de ello es susceptible a que ocurran cambios físicos o químicos. En este sentido la Tg puede ser considerada como un punto critico en lo que respecta a la estabilidad de los sistemas sólidos (Levine y Slade, 1992).

La Tg de un sistema puede ser sobrepasada al aumentar la temperatura en que se almacena el sólido en cuestión (T). Cuando T>Tg, el sistema vítreo amorfo adquirirá un aspecto gomoso y movilidad. Alternativamente, la movilidad de un sistema sólido puede ser incrementada mediante el agregado de un plastizante. Para que un compuesto actúe como plastizante debe ser compatible y miscible con el material al cual se lo desea incorporar. En sistemas biológicos el plastizante más común es el agua y su efecto es reducir la Tg del sistema (Roos y Karel, 1991 b).

El parámetro que tiene en cuenta tanto el efecto del contenido de agua como el efecto de la temperatura (T) sobre un sólido amorfo es (T-Tg). Si (T-Tg) >0, el sistema amorfo estará en estado gomoso donde ocurrirán cambios físicos y químicos en forma dependiente del tiempo. Si (T-Tg) <0, el sistema se encontrará en estado vítreo y podrá ser considerado estable con respecto a aquellos cambios físicos y reacciones para los cuales los fenómenos de difusión y la movilidad son limitantes (Roos y col, 1996; Roos, 1998).

El almacenamiento de sólidos a (T-Tg)>0 permite observar distintos tipos de fenómenos que en el caso de productos alimenticios perjudican su calidad; ejemplos de ello son el colapso, pegajosidad, apelmazamiento, cristalización de azúcares, liberación de volátiles encapsulados.

En el caso de enzimas deshidratadas en matrices de carbohidratos, el valor de (T-Tg) no es el único parámetro que garantiza la estabilidad, ya que se ha descripto que a iguales valores de (T-Tg), distintos compuestos, protegen de un modo diferente a las enzimas de la inactivación térmica (Schebor y col,

1996; Mazzobre y col, 1997; Terebiznik y col, 1997). Una posible explicación de este fenómeno se basa en la teoría de los volúmenes libres (Frisch y Stern, 1983; Le Meste y col, 1991) en la que se postula que el poder protector de una matriz no depende sólo de su Tg sino también de su volumen libre (que a su vez depende de sus características físico-químicas). Cuanto mayor sea el volúmen libre de una matriz, mayor será el espacio para el movimiento molecular dentro de ésta y, por lo tanto, su poder protector será menor.

### 4.2.2 **Mecanismos responsables de la estabilización de enzimas en matrices de baja humedad.**

La propiedad de formar una matriz vítrea fue sugerida por varios autores como la razón por la cual algunos carbohidratos poseen la capacidad de proteger materiales biológicos lábiles en condiciones de bajo contenido de humedad. Levine y Slade (1992), consideran que el estado vítreo es el único factor de importancia que determina la estabilidad observada para las enzimas de restricción en matrices de trehalosa. Franks (1993), sostiene que el estado vítreo es especialmente importante en la estabilización de materiales biológicos que en medio líquido resultan lábiles. Bell y Hageman (1996), reportaron que la estabilidad térmica de proteínas globulares, basada en su temperatura de desnaturalización, incluidas en matrices sólidas de trehalosa, sacarosa, sorbitol o glicerol, depende de la Tg del carbohidrato utilizados en la matriz de tal forma que, a menor Tg mayor es el grado de inestabilidad de la proteína.

Otros autores postulan que si bien la transición vítrea es un fenómeno importante para entender algunos de los efectos del agua en las propiedades de alimentos y materiales biológicos, la Tg no puede ser considerada como el indicativo absoluto de la estabilidad, siendo necesaria una mayor evidencia experimental que pruebe lo sostenido por la teoría de la transición vítrea (Simatos y col, 1995; Chirife y Buera, 1996). En concordancia con lo mencionado arriba, la evidencia experimental acumulada en los últimos años indica que la inactivación enzimática en sistemas amorfos no

puede ser explicada solo en base de la teoría de la transición vítrea. Diversos autores, (Schebor y col, 1996; Mazzobre y col, 1997; Cardona y col, 1997, Rossi y col, 1997, Terebizniz y col, 1997, 1998 a) han observado para distintos tipos de enzimas que :

⇒ Aún en condiciones en que la matriz se encuentra vítrea, se produce inactivación enzimática significativa.

⇒ Efectos específicos asociados a la naturaleza de la matriz y de la enzima son frecuentemente más importantes en la determinación de la estabilidad enzimatica que los valores de la Tg de la matriz.

⇒ El efecto protector brindado por cada matriz en particular es máximo cuando ésta se encuentra vítrea y mínimo si cristaliza.

⇒ Las matrices formadas por el disacárido trehalosa son las que protegen en forma más efectiva a las distintas enzimas ensayadas. El grado de protección obtenido con este azúcar es mayor al esperado según su Tg.

⇒ Un aditivo, puede hallarse en condiciones vítreas y muy alejado de su Tg, pero si no forma puentes de hidrógeno con la proteína y su volumen libre no es pequeño, probablemente no la proteja (Terebiznik y col, 1997; Crowe y col., 1998)

Por esta razón, el análisis de la estabilidad de enzimas debe realizarse teniendo en cuenta todas las teorías existentes respecto a inactivación,y estabilización expuestas anteriormente.

Por otro lado se debe tener en cuenta que los mecanismos de estabilización de enzimas no son los mismos en medio líquido y en medio deshidratado. Por ejemplo, las enzimas de restricción son protegidas por la trehalosa en medio deshidratado respecto al control sin trehalosa, pero estas mismas enzimas no aumentan su estabilidad en medio líquido cuando están en presencia de este azúcar (Colaço,1992).

# *Objetivos*

⇒ Seleccionar una cepa de *Aspergillus niger* productora de pectinasas.

⇒ Seleccionar las condiciones óptimas para la máxima producción de pectinliasa y mínima de pectinesterasa a partir de dicha cepa, tanto para fermentación en medio líquido como sódido.

⇒ Comparar la productividad de pectinasas por fermentación en medio sólido y líquido.

⇒ Estudiar la estabilidad de la pectinliasa deshidratada en relación a la Tg del sistema.

⇒ Estudiar la relación entre los procesos de desnaturalización e inactivación de pectinliasa en sistemas de alta y baja humedad.

# *Materiales y Métodos*

# 1. SELECCIÓN DE CEPAS PECTINOLÍTICAS

## *1.1 CRECIMIENTO DE CEPAS*

Cepas de *Aspergillus niger* (5 de colección y 160 aisladas en el Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ingeniería, UBA) fueron sembradas en estrías de agar-papa-glucosa (PDA). Se incubaron a 28°C durante una semana y el micelio esporulado se utilizó en el screening.

### 1.1.1 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE SCREENING

El colorante rojo de rutenio es utilizado para teñir la pectina de tejidos vegetales para su observación al microscopio (Braverman, 1980) y hay referencias acerca de la utilización de este colorante en placas de agar-pectina para revelar actividad pectinolítica (Cotty y col, 1990; Wang y col, 1992).

En placas de agar nutritivo (0,5% p/v de peptona de carne; 0,3% p/v de extracto de levadura; 1,2% p/v de agar) con o sin 0,5% de pectina cítrica se colocó un papel secante de 0,5 cm de diámetro embebido con distintas diluciones de pectinasas comerciales (en buffer acetato 40 mM, pH 4,6) según se detalla:

- Pectinesterasa de naranja Sigma (E.C. 3.1.1.11): 12,5 µl de una dilución 0,2% p/v.
- Poligalacturonasa purificada de *A. niger* Sigma (E.C. 3.2.1.15): 12,5 µl de una dilución 1:50.
- Pectinliasa purificada de *A. niger* Sigma (E.C. 4.2.2.10): 12,5 µl de una dilución 1:50.
- Pectinasa de *A. niger* Sigma (E.C. 3.2.1.15): 12,5 µl de una dilución 1:6.
- Mezclas de las diluciones utilizadas de las enzimas:
    1. PE + PG ( 7 µl de cada enzima)

2. PE + PL ( 7 µl de cada enzima)
3. PL + PG ( 7 µl de cada enzima)
4. PE + PL + PG ( 5 µl de cada enzima)

Las placas con el papel de filtro embebido en las distintas combinaciones de pectinasas fueron incubadas toda la noche a 37°C y reveladas al día siguiente con una solución acuosa 0,03% de rojo de rutenio en contacto durante 30 minutos, luego de los cuales la solución de revelado fue removida y las placas, fotografiadas.

Los controles negativos fueron las placas de agar sin pectina incubadas con las distintas combinaciones de enzimas y una placa de agar-pectina incubada con un disco de papel embebido sólo en buffer acetato 40mM, pH 4,6.

### 1.1.2 SELECCIÓN

Se utilizaron placas de petri con agar nutritivo + pectina 0,5% (como se describió en el punto anterior).

Cada una de las cepas en PDA, se inoculó en forma de punto en el centro de cada placa a fin de obtener el crecimiento radial de una sola colonia. La inoculación de cada cepa se realizó por duplicado y en caso de que la diferencia entre los duplicados fuera mayor al 15%, se realizó un triplicado.

Las placas inoculadas se incubaron 72 horas a 28°C, luego de lo cual, la pectinólisis fue testeada por teñido con rojo de rutenio acuoso 0,03%. En caso de ser una cepa pectinolítica, se observó un halo claro (a veces con un borde fucsia) alrededor de la colonia. El resto de la placa era de color rosado.

Con un vernier se midió el diámetro mayor y menor de cada colonia y su halo correspondiente, calculándose la relación halo/colonia como un indicador rápido para evaluar capacidad pectinolítica.

## 2. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

### *2.1 ACTIVIDAD PECTINLIASA*

Se sabe que la doble ligadura generada por la acción de PL absorbe a 235 nm (Albersheim, 1965) , por lo tanto se midió la absorbancia a 235 nm de mezclas de reacción pectina - extracto de fermentación en las siguientes condiciones:

Sustrato: 1,5 ml de pectina cítrica 0,5% p/v en buffer acetato 40 mM, pH 4,6 a 37°C.

Ensayo: 0,1 ml de la dilución apropiada de extracto enzimático se pusieron en contacto con el sustrato y se incubaron 15 minutos a 37°C. Se paró la reacción agregando 0,15 ml de HCl 1N. Para el blanco, el HCl se agregó primero (Spagna y Pifferi, 1994).

Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que provoca un aumento de absorbancia a 235 nm de 1 en las condiciones del ensayo (Alaña Alkorta y col, 1990; Delgado y col, 1992; Navarro del Cañizo y col, 1994; Acuña Argüelles y col, 1995).

### *2.2 ACTIVIDAD PECTINESTERASA*

Se utilizó el método descripto por Vilariño y col (1993).

El sustrato consistió en una solución acuosa al 0,5% de pectina cítrica que contenía, además, 0,017% de verde de bromofenol. Este es un colorante indicador de pH que vira del amarillo (pH menores que 4) al azul (pH mayores que 5,3) pasando por distintos verdes entre esos valores de pH. La mezcla se ajusta a pH 5 con NaOH 1N.

Se colocaron 1,9 ml de este sustrato en tubos de ensayo y se preincubaron a 37°C. Se les agregó 0,1 ml de la dilución adecuada de extracto enzimático y se monitoreó el descenso de absorbancia a 617 nm (debido a la liberación de grupos $COO^-$) durante 190 segundos.

La curva de calibración $DO_{617}$ vs µmol $COO^-$ se realizó agregando ácido galacturónico (0,05 a 1 µmol) a 1,9 ml de sustrato y midiendo su absorbancia.

El control negativo consistió en la incubación de sustrato con extracto inactivado térmicamente (extractos líquidos: 10 minutos a 100°C).

Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol $COO^-$ por minuto.

## *2.3 ACTIVIDAD POLIGALACTURONASA*

Se midieron los azúcares reductores liberados por esta enzima utilizando el método de Somogyi (1944) y Nelson (1945).

Sustrato: pectina cítrica 0,5% en buffer acetato 40mM pH 4,6.

Se colocaron 0,5 ml de sustrato y se preincubaron a 37°C, luego se le agregaron 25 µl de la dilución apropiada de extracto enzimático y se dejó reaccionar 15 minutos a 37°C. Se tomaron 0,05 ml de la mezcla de reacción, se colocaron en tubos de ensayo conteniendo 0,2 ml de reactivo de Somogyi y 0,15 ml de agua, se taparon y se dejaron 15 minutos en un baño a temperatura mayor que 95°C. Luego de enfriados, se le agregaron 0,2 ml de reactivo de Nelson, se llevan a 3 ml con agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm.

La curva de calibración se realizó con ácido galacturónico, el cual se colocó ( 0,1 a 2 µmoles) en tubos conteniendo 0,2 ml de reactivo de Somogyi y 0,2 ml de la solución acuosa de ácido galácturónico. Estos se colocaron tapados en el baño a 95 -100°C y se siguieron los pasos descriptos anteriormente.

Para los blancos, 0,05 ml de la mezcla de reacción se llevaron al baño de alta temperatura sin realizar la incubación de 15 minutos a 37°C.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de azúcar reductor en las condiciones del ensayo.

## 2.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES

La evolución de los azúcares reductores en los medios de fermentación se determinó utilizando el método descripto en el punto anterior.

## 2.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó el método de Bradford (1976) usando como standard seroalbúmina bovina (BSA).

## 2.6 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se usó el método descripto por Laemmli (1970) y las corridas se realizaron por duplicado utilizando un equipo Miniprotean II de Bio Rad (geles de 8 x 10 cm). Se hicieron geles de poliacrilamida - pectina (Cruickshank, 1982) con un 12% de entrecruzamiento, con una relación acrilamida:bisacrilamida 30:1 y 0,1% de pectina cítrica. En cada well se sembró la misma cantidad de proteína (de 6 a 15 μg). Las corridas se realizaron a voltaje constante (185 V) por 70 minutos. En caso de electroforesis desnaturalizantes, los buffers stacking (pH 6,8) y de separación (pH 8,8) contenían 10% p/v de SDS y el buffer de corrida (pH 8,3), 1% de SDS.

Luego de terminada la corrida, los geles se dividieron y una mitad fue teñida para proteínas y la otra, utilizada para analizar la actividad pectinolítica.

La tinción para proteínas se realizó por inmersión toda la noche en una solución 0,1% p/v de Coomassie Blue R-250, 10% v/v de ácido acético glacial y 45% v/v de metanol. Luego se destiñó con una solución 10% v/v de ácido acético glacial y 10% v/v de metanol hasta la observación de las bandas de proteínas y se guardaron a 4°C en ácido acético 7%.

La tinción para observar actividad pectinolítica se realizó de acuerdo a lo descripto por Cruickshank (1982), incubando el gel a 37°C en ácido málico 0,1M por 45 minutos, lavando 15 minutos con agua destilada (3 cambios) y tiñendo 1 hora con una solución acuosa 0,03% de rojo de rutenio. En estas condiciones PE da una banda fucsia y PG Y PL dan bandas blancas en un fondo rosa. En el caso de los geles corridos en condiciones desnaturalizantes, se eliminó el SDS por lavado 1 hora en Tritón X-100 2,5% y se lavó 15 minutos con agua destilada (3 cambios), previamente a la incubación con ácido málico.

El análisis densitométrico de los geles se efectuó con un densitómetro Bio Rad modelo GS-670 equipado con el software Molecular Analyst II de Bio Rad.

# 3. FERMENTACIONES

## *3.1 FERMENTACIONES EN ESTADO LÍQUIDO (FEL)*

### 3.1.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE FERMENTACIÓN

Se probaron distintos productos agroindustriales como sustratos de fermentación:

⇒ Afrechillo de arroz

⇒ Salvado de trigo

⇒ Okara (residuo de la fabricación de leche o bebidas a base de soja)

La preparación del medio de fermentación se realizó de la siguiente manera:

Preparación de una suspensión 10% p/v del sustrato elegido en agua o en una solución 0,5 - 2% de pectina cítrica (en los experimentos en los que fue necesario, además se agregó 0,7% m/v de glucosa). Ésta se autoclavó 5 minutos a 121°C, se filtró a través de gasa y luego se centrifugó 20 minutos a 12000 g. Los sobrenadantes se juntaron y se ajustó su pH a 7,5 (salvo especificación contraria) con NaOH 1N.

En los casos en los que fue necesario se ajustó la $a_w$ con polietilenglicol 200 ($PEG_{200}$). Se utilizó la ecuación de Norrish (Ecuación 1) para determinar la cantidad necesaria de $PEG_{200}$:

$$a_w = X_1 \cdot e^{-k.X_2^2} \qquad (1)$$

Donde: $X_1$: fracción molar de agua

$X_2$: fracción molar de soluto

k: constante que depende del soluto ($k_{PEG\ 200}$: 6,1)

En los experimentos en los que se agregó $PEG_{200}$, el pH se ajustó posteriormente a su agregado.

Para mantener constante el volumen de fermentación en todos los erlenmeyers, se agregó un volumen de agua igual al de $PEG_{200}$ en los experimentos que no llevaban $PEG_{200}$.

Se distribuyeron 50 ml (o 60ml en el caso de los experimentos con $PEG_{200}$) en erlenmeyers de 250 ml y se esterilizó el medio por autoclavado 20 minutos a 121°C.

La $a_w$ final se corroboró usando un higrómetro marca Novasina.

### 3.1.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se preparó a partir de la cepa elegida crecida durante 5-9 días en estrías de PDA a 28°C.

Las esporas se levantaron agitando en un vortex luego de agregar a la estría una solución acuosa estéril de Tween 80 al 0,02% . Se tomó una alícuota, se colocó en una cámara de Neubauer y se contaron las esporas a fin de calcular el volumen necesario para el inóculo (no mayor a 0,5 ml).

En los primeros experimentos se utilizó un inóculo de $10^6$ esporas/ml de medio de fermentación y luego se cambió a $10^5$ esporas/ml.

### 3.1.3 FERMENTACIÓN

Los erlenmeyers inoculados se incubaron en agitador rotatorio a 28°C durante el tiempo especificado, luego se filtró el contenido de cada erlenmeyer a través de papel de filtro prepesado para separar la biomasa. Ésta se determinó gravimétricamente, luego de secar en una balanza a 95°C hasta obtener un peso constante. El filtrado se utilizó como extracto para medir actividades enzimáticas, pH, biomasa, azúcares reductores y proteínas solubles.

### 3.1.4 EFECTO COMBINADO DE GLUCOSA Y $a_w$: MODELADO MATEMÁTICO

Se eligió un diseño factorial de 2 factores, cada uno con dos niveles (Box y col., 1978) para estudiar la producción máxima de biomasa, PE, PG y PL.
Los niveles de las variables independientes estudiados fueron:
⇒ 0,993 y 0,968 para $a_w$;
⇒ 0 y 0,7% para glucosa.
Los valores codificados para cada variable fueron +1 (para el nivel mayor) y -1 (para el nivel más bajo).
Los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos se analizaron por regresión lineal múltiple utilizando el software Statgrafics 5.1 según la siguiente ecuación:

$$Y = b_0 + b_1.[glu] + b_2.a_w + b_3.[glu].a_w \qquad (2)$$

Donde $b_0$, $b_1$, $b_2$ y $b_3$ representan los coeficientes de regresión y $[glu].a_w$ representa el término de interacción.
El criterio para eliminar alguna variable de la ecuación completa se basó en los valores del test de Fischer obtenidos al realizar un ANOVA.

## *3.2 FERMENTACIONES EN ESTADO SÓLIDO (FES)*

### 3.2.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE FERMENTACIÓN

Se probaron distintos productos agroindustriales como sustratos de fermentación:

⇒ Mosto de uva

⇒ Salvado de trigo

⇒ Okara (residuo de la fabricación de leche o bebidas a base de soja)

⇒ Puntas y braquias de alcahucil (residuo de la fabricación de escabeche de alcahucil)

Se determinó la humedad de cada sustrato utilizando una balanza marca AND modelo AD-4714A . Se pesaron5 o 10 g (base seca) del sustrato elegido en un erlenmeyer de 250 o 500 ml previamente tarado, se le adicionó o no 1% de pectina cítrica y se le agregó la cantidad de agua necesaria para llegar a la humedad deseada. En los casos en los que se deseba modificar el pH, se agregó la cantidad de HCl o NaOH 1N necesaria de acuerdo a ensayos previos realizados a tal fin. En los casos en los que fue necesario ajustar la $a_w$ se hizo con polietilenglicol 200 ($PEG_{200}$). Se utilizó la ecuación de Ross (Ecuación 3) para determinar la cantidad de $PEG_{200}$ necesaria para lograr la aw deseada:

$$a_{wsist} = a_{wm} \cdot a_{wPEG} \qquad (3)$$

Donde: $a_{wsist}$: $a_w$ final del medio de fermentación

$a_{wm}$ :$a_w$ del sustrato a esa humedad según su isoterma de sorción

$a_{wPEG}$ : $a_w$ de una solución $PEG_{200}$ - agua calculada por la ecuación de Norrish.

Se esterilizó el medio por autoclavado 20 minutos a 121°C.

La $a_w$ final se corroboró a 25°C usando un higrómetro marca Novasina.

### 3.2.2 ISOTERMAS DEL SUSTRATO DE FERMENTACION

Sustrato utilizado:

- Salvado

Se agregó agua destilada al sustrato elegido hasta distintas humedades compatibles con la posibilidad de realizar una fermentación en medio sólido, se autoclavó 20 minutos a 121 °C, se dejó reposar 1 día a 28°C a fin de equilibrar los componentes y se determinó la humedad con una balanza infrarroja y la $a_w$ a 25°C con un equipo Novasina. Se realizaron puntos con 1% de pectina cítrica y/o con el agregado de NaOH o HCl para constatar que estos metabolitos no afectan a la isoterma en las concentraciones usadas.

### 3.2.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

De la misma manera que lo descripto en punto 4.1.2. Se utilizó un inóculo de $5.10^6$ esporas/ g de sustrato seco.

### 3.2.4 FERMENTACIÓN

Los erlenmeyers conteniendo los sustratos inoculados se colocaron en una cámara termostatizada a 28°C el tiempo especificado.

### 3.2.5 DETERMINACIÖN DE PESO SECO Y HUMEDAD

Los erlenmeyers fermentados fueron removidos de la cámara termostatizada, pesados y congelados (un mínimo de 48 horas a -18°C). Se liofilizaron 48 horas en un liofilizador Stokes modelo 21 y se volvieron a pesar a fin de determinar el peso seco de la fermentación. Por diferencia se calculó la humedad final del sistema fermentado.

### 3.2.6 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Se agregaron 100 ml de solución acuosa de NaCl 1% a cada erlenmeyer y se colocaron 30 minutos en agitador rotatorio, luego se centrifugaron 20 minutos a 12000 g y se filtraron a través de papel de filtro. El extracto resultante se utilizó para la determinación de actividad enzimática, de azúcares, de proteínas y electroforesis.

### 3.2.7 ESTUDIO DE LA CONIDIACIÓN

El sustrato fermentado (koji) fue liofilizado 48 horas y luego molido en un molinillo de café durante 45 segundos. Se tomaron entre 0,2 y 1 g de koji y se resuspendieron en 50 ml de una solución acuosa de Tween 80 al 2%. Se agitó la suspensión 30 minutos en agitador rotatorio y luego se contaron las esporas utilizando una cámara de Neubauer. Cada erlenmeyer se determinó por duplicado y a su vez, cada suspensión se contó por duplicado (en caso de diferencias mayores que 15% entre duplicados, se realizó un triplicado).

## *3.3 COMPARACIÓN ENTRE FES Y FEL*

### 3.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño basado en una red de Doehlert (Doehlert, 1970) de 3 factores. Los factores estudiadas fueron pH inicial, $a_w$ inicial y tiempo de fermentación (t).

Los valores reales de las variables independientes (x) se codificaron en base a una relación lineal entre los valores codificados (z) y reales (x) de acuerdo a la ecuación 4:

$$X = z \cdot \frac{\Delta x}{\Delta z} + X_0 \qquad (4)$$

Donde: x es el valor real de la variable independiente

Z es el valor codificado de la variable independiente (predeterminado en la matriz experimental).

$X_0$ es el valor real de la variable independiente en el centro del dominio.

$\Delta x$ y $\Delta z$ son la diferencia entre el máximo y el mínimo valor real y codificado respectivamente.

Los factores y niveles se detallan a continuación para cada tipo de fermentación:

FES

| Variable | Símbolo | Valores de x y (z) |
|---|---|---|
| pH | $X_1$ | 5 (-0,816); 6 (0); 7 (0,816) |
| $a_w$ | $X_2$ | 0,931 (-1); 0,943 (-0,5); 0,955 (0); 0,968 (0,5); 0,981 (1) |
| Tiempo de fermentación (días) | $X_3$ | 2 (-0,866); 3 (-0,577); 4 (-0,289); 5 (0); 6 (0,289); 7 (0,577); 8 (0,866) |

FEL

| Variable | Símbolo | Valores de x y (z) |
|---|---|---|
| pH | $X_1$ | 5 (-1); 5,5 (-0.5); 6 (0); 6,5 (0,5); 7 (1) |
| $a_w$ | $X_2$ | 0,954 (-0,866); 0,961 (-0,577); 0,968 (-0,289); 0,974 (0); 0,981 (0,289); 0,987 (0,577); 0,994 (0,866) |
| Tiempo de fermentación (días) | $X_3$ | 1 (-0,816); 2,5 (0); 4 (0,816) |

Tabla 1: Valores reales (x) y codificados (z) para las variables estudiadas en cada tipo de fermentación

La matriz experimental de trabajo (valores codificados entre paréntesis y reales sin paréntesis) se muestran en las siguiente tablas:

| Experimento | $X_1$: pH | $X_2$: $a_w$ | $X_3$: días |
|---|---|---|---|
| 1 | (0) 6 | (1) 0,981 | (0) 5 |
| 2 | (0) 6 | (-1) 0,931 | (0) 5 |
| 3 | (0) 6 | (0,5) 0,968 | (0,866) 8 |
| 4 | (0) 6 | (-0,5) 0,943 | (-0,866) 2 |
| 5 | (0) 6 | (0,5) 0,968 | (-0,866) 2 |
| 6 | (0) 6 | (-0,5) 0,943 | (0,866) 8 |
| 7 | (0,816) 7 | (0,5) 0,968 | (0,289) 6 |
| 8 | (-0,816) 5 | (-0,5) 0,943 | (-0,289) 4 |
| 9 | (-0,816) 5 | (0,5) 0,968 | (-0,289) 4 |
| 10 | (-0,816) 5 | (0) 0,955 | (0,577) 7 |
| 11 | (0,816) 7 | (-0,5) 0,943 | (0,289) 6 |
| 12 | (0,816) 7 | (0) 0,955 | (-0,577) 3 |
| 13 | (0) 6 | (0) 0,955 | (0) 5 |
| 14 | (0) 6 | ( 0) 0,955 | (0) 5 |
| 15 | (0) 6 | (0) 0,955 | (0) 5 |

Tabla 2: Matriz experimental para FES. Valores codificados de las variables independientes entre paréntesis y valores reales sin paréntesis

| Experimento | $X_1$: pH | $X_2$: $a_w$ | $X_3$: días |
|---|---|---|---|
| 1 | (1) 7 | (0) 0,974 | (0) 2,5 |
| 2 | (-1) 5 | (0) 0,974 | (0) 2,5 |
| 3 | (0,5) 6,5 | (0,866) 0,994 | (0) 2,5 |
| 4 | (-0,5) 5,5 | (-0,866) 0,954 | (0) 2,5 |
| 5 | (0,5) 6,5 | (-0,866) 0,954 | (0) 2,5 |
| 6 | (-0,5) 5,5 | (0,866) 0,994 | (0) 2,5 |
| 7 | (0,5) 6,5 | (0,289) 0,981 | (0,816) 4 |
| 8 | (-0,5) 5,5 | (-0,289) 0,968 | (-0,816) 1 |
| 9 | (0,5) 6,5 | (-0,289) 0,968 | (-0,816) 1 |
| 10 | (0) 6 | (0,577) 0,987 | (-0,816) 1 |
| 11 | (-0,5) 5,5 | (0,289) 0,981 | (0,816) 4 |
| 12 | (0) 6 | (-0,577) 0,961 | (0,816) 4 |
| 13 | (0) 6 | (0) 0,974 | (0) 2,5 |
| 14 | (0) 6 | (0) 0,974 | (0) 2,5 |
| 15 | (0) 6 | (0) 0,974 | (0) 2,5 |

Tabla 3: Matriz experimental para FES. Valores codificados de las variables independientes entre paréntesis y valores reales sin paréntesis

El análisis de los resultados del diseño experimental se realizó con el software Statgraphics 5.1. Se ajustó a un modelo cuadrático de la siguiente forma:

$$Y=b_0 + b_1.pH + b_2.a_w + b_3.t + b_4.pH^2 + b_5.a_w^2 + b_6.t^2 + b_7.pH.a_w + b_8.pH.t + b_9.a_w.t \quad (5)$$

Donde Y es la respuesta y $b_i$ son los coeficientes de regresión obtenidos a partir del modelo. La retención de los términos en la ecuación, se basó en el ANOVA de los resultados, conservándose sólo aquéllos cuyo coeficiente fue significativo ($P<0,05$).

### 3.3.2 COMPARACIÓN ENTRE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN AMBOS TIPOS DE FERMENTACIÓN

En vista de lo difícil que es comparar actividades enzimáticas obtenidas en dos tipos de fermentaciones tan diferentes (por ejemplo 1 ml de extracto obtenido en condiciones de fermentación en medio líquido no es comparable con 1 ml de extracto obtenido en condiciones de fermentación en medio sólido) se eligió efectuar la comparación respecto de la masa de sustrato inicial (actividad enzimática/g de salvado de trigo). En el caso de la fermentación en estado líquido se sabe que a partir de 50 ml de suspensión de salvado 10% (5 g de salvado) se obtienen 25 ml de extracto, suficientes para un erlenmeyer. En el caso de la fermentación en estado sólido, un erlenmeyer con 5 g de salvado es extraído con NaCl 1%, rindiendo aproximadamente 50 ml de extracto.

En los experimentos en los que se compararó actividad enzimática por ambas tecnologías de fermentación, la actividad enzimática se expresó en UE/5 g STi (unidades/5 g de salvado de trigo inicial).

## 4. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

### *4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO*

Se trabajó con un extracto rico en PL obtenido por fermentación en estado sólido (sustrato: salvado de trigo suplementado con un 1% de pectina cítrica (Sigma); pH inicial: 7; $a_w$ inicial: 0,981; tiempo de fermentación: 3 días). En estas condiciones, la PL representó el 65% de las proteínas totales del extracto.

Una vez obtenido el extracto, éste fue filtrado sucesivamente a través de membranas millipore 0,45μm y 0,2 μm. Luego se ultrafiltró en frío a través de membrana de celulosa regenerada de 10000 Da de poro, pasando 1

volumen de extracto y 2 volúmenes de agua. El equipo de ultrafiltración utilizado fue un Costar de Nucleopore (low pressure stirred cell, S-series). Se concentró el extracto 4 veces, se fraccionó, se congeló un mínimo de 48 horas a –18°C y se liofilizó durante 48 horas.

## *4.2 ISOTERMA DEL EXTRACTO DESHIDRATADO*

En crisoles de aluminio prepesados de 40 µl marca Mettler modelo ME 27331 se colocó extracto liofilizado. Las muestras fueron equilibradas 3 horas en un equipo Novasina Thermoconstanter (celda BSK-4-0102002) en el que se colocaron soluciones saturadas de las siguientes sales: LiCl (HR 11%); $MgCl_2$ (HR 33%); $K_2CO_3$ (HR 43%); $Mg(NO_3)_2$ (HR 53%); $CbCl_2$ (HR 65%); $(NH_4)_2SO_4$ (HR 81%) y $K_2Cr_2O_7$ (HR 98%). Se probaron diferentes tiempos de equilibración y se determinó que en 3 horas se llegaba al equilibrio dado la pequeña cantidad de muestra y el espacio reducido de equilibración.

La humedad se determinó por secado en estufa a 100°C hasta peso constante, perforando las cápsulas luego de correrlas en el DSC. Se verificó previamente que no hubiera ocurrido pérdida de peso de la cápsula.

Se graficó $a_w$ vs humedad.

## *4.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)*

Las cápsulas equilibradas como se indicó en el punto anterior, se sellaron herméticamente y fueron corridas en un DSC Mettler 30 con un procesador TA 4000 Thermal Analysis System. Las corridas se realizaron entre 0°C y 145°C a 10 K/min salvo indicación contraria. Los termogramas se analizaron usando un Software Mettler TA72 para determinar los parámetros de la endoterma de desnaturalización y la temperatura de transición vítrea (en este caso, se informa el punto medio).

La calibración del aparato se realizó usando los termogramas de fusión del hielo y el indio. Se utilizó una cápsula de aluminio vacía como referencia.

## *4.4 CINETICA DE DESNATURALIZACIÓN*

Se utilizó el método dinámico (Osawa, 1970) para determinar las constantes dinámicas de desnaturalización (k, Ea y z). Las corridas de DSC se realizaron por triplicado a diferentes velocidades de calentamiento ($\beta$= 2,5; 5; 10; 15 y 20 K/min) de acuerdo a la norma ANSI/ASTM 698/79.

Se determinó la temperatura del pico de la endoterma de desnaturalización (Tp) para cada velocidad de calentamiento y se graficó según la siguiente ecuación:

$$\ln (\beta/Tp^2) = \ln(z.R/Ea) - Ea/R.Tp \qquad (6)$$

Donde: $\beta$: Velocidad de calentamiento (K/min)

Tp: Temperatura del pico de la endoterma de desnaturalización (K)

z: Factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius ($min^{-1}$)

R: Constante de los gases (1,98 cal/K.mol)

De este modo se calcularon Ea y z.

Para calcular la temperatura de desnaturalización de las proteínas del extracto, se extrapoló la Tp a una velocidad de calentamiento 0.

El cálculo de la constante cinética de desnaturalización (k) se realizó utilizando la ecuación de Arrhenius:

$$k = z \cdot e^{-Ea/R.T} \qquad (7)$$

Asumiendo una cinética de primer orden, se puede calcular el tiempo de vida media ($t_{1/2}$):

$$t_{1/2} = \ln 2/k \qquad (8)$$

## 4.5 ENSAYOS DE INACTIVACION TÉRMICA DE PECTINLIASA.

Se pipetearon 0,5 ml de extracto (con o sin aditivos) en viales de vidrio de 2 ml, se congelaron un mínimo de 48 horas a –18°C, se liofilizaron 48 horas y se colocaron en desecadores al vacío conteniendo solución saturada de LiCl (HR%: 11%). Estos se dejaron una semana a 25°C para permitir la llegada al equilibrio.

Los aditivos utilizados se detallan en la siguiente tabla:

| aditivo | lactitol | trehalosa | Bisulfito de Na | 2-βmercapto-etanol |
|---|---|---|---|---|
| concentración | 5 y 15% p/v | 5 y 15% p/v | 0 y 1,5% p/p seco | 4 y 8 mM en la solución original |

Tabla 4: Aditivos y concentraciones utilizados en los ensayos de inactivación térmica

Los viales equilibrados se sellaron herméticamente con cinta teflon y se almacenaron a distintas temperaturas durante los tiempos especificados. A cada tiempo, se extrajeron dos viales que se colocaron rápidamente en hielo (temperaturas mayores que 45°C). Se reconstituyó el extracto al volumen original y se determinó la actividad remanente de PL según lo descrito anteriormente. Para corroborar que la humedad de equilibrio fuera la predicha por la isoterma, tres de los viales fueron secados a 100°C hasta peso constante.

Para cada temperatura se calculó la constante de inactivación (k), asumiendo una cinética de reacción de primer orden según la ecuación:

$$A = A_0.e^{-k.t} \qquad (9)$$

Donde: A: Actividad enzimática luego del tiempo t de tratamiento

$A_0$: Actividad enzimática del extracto no tratado térmicamente

t: tiempo de tratamiento

Se utilizó la ecuación de Arrhenius ( Ecuación 7) para calcular Ea (energía de activación) y z (factor preexponencial) correspondientes a la inactivación de la enzima.

## *4.6 EFECTO DEL pH EN LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA*

Previamente a la liofilización, se agregaron 20µl del buffer seleccionado (1M) a los 500 µl del extracto a liofilizar (el mismo que se describe en el punto 4.1), de modo que la molaridad final fuera de 40 mM. Luego se procedió a la liofilización y almacenamiento según lo descrito en el punto anterior.

Para evaluar la resistencia térmica de la enzima en presencia de los distintos buffers, se realizó un tratamiento térmico de 10 minutos a 100°C y se comparó la pérdida de actividad con un control al que no se le agregó ningún buffer (pH 5,6).

Los buffers utilizados fueron: citrato (pH 3,7; 5,6; 6,7) ; fosfato (pH 5,6; 6,8; 7,8) ; acetato (pH 4; 5; 5,6).

El pH se evaluó con un pHímetro digital marca Orion.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los ANOVA para detectar diferencias significativas se realizaron usando el Software Statgrafics 5.1. Siempre se trabajó con un $\alpha$ de 0,05.

# Resultados

# Capítulo 1: Fermentación

# 1.SELECCIÓN DE UNA CEPA PARA LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS

## *1.1 ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA EN PLACAS DE PETRI*

En las Figuras 1 a-k se visualizan las distintas actividades del complejo de pectinasas en placas de agar nutritivo con pectina.

Si se compara el patrón de tinción de una placa de agar nutritivo (Figura 1a ) con la tinción de una placa con pectina (Figura 1b) se ve que se tiñe más oscuro el agar que no tiene pectina. Por lo tanto se esperaría obtener sectores oscuros en este tipo de medio donde hayan actuado las pectinasas.

En la Figura 1c) se mezclaron los tres tipos de pectinasas y en la Figura 1d) se usó una pectinasa comercial que contiene las tres actividades. En ambos casos se observa el halo oscuro. En la Figura 1e) se colocó buffer acetato y se aprecia la ausencia del sector coloreado que indica pectinólisis.

En las Figuras 1f) y 1h) se observan halos oscuros con borde difuso claro para la enzimas PG y PL respectivamente, en tanto que la actividad PE resultó en un sector oscuro más pequeño con un borde claro bien marcado (Figura 1 g).

En las figuras 1i - 1k), se probaron las distintas combinaciones de a dos enzimas y en todos los casos se obtuvieron sectores oscuros con un borde claro difuso.

Una vez caracterizada la visualización de actividad pectinolítica que se puede esperar en el medio utilizado en la selección (agar nutritivo-pectina), se procedió a realizarla.

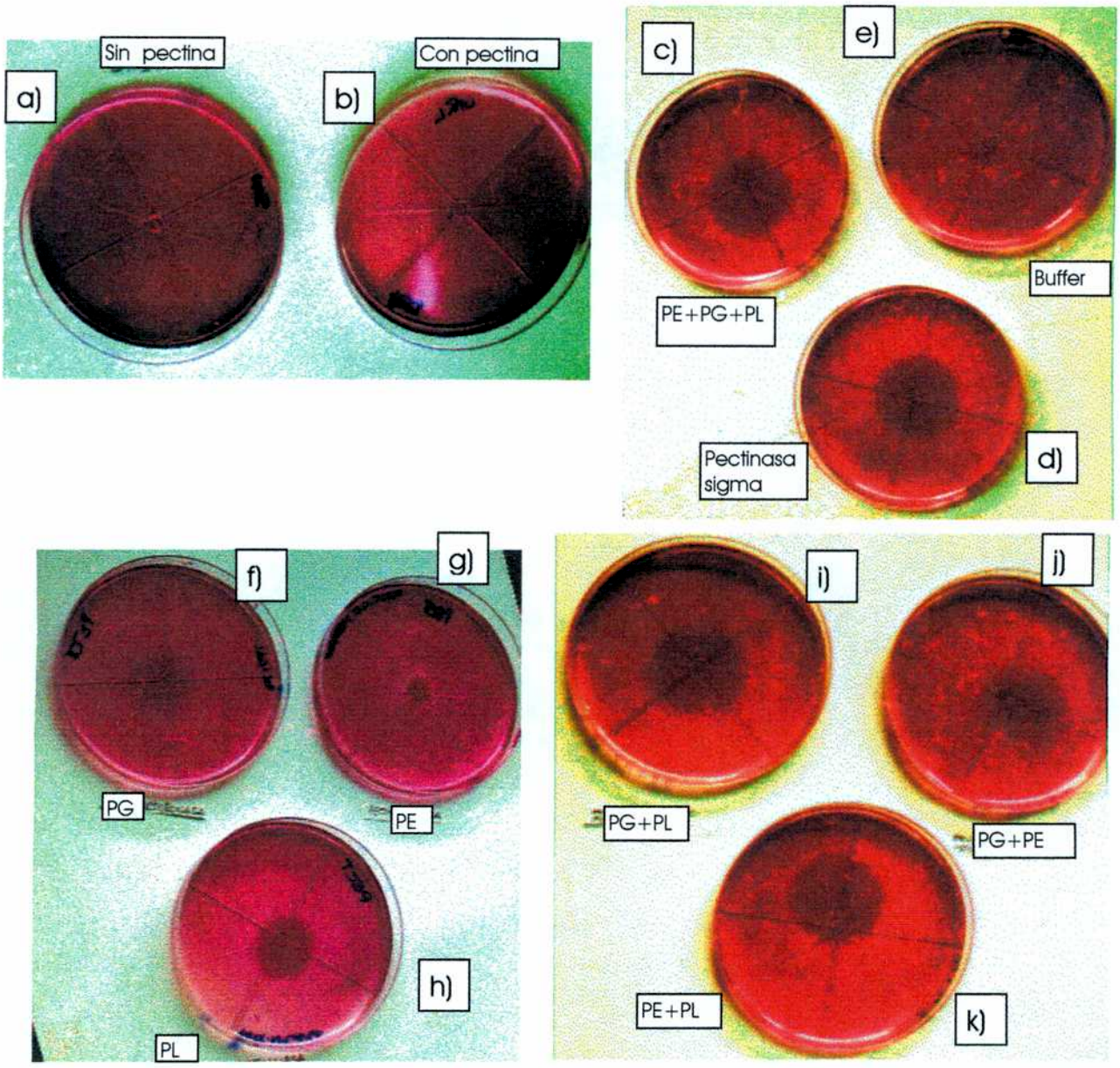



Figura 1: Halos de pectinólisis observados por tinción con rojo de rutenio en un medio de agar nutritivo-pectina. Combinaciones de distintas enzimas del complejo pectinolítico

## 1.2 SELECCION EN PLACA DE CEPAS PECTINOLÍTICAS

De las 165 cepas analizadas, el 91% mostró actividad pectinolítica en las placas de agar pectina teñidas con rojo de rutenio (visualizada como un halo claro alrededor de la colonia). En la Figura 2 se aprecia un ejemplo de cepa pectinolítica que presenta un halo oscuro con borde claro.

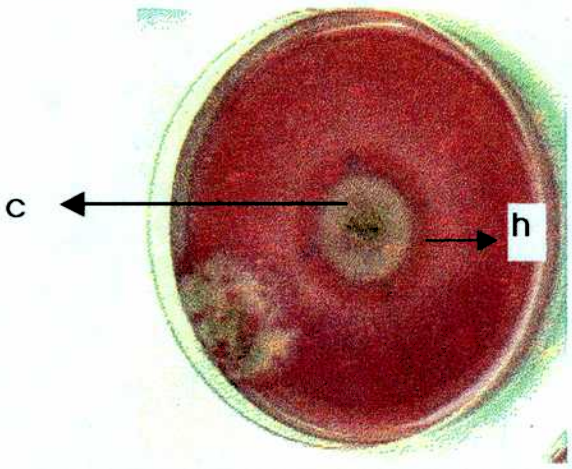



**Figura 2:** Halo de pectinólisis (h) alrededor de la colonia (c) de *Aspergillus niger* en medio agar -pectina teñido con rojo de rutenio.

Se preseleccionaron las cepas de halo mayor (aquellas cuya relación halo/colonia era más grande) y se conservó como control positivo de pectinólisis a la cepa de colección NRRL 3, de conocida actividad pectinolítica. Es de notar que la relación halo/colonia de esta cepa fue de 1,27, y que muchas de las cepas locales mostraron valores mayores que éste.

En la Figura 3 se presenta el histograma en el que se aprecia la distribución de las relaciones halo/colonia en las cepas estudiadas.

Las cepas seleccionadas para profundizar el estudio fueron las siguientes:

⇒ La cepa 27 (aislada de té en hebras)

⇒ La 28 (aislada de tilo en saquitos)

⇒ La 105 (aislada de hojas de laurel)

⇒ La 138 (aislada de harina de trigo)

⇒ La 144 (aislada de azafrán)

⇒ La 148 (aislada de té en hebras).

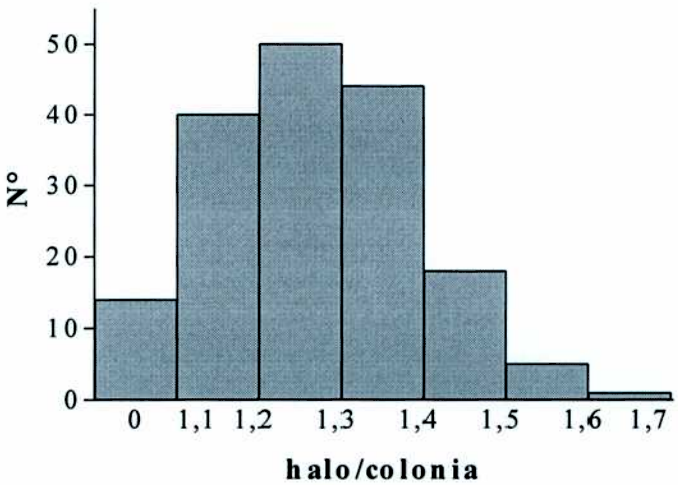



Figura 3: Distribución de frecuencias de las actividades pectinolíticas obtenidas en el screening

# 2. FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

## *2.1. COMPARACIÓN DE CEPAS PECTINOLÍTICAS EN DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACIÓN*

Las cepas preseleccionadas se hicieron crecer en tres tipos de sustratos en medio líquido: medio a base de afrechillo de arroz, salvado de trigo u okara 10%. Los medios estaban suplementados con 1% de pectina.

En todos los casos se analizó la producción de las tres enzimas del complejo pectinolítico (PE, PG y PL) a lo largo del tiempo de fermentación observándose que la máxima producción enzimática ocurría entre las 48 y 72 horas de fermentación.

En las Figuras 4 a), b) y c) se muestra la máxima producción de cada enzima en los distintos medios y por las distintas cepas normalizada respecto a la cepa pectinolítica control provista por la NRRL creciendo en afrechillo.

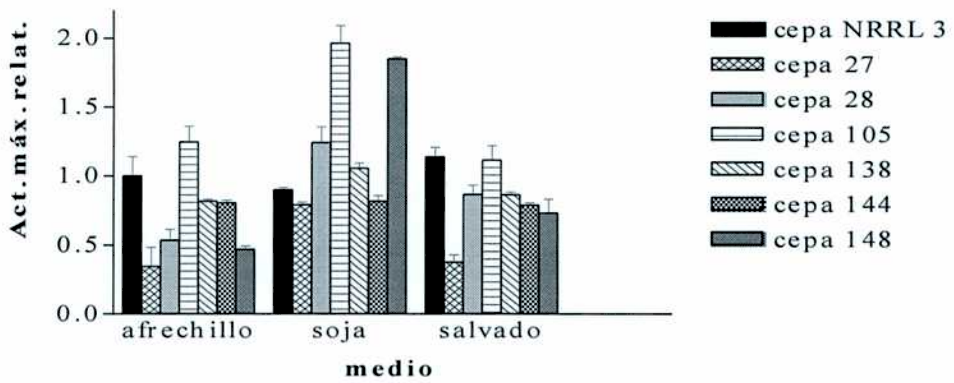
Como se puede apreciar en las figuras, la cepa que presentó mayor productividad de PL fue la 148 crecida en salvado, siendo más de tres veces superior a la productividad de la cepa control. Para 4 de las 7 cepas estudiadas, el salvado fue el medio en el que se logró mayor productividad de esta enzima.

Respecto de la PE, el mejor medio para obtener esta enzima fue la okara (soja). De acuerdo a nuestro objetivo en cuanto a obtener una baja productividad de PE y alta de PL, la okara es un medio con el que no es conveniente trabajar. La cepa 148, crecida en salvado fue de las que mostró menor producción de PE (0,8 respecto a la cepa NRRL 3).

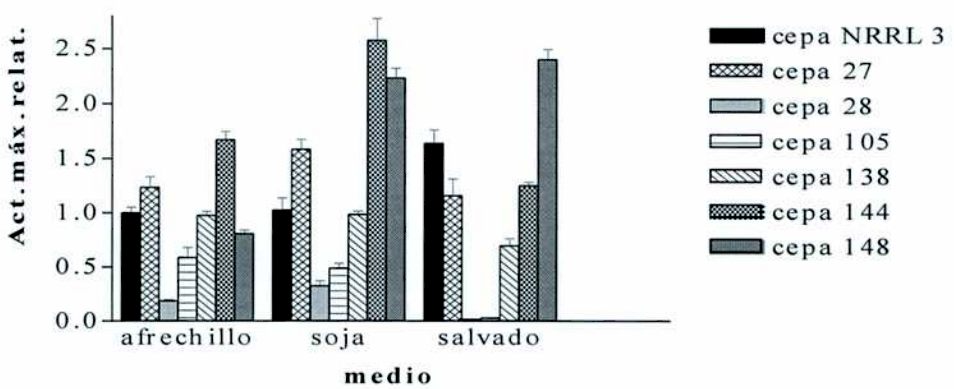
También la cepa 148 fue una de las mayores productoras de PG en salvado.

De las cepas preseleccionadas, se escogió la cepa 148 y el salvado como sustrato para proseguir ulteriores estudios de producción de pectinasas.

a)




b)




c)

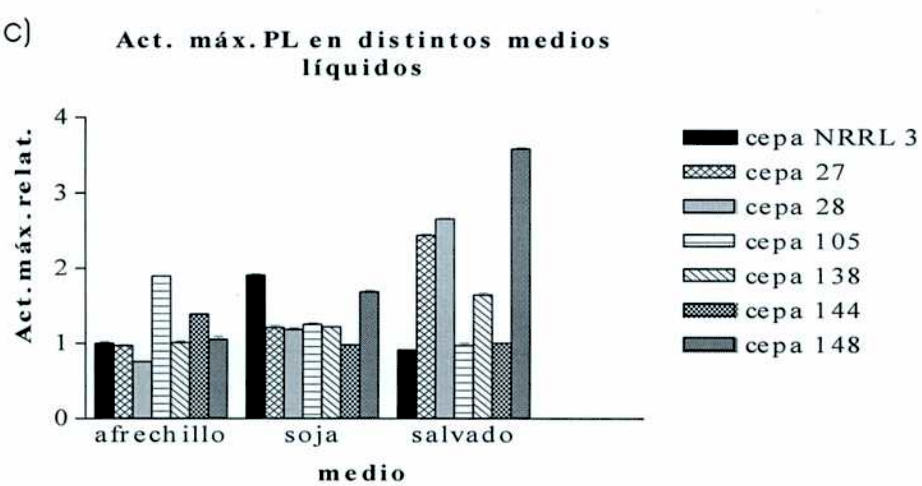



Figura 4: Producción de pectinasas por distintas cepas de *Aspergillus niger* en distintos sustratos por FEL.

## 2.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE PL

Una vez seleccionados la cepa y el sustrato de trabajo, se procedió a estudiar las variables de proceso que pudieran afectar la producción de las tres enzimas del complejo pectinolítico. Se eligió un tiempo de dos días de fermentación.

### 2.2.1 Efecto de la concentración de inductor en la producción de pectinasas

Manteniendo todos los otros parámetros constantes, se realizaron fermentaciones por triplicado y se testearon tres concentraciones de pectina en el medio para comprobar si la elegida a priori era la óptima para lograr menor actividad PE y mayor actividad PL y PG.

En la Figura 5 se muestra el efecto de agregar distintas concentraciones de pectina en la productividad de las tres enzimas del complejo pectinolítico. La producción obtenida se presenta relativizada a la que se observó utilizando 1% de pectina (utilizado en los ensayos descriptos anteriormente).

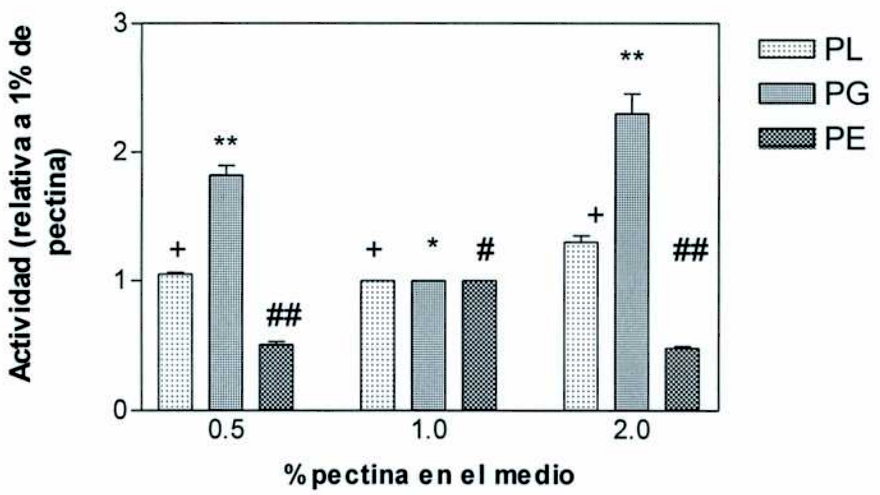



Figura 5: Efecto de la concentración de inductor en la producción de pectinasas. Los resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$) se marcan con distinta cantidad de símbolos sobre la barra en el gráfico.

Como se puede observar, la cantidad de pectina en el medio no afectó significativamente la producción de PL. En cambio, sí se observaron diferencias significativas para la PG cuyo óptimo de producción fue con un 2% de pectina, en tanto que no hubo diferencias significativas entre la actividad PG obtenida a 0,5% y1% de pectina. Respecto de la PE, se observa que su óptimo de producción es cuando el hongo crece en un medio con 1% de pectina (por lo tanto se estaba eligiendo una concentración que favorecía la presencia de la enzima menos deseada) en tanto que la actividad observada a 0.5% o 2% fue significativamente menor que a 1%. Es por ello que se decidió trabajar a partir de este punto con 0.5% o 2% de pectina como inductor. Por una cuestión económica y debido a que la enzima que más nos interesaba (PL), no presentaba diferencias de producción con ambas concentraciones, se decidió trabajar con un 0.5% de pectina en los ensayos subsiguientes.

Maldonado y Callieri, (1989) describieron una cepa de *Aspergillus niger* cuya producción de PE era mínima si se usaba una concentración de 0.5% de pectina y cuya producción de PG no era significativamente diferente luego de las 36 horas de fermentación independientemente de qué concentración de pectina se utilizaba.

Brumano y col. (1993) estudiaron el efecto de la concentración de pectina (de 0 a 0,4% p/v) en la producción de PL por *Penicillium griseoroseum*, reportando que la concentración óptima de inductor para obtener máxima producción de PL fue de 0,1%. Mayores concentraciones de pectina reprimieron la síntesis de esta enzima. Las diferencias con lo observado en este trabajo pueden deberse a que estos autores trabajaron con concentraciones de pectina mucho menores que las utilizadas en este trabajo y también a la utilización de otro hongo.

Pashova y col. (1999) observaron que la producción de PG por *Aspergillus niger* era reprimida por concentraciones de pectina mayores que 1% m/v, pero que el inductor resultaba indispensable para la producción de esta enzima.

### 2.2.2 Efecto del tamaño de inóculo en la producción de pectinasas

Para comprobar si el inóculo utilizado ($10^5$ esp/ml) era el óptimo para la producción de PL y PG y se asociaba a una baja producción de PE, se realizaron dos fermentaciones independientes en las que se ensayaron tres inóculos diferentes. Los resultados (Figura 6) se muestran relativizados respecto a la productividad obtenida con un inóculo de $10^5$ esporas/ml de medio.

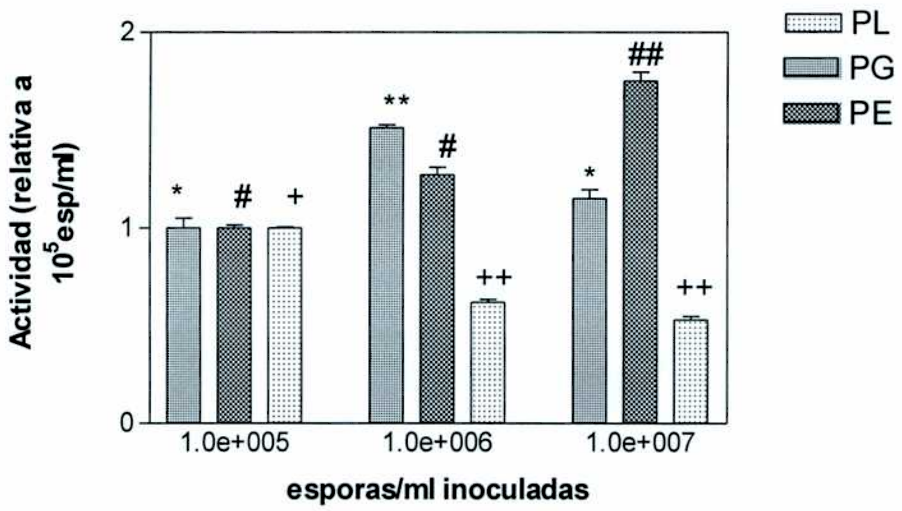



Figura 6: Efecto del inóculo en la producción de pectinasas. Las barras con igual número de símbolos sobre ellas representan los grupos estadísticamente iguales ($p < 0,05$)

La producción de PL por parte del hongo crecido a partir de un inóculo de $10^5$ esporas/ml de medio fue significativamente mayor (40%) que la actividad obtenida a partir de $10^6$ y $10^7$ esporas/ml de medio (cuyas actividades no fueron significativamente diferentes a un 95% de confianza). Con respecto a la actividad PG, se observa que el inóculo óptimo para obtener esta actividad es $10^6$ esporas/ml de medio, que dió significativamente mayor (50%) que a las otras concentraciones de inóculo (las cuales no presentaron entre sí diferencias significativas de actividad a un 95% de confianza). La actividad PE fue producida en mayor medida partiendo de un inóculo de $10^7$ esporas/ml (80% más que para $10^5$ esp/ml).

La producción de PE a partir de inóculos de $10^5$ y $10^6$ esporas/ml de medio no fue significativamente diferente a un 95% de confianza.

Para la elección de la concentración de inóculo a utilizar, se consideró que como $10^5$ esporas/ml de medio fue el inóculo óptimo para la enzima que más nos interesa (PL) y en esas condiciones se obtuvo muy poca actividad PE, este tamaño de inóculo era conveniente para realizar las fermentaciones.

Brumano y col. (1993) estudiaron el efecto del tamaño de inóculo en la producción de PL por *Penicillium griseorosseum* (entre $10^3$ y $10^7$ esporas/ml de medio de fermentación) y observaron que si bien a mayor inóculo obtenían mayor biomasa, la mayor producción de PL se lograba con un inóculo del orden de $10^4$ – $10^5$ esporas/ml de medio de fermentación.

### 2.2.3. Efecto del pH inicial en la producción de pectinasas

Para decidir si el pH inicial hasta ahora utilizado (6,1) había sido el adecuado para la mayor producción de PL y menor producción PE , se realizaron dos fermentaciones por triplicado en las cuales se trabajó con una concentración de inductor (pectina) del 0.5% y un inóculo de $10^5$ esporas/ml de medio, variando el pH inicial del medio de cultivo a inocular.

Como se ve en la Figura 7, nuestra cepa mostró una producción de PL bastante pareja a distintos pH, aunque estadísticamente la actividad obtenida a pH 5,4 y 6,1 fue significativamente mayor que la obtenida a los otros dos pH. La PG mostró un claro óptimo de producción cuando el hongo crecía a un pH inicial de 6,1 mientras que la PE se produjo en mayor cantidad a pH 5,4 y 5,8.

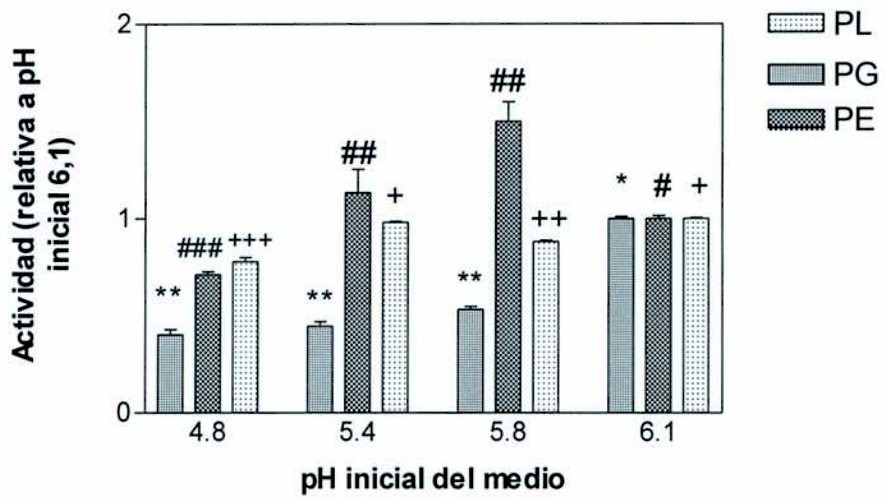



Figura 7: Efecto del pH inicial en la producción de pectinasas. Los grupos estadísticamente iguales ($p < 0,05\%$) se distinguen por tener igual cantidad de símbolos sobre las barras.

En vista de que a pH inicial de 6,1 se observó una de las mejores producciones de PL y un claro óptimo de PG, en tanto que no era uno de los máximos de producción de PE, se decidió trabajar en adelante con un pH inicial de 6,1.

En relación a lo observado en los puntos anteriores, se definieron las siguientes condiciones para realizar las fermentaciones en medio líquido utilizando un extracto a base de salvado de trigo 10%:

⇒ Concentración de inductor (pectina): 0,5%

⇒ Tamaño de inóculo: $10^5$ esporas/ml de medio

⇒ pH inicial de la fermentación: 6,1

## *2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN*

Se realizaron fermentaciones por triplicado en las condiciones definidas en el punto anterior para estudiar la variación de distintos parámetros de fermentación (pH, consumo de azúcares y proteínas) y la producción de enzimas y biomasa en el curso del tiempo.

### 2.3.1 Crecimiento fúngico y evolución del pH en el medio de fermentación

En la Figura 8, se muestra la evolución del pH en el medio y la producción de biomasa durante el transcurso de la fermentación.

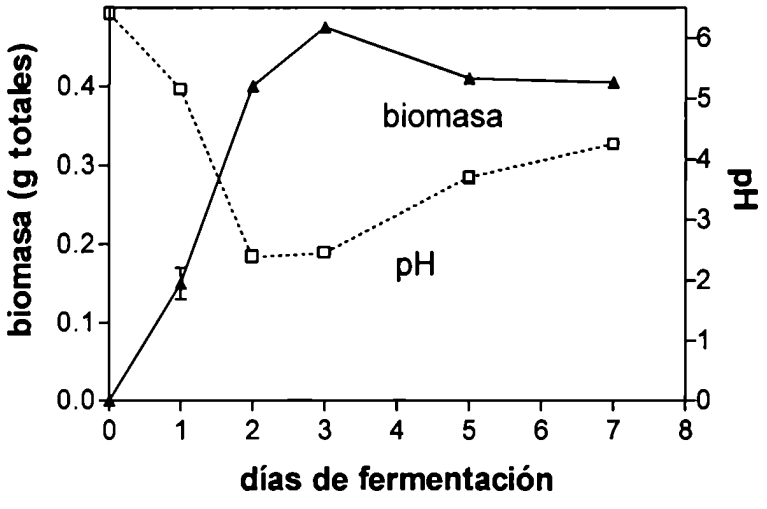



Figura 8: Desarrollo de biomasa (_▲_) y evolución del pH (---□---) en el tiempo de fermentación.

Se puede apreciar que a medida que aumentó la biomasa producida por el hongo, el pH bajó en forma inversa. Después del cuarto día de fermentación, el pH comenzó a subir coincidentemente con una pequeña disminución del micelio debida probablemente a la muerte celular.

La disminución del pH fue rápida durante los dos primeros días (de 6,2 a 2,2) manteniéndose en este valor un día más y comenzando luego a aumentar hasta llegar a 4,1 a los 7 días de fermentación. Se sabe que muchas cepas de *Aspergillus niger* son productoras de ácido cítrico (Ward, 1989), siendo éste uno de los metabolitos de interés económico que se obtiene por fermentación de estos hongos. Probablemente, la cepa de trabajo en las condiciones de estudio sea productora de este metabolito, por lo que se observa la disminución del pH. Friedrich y col (1994), por ejemplo, describen la síntesis simultánea de pectinasas y ácido cítrico por *Aspergillus niger* en

medio líquido, observando el descenso del pH de 5 a 2,5 en 60 horas de fermentación.

La ecuación logística es muy utilizada para caracterizar la cinética de crecimiento de microorganismos (Terebiznik, 1997) permitiendo identificar tres fases en el crecimiento: fase lag, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria.

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 + k.e^{(-\mu.t)}}$$

Donde: X(t) es la biomasa (g) al tiempo t

$X_{max}$: es la biomasa máxima (en la fase estacionaria)

$\mu$: es la velocidad específica de crecimiento ($h^{-1}$)

$k=X_0/X_{max} - 1$ ($X_0$= biomasa inicial)

El crecimiento del hongo, se modeló utilizando esta ecuación pese a la observación de muerte celular después del cuarto día de fermentación, ya que ya que a partir de ésta, se puede obtener la velocidad específica de crecimiento, parámetro de mucha utilidad en la caracterización de la cinética de crecimiento.

En la Figura 9, se muestra que el modelo logístico describe adecuadamente el crecimiento fúngico.

Los valores calculados para los parámetros de esta ecuación fueron los siguientes:

$X_{max}$: (0,4287 +/- 0,0118) g

K: 61,52 +/- 60,55

$\mu$: (0,146 +/- 0,041). $h^{-1}$.

$R^2$: 0,979

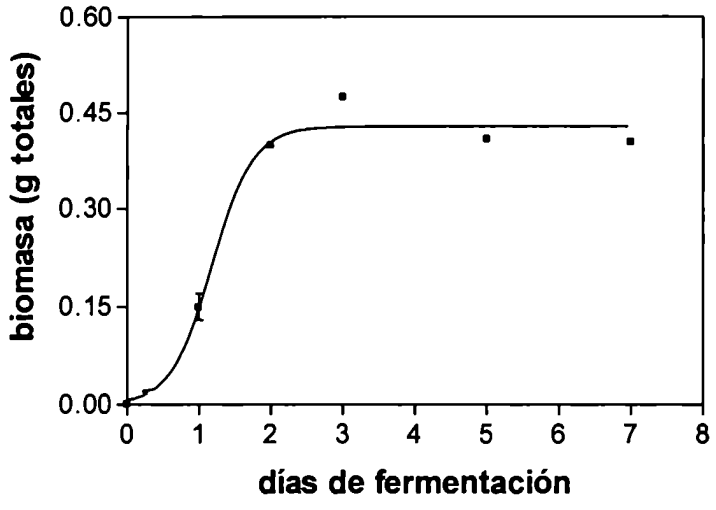



Figura 9: Cinética de crecimiento de la cepa *Aspergillus niger* 148. ■ Datos experimentales. ___ Ajuste al modelo logístico

Según lo que se observa en el gráfico, el crecimiento del hongo presentaría una fase lag (de adaptación al medio y germinación de esporas) de 12 horas. Luego continuaría una fase de crecimiento exponencial hasta las 48 horas ($\mu$: 0,146. $h^{-1}$). Finalmente, se entraría en la fase estacionaria a partir de los 2 días de fermentación.

### 2.3.2 Evolución de los azúcares reductores en el medio de fermentación

Este parámetro da una idea del consumo de nutrientes por parte del hongo y su evolución se muestra en la Figura 10. Se puede observar que existe un nivel basal de extremos reductores probablemente debido a la degradación parcial de la pectina y del almidón del salvado durante la esterilización del medio de fermentación.

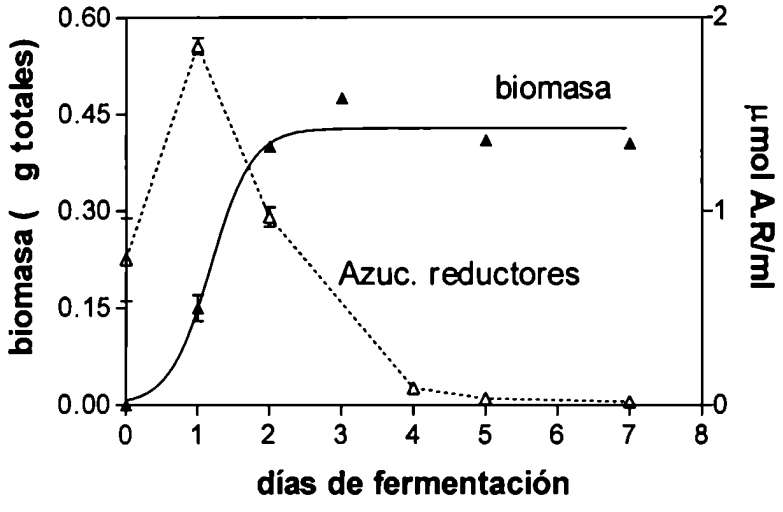



Figura 10: Evolución de biomasa y azúcares reductores en el medio de fermentación

En las primeras 24 horas de fermentación, el nivel de azúcares reductores aumenta a más del doble del inicial, probablemente por la acción de las enzimas secretadas en forma temprana por parte del hongo y por la baja tasa de consumo debido a que el hongo recién entra en la fase de crecimiento exponencial. Estos monosacáridos son incorporados al medio intracelular durante la fase de crecimiento exponencial, aumentando la biomasa. Por ello se observa el descenso del nivel de azúcares en los días subsiguientes en el medio extracelular (de 24 a 96 horas, coincidiendo con el establecimiento de la fase exponencial de crecimiento y el principio de la fase estacionaria). El agotamiento de azúcares en el medio externo coincide con la fase estacionaria de crecimiento.

El patrón de evolución de azúcares observado en el presente trabajo es muy similar al reportado por muchos autores: Aguilar y Huitrón, (1987) describen el mismo comportamiento para una cepa pectinolítica de *Aspergillus sp.* Solís Pereira y col. (1993) también reportan la existencia de un aumento en el nivel de azúcares a las 24 horas de fermentación, seguido de un descenso debido al consumo y crecimiento por parte de una cepa pectinolítica *de Aspergillus*

*niger*. Friedrich y col. (1994) observaron una evolución similar de azúcares reductores por una cepa de *Aspergillus niger* pectinolítica.

### 2.3.3 Evolución de las proteínas solubles en el medio de fermentación

Este parámetro es interesante porque da una idea de las tasas de consumo versus secreción de proteínas por parte del hongo.

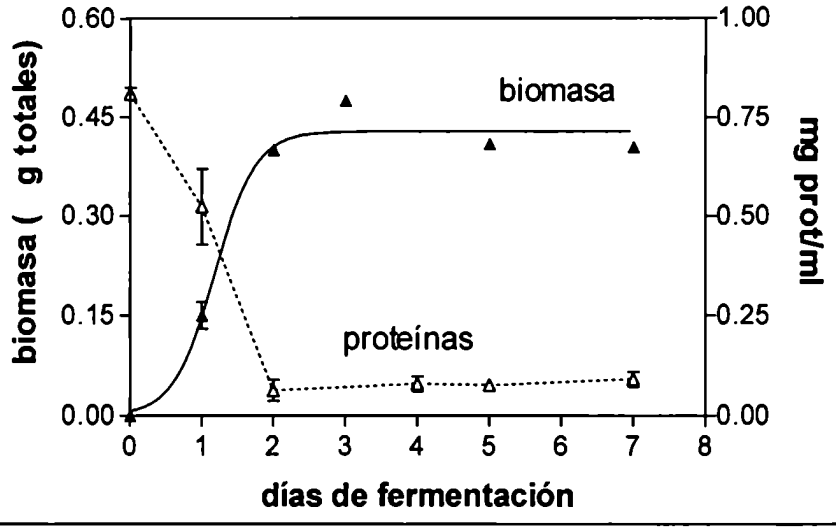



Figura 11: Evolución de biomasa y proteínas solubles en el medio de fermentación

En la Figura 11, se puede apreciar que el consumo de proteínas se correlaciona en forma directa con la curva de crecimiento del hongo, señalando que la mayoría de las proteínas incorporadas por el microorganismo son utilizadas como materia prima para proteínas intracelulares o de membrana. El hecho de que el nivel de proteínas solubles nunca llegue a cero, indica que hay producción de enzimas extracelulares. A partir de los 2 días de fermentación, la tasa de secreción de proteínas iguala a la tasa de incorporación de las mismas.

Friedrich y col (1994) trabajaron con una cepa pectinolítica de *Aspergillus niger* y partiendo de un medio mineral suplementado con suero de queso y pectina, reportan una primera fase de consumo de las proteínas del medio, seguida de un aumento en la cantidad de proteínas solubles debida al agotamiento de las proteínas aportadas por el suero y un consumo de las

sales de amonio como materia prima para sintetizar más proteínas. En nuestro caso, la fuente de nitrógeno para sintetizar proteínas y ácidos nucleicos está aportada por las proteínas y ácidos nucleicos presentes en el salvado. Al no estar suplementado el medio de fermentación con otras fuentes de nitrógeno, cuando las presentes son consumidas, no se observa ningún aumento subsiguiente de proteínas en el medio extracelular.

Probablemente, el establecimiento del régimen estacionario en el crecimiento después de las 48 horas del inicio de la fermentación, se deba al agotamiento de azúcares (Figura 10) y proteínas (Figura 11) en el medio externo.

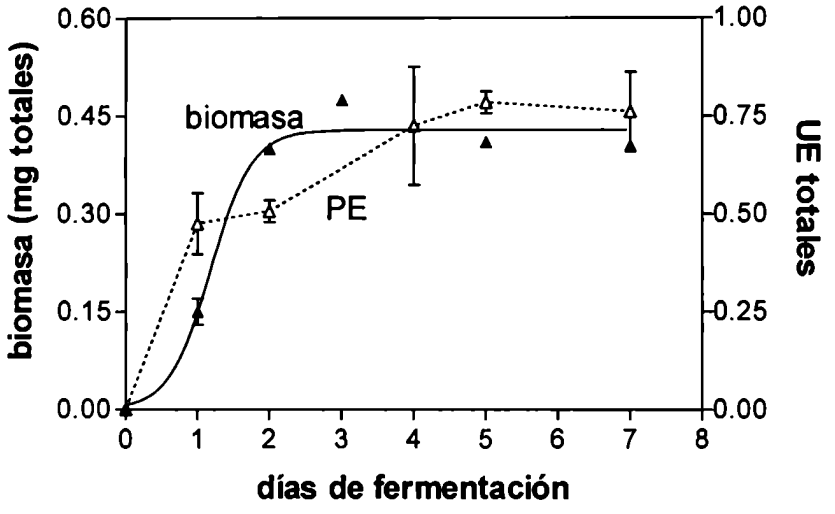
### 2.3.4. Producción de pectinasas

En la Figura 12, se muestra la evolución de las tres enzimas del complejo pectinolítico en el transcurso de la fermentación.

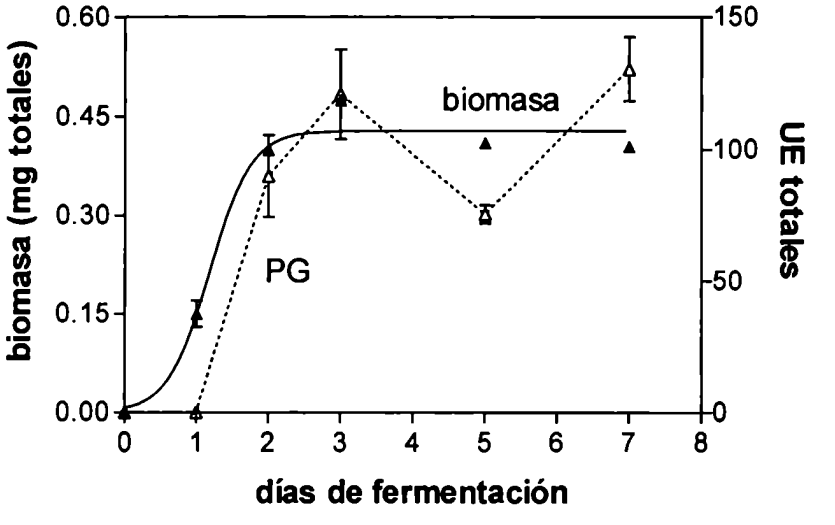
⇒ Actividad PE

La producción de pectinesterasa (Figura 12 a) muestra un comportamiento bifásico. La primera etapa de producción coincide con las fases lag y exponencial de crecimiento y probablemente es una isoforma diferente de la PE producida en la segunda fase (coincidente con el período estacionario de crecimiento). La primera isoforma sería constitutiva y la segunda, podría ser inducida por pH, productos de degradación de pectina, etc. También puede ocurrir que la producción de esta enzima requiera de los bajos pH a los que se llega depués del segundo día de fermentación.

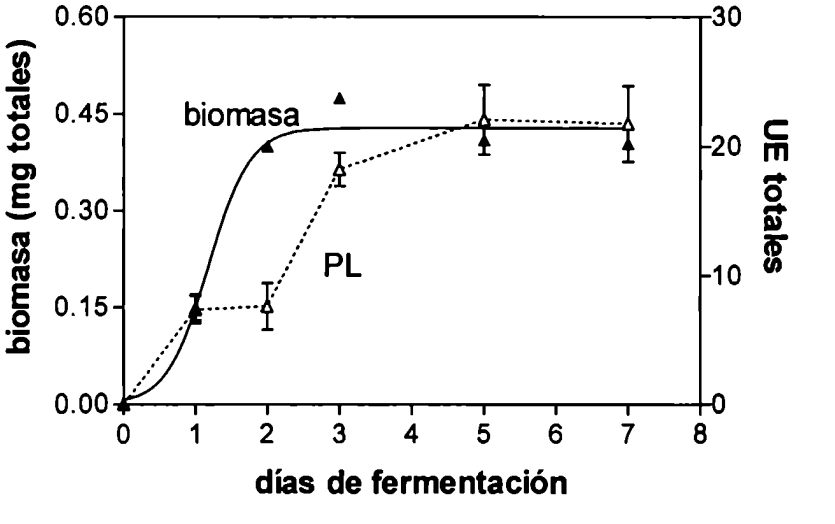
Maldonado y col (1989 b), también reportaron una curva bifásica de producción de PE por *Aspergillus niger* en medio líquedo y el establecimiento de la segunda fase de producción, también ocurría a las 48 horas de fermentación. La diferencia entre las dos fases de producción se veía afectada por las condiciones de cultivo, haciéndose casi indistinguible a bajas concentraciones de pectina (0,5%) en el medio. En cambio, Friedrich y col (1994), observaron que la producción de PE por *Aspergillus niger*




a)




b)




c)

Figura 12: Evolución de biomasa y producción de pectinasas en el curso de la fermentación. a) PE; b): PG; c) PL.

presentaba un pico entre los 4 y los 6 días de fermentación volviendo luego a los niveles más bajos de enzima previos. Estos autores también postulan la dependencia de la síntesis de pectinasa con el pH, ya que observan mayor productividad de enzimas en los momentos en los que el pH de fermentación es más bajo.

⇒ Actividad PG

La PG (Figura 12 b) se comenzó a producir más tardíamente que la PE, detectándose actividad recién a partir del segundo día de fermentación. En el caso de esta enzima, también se observó una curva bifásica, con una primera fase entre el segundo y quinto día de fermentación. En el final de esta fase se produjo una caída de la actividad PG detectada, tal vez por desestabilización o degradación. Una segunda fase comenzó después del quinto día. Posiblemente, como en el caso de la PE, se trate de dos isoformas que se sintetizan en función de distintas condiciones de crecimiento.

Aguilar y Huitrón, (1987) describieron la producción de PG por *Aspergillus sp* siguiendo una ecuación logística.

Maldonado y col (1989 b) reportaron el efecto de distintas concentraciones de pectina (de 0,5 a 2% m/v) en la producción de PG por *Aspergillus niger* informando curvas de producción temporal de forma logística con una fase lag mayor cuanto menor fuera la concentración de pectina inicial en el medio.

Blais y col, (1993) estudiaron el efecto de distintas fuentes de carbono y pectina en la producción de PG por *Fusarium oxysporum*, notando que las curvas de tiempo para la producción de esta enzima variaban enormemente según las diferentes condiciones de cultivo. Algunas curvas presentaron forma logística (si se usaba sacarosa o glucosa o paredes celulares de tomate) y otras, una etapa de aumento de producción seguida de una de descenso después de los 3 o 4 días de fermentación (si se usaba pectina cítrica o de manzana o ácido galácturónico). Solís Pereira y col (1993), observaron la misma variabilidad en las formas de las curvas de producción de PG por *Aspergillus niger* según se utilizaran distintas combinaciones de azúcares.

Friedrich y col. (1994) observaron la aparición de PG de *Aspergillus niger* después de 40 horas de fermentación, presentando la curva una forma logística (la fase estacionaria se alcanzaba a las 80 horas). Estos autores estudiaron tiempos de hasta 10 días de fermentación sin observar ninguna caída en la actividad PG.

Schmidt y col (1995) observaron una producción bifásica de PG por *Aspergillus niger* con una primera fase hasta el fin de la fase exponencial limitada por el crecimiento y una segunda fase posterior relacionada con la fase estacionaria en la que se agotaron las fuentes de carbono y no limitada por el crecimiento.

Loera y col (1999) trabajando con cepas de *Aspergillus niger* hiperproductoras de PG, observaron una caída en la actividad de esta enzima, después de las 72 horas de fermentación. Como estos autores limitaron el estudio hasta las 96 horas, no se puede determinar si hubieran observado un segunda etapa de producción de PG luego de la pérdida descripta.

⇒ Actividad PL

Esta enzima (Figura 12 c) fue claramente producida en dos fases, la primera comenzó tempranamente llegando a su máximo a las 24 horas de la fermentación y se mantuvo por 24 horas más. Al comenzar la fase estacionaria de crecimiento, comenzó la segunda etapa de producción de PL, la cual alcanzó su máximo a los 5 días de fermentación.

Como en los casos anteriores se puede postular la expresión de dos isoformas de la enzima en las distintas condiciones de fermentación (nutricionales, variacianes de pH y fisiología del crecimiento diferente en las fase estacionaria y exponencial).

Respecto a los datos bibliográficos sobre la producción temporal de esta enzima, Blais y col (1993) reportaron la producción de PL por *Fusarium oxysporum* comenzando a partir de las 36 o 60 horas de fermentación dependiendo de la fuente de carbono utilizada, siempre con una forma logística.

Friedrich y col. (1994), trabajando con *Aspergillus niger* crecido en presencia de 14% de sacarosa y ausencia de pectina, observaron una curva logística con un inicio de producción a las 48 horas de fermentación y el establecimiento del máximo a las 80 horas. En un trabajo anterior (1990), los mismos autores, ensayaron otras condiciones de cultivo (menor inóculo y presencia de pectina) detectando un máximo en la producción de la PL entre los 48 y las 96 horas de fermentación.
Mikhailova y col (1994) también observaron la producción de PL por parte de tres especies diferentes del género *Penicillium*, describiendo que esta enzima seguía una curva de producción logística paralela o levemente retrasada respecto de la biomasa.

En general, la bibliografía es muy amplia y se describen producciones enzimáticas con dos formas principales: logística y bifásica. La forma de la curva de producción depende en gran medida de las condiciones de cultivo, por lo que no puede generalizarse un patrón particular de crecimiento.
En el presente trabajo, las tres enzimas estudiadas presentan curvas bifásicas, por lo que puede postularse la activación de la expresión de determinadas isoformas en distintos momentos del cultivo.

## *2.4. EFECTO COMBINADO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA Y LA REPRESIÓN CATABÓLICA EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS*

### 2.4.1. Elección del depresor de $a_w$

En la introducción se discutió acerca del efecto de la actividad de agua ($a_w$) en el crecimiento y productividad enzimática de hongos, como uno de los factores preponderantes de la regulación de los procesos de fermentación.

En un proceso de fermentación en estado sólido (FES), por lo general la $a_w$ se regula controlando la humedad del sustrato. En un proceso en medio líquido, en cambio, se controla mediante la adición de solutos (sales, azúcares, alcoholes).

En la literatura existen numerosas evidencias de que el tipo de soluto tiene "per se" un efecto específico sobre el desarrollo microbiano o la producción de metabolitos, más allá del efecto generalizado que tiene sobre el descenso de la $a_w$.

Mildenhall y col (1981), estudiaron el crecimiento y la producción de PL por *Erwinia chrysanteml* a distintas $a_w$ utilizando NaCl, manosa, lactosa o glucosa como depresores de la $a_w$. El comportamiento observado respecto de la $a_w$, dependió del depresor utilizado.

Corry (1987) describió que la disminución de la $a_w$ redunda en una menor velocidad de crecimiento fúngico. Los resultados observados, sin embargo, dependieron del tipo de depresor estudiado. Por ejemplo, si el depresor podía ser utilizado como fuente de carbono (además de bajar la $a_w$), se observaba aumento en la producción de biomasa.

Grajek y Gervais (1987) estudiaron la producción de PG a distintas $a_w$ por *Trichoderma viridae* en FES utilizando glicerol, NaCl o sorbitol como depresores. Observaron que la producción de esta enzima era más sensible a la disminución de la $a_w$ si el depresor utilizado era sorbitol y era menos sensible, si se usaba glicerol.

Acuña Argüelles y col, (1994) estudiaron el efecto de distintos solutos depresores de la $a_w$, en la producción de PG por *Aspergillus niger* en FES, observando distintas respuestas según se usara, glicerol, sorbitol o etilenglicol.

Baxter y col, (1998), estudiando la producción de squalestinas por parte de hongos de la especie *Phoma*, observando distintas productividades y crecimientos a iguales $a_w$, según se usara glicerol o NaCl como depresor de $a_w$.

La elección del depresor de $a_w$ , por lo tanto, apuntó hacia algún compuesto que cumpliera los siguientes requisitos ( Mildenhall, 1981; Hahn-Hägerdal, 1986):

⇒ Que por su tamaño no pueda ingresar al medio intracelular (lo cual confundiría los efectos de $a_w$ bajo "per se" con los efectos de entrada de un metabolito); por ello quedaron descartados muchos depresores comúnmente utilizados (glicerol, NaCl, KCl, glucosa, fructosa, manosa)

⇒ Que sea inerte, es decir que no sea usado como fuente de energía por el microorganismo, y que no induzca ni reprima la síntesis de la enzima a estudiar. Por ello quedaron descartados alcoholes monoméricos y mono, di y polisacáridos.

⇒ Que sea soluble en agua

⇒ Que no afecte la actividad de la enzima extracelular

El metabolito de elección fue el Polietilenglicol 200 ($PEG_{200}$), un polialcohol que cumple con las características requeridas.

Para corroborar el último punto se realizó el ensayo que se detalla a continuación.

### 2.4.2. Efecto del $PEG_{200}$ "per se" sobre la actividad pectinolítica

Previo a la realización de las fermentaciones con $PEG_{200}$, se evaluó si el mismo afecta "per se" a la actividad enzimática. Para ello, se agregaron a un extracto de actividad conocida, distintas cantidades de $PEG_{200}$ para obtener extractos de $a_w$ entre 0,993 (sin $PEG_{200}$) y 0,956 (25g $PEG_{200}$/100 ml de extracto) y a éstos se les midió la actividad de las enzimas PE, PG y PL.

Los resultados de la Figura 13 muestran que:

⇒ La actividad de pectinliasa no fue afectada por el $a_w$ en los intervalos estudiados a un 95% de confianza.

⇒ La actividad poligalacturonasa sólo fue afectada significativamente por un $a_w$ de 0,956, disminuyendo en un 10% su actividad. Por ello si se

trabajara a esa $a_w$ habría que corregir la actividad medida en un 10% a fin de hacer comparables los resultados a todas las $a_w$.

⇒ La actividad pectinesterasa fue la que mostró una respuesta más compleja ya que su actividad aumentó significativamente (un 13%) a $a_w$ 0,983 y 0,973 con respecto al control ($a_w$ 0,993), y disminuyó significativamente un 22% a $a_w$ 0.968 y un 78% a $a_w$ 0.956 con respecto a dicho control. Por ello FUE necesario realizar las correcciones pertinentes a estas $a_w$ en el estudio de esta enzima.

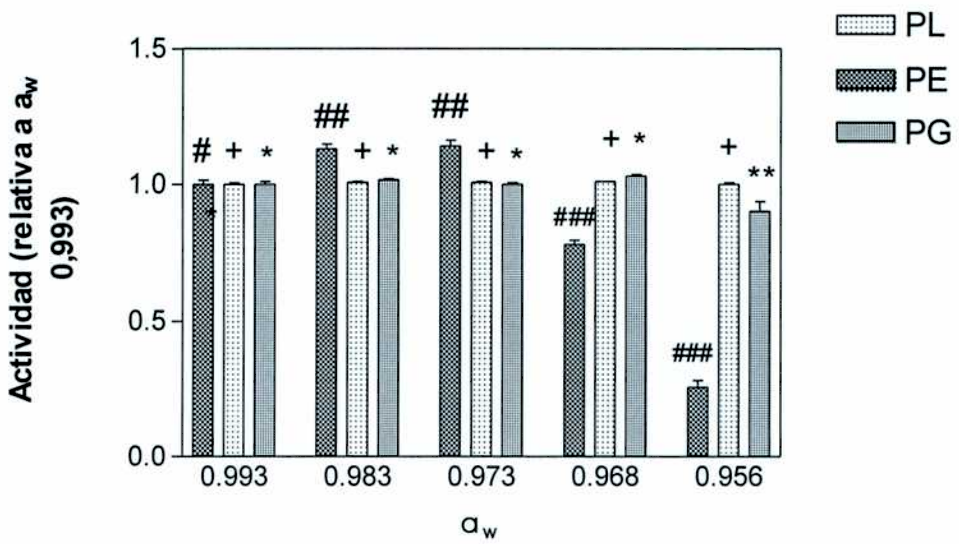



Figura 13: Efecto del $PEG_{200}$ (depresor de $a_w$) en la actividad de pectinasas. la cantidad de símbolos sobre las barras indica los grupos que no tienen diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$). ($a_w$ 0,993: sin $PEG_{200}$)

### 2.4.3. **Represión catabólica de pectinasas por glucosa**

El fenómeno de represión catabólica involucra la inhibición de la expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas con el aprovechamaento de fuentes de carbono complejas, cuando en el medio de fermentación existen fuentes de carbono fácilmente utilizables (por ejemplo monosacáridos como la glucosa) (Gaucedo, 1992). Este fenómeno permite que los microorganismos se adapten y aprovechen con efectividad

los cambios en fuentes de carbono que ocurren durante la fermentación en el medio de crecimiento.

El metabolito más estudiado como represor catabólico es la glucosa (Frietcher y col, 1987; Ward, 1989; Gaucedo, 1992; Mac Kenzie y col, 1993).

El efecto de la glucosa como represor depende de la cepa y la enzima. Habitualmente, en presencia de glucosa, se observa menor cantidad de ARN mensajero correspondiente a la polisacaridasa estudiada, lo cual reflejaría una disminución en la transcripción del gen involucrado o una disminución de la vida media de dicho ARN mensajero (Gaucedo, 1992). También puede ocurrir que se afecte la traducción de la enzima (Maldonado y col, 1989 a).

En general se postula que la glucosa alteraría la conformación de una proteína regulatoria (algunas de las cuales como CREA, CREB o CREC están clonadas) que afectaría directamente la transcripción del gen, la traducción del mensajero o activaría una cascada regulatoria. Este mecanismo estaría mediado por AMPc (Gaucedo, 1992; Mc Kenzie, 1993).

Existe una gran cantidad de enzimas reprimibles por glucosa y hay amplia bibliografía al respecto (amilasas, celulasas, pectinasas, glucosidasas, etc) (Crueguer y Crueger, 1989; Ward, 1989; Scragg, 1990; Mc Kenzie, 1993 ).

Respecto de la represión catabólica de pectinasas por distintas fuentes de carbono y en especial por glucosa, también existen numerosos reportes.

Aguilar y Huitrón, (1987) observaron la inhibición de la síntesis de PG en presencia de glucosa 0,5%, pero ésta no se produjo con 0,1 % de glucosa.

Maldonado y col, en una serie de trabajos (1986; 1989 a y b; 1998) con una cepa pectinolítica de *Aspergillus niger,* reportaron la represión de PE y PG por agregado de distintas concentraciones de glucosa (de 0,5 a 2%) en una forma dependendiente de la concentración (a mayor concentración de glucosa, mayor fue el efecto represor). También demostraron que el efecto represor de la glucosa se producía a nivel de la traducción.

Brumano y col (1993) observaron que el agregado de 0,1% de glucosa al medio de fermentación de *Penicillium griseorosseum*, reducía la producción de PL a la mitad, si bien la biomasa producida aumentaba al doble.

Solís Pereira y col (1993) reportaron un retardo en la aparición de PG producida por *Aspergillus niger*, cuando agregaban glucosa 3% al medio de fermentación. Este retardo se debía a que la síntesis de PG comenzaba recién cuando la glucosa del medio era consumida.

Mikhailova y col (1994) describieron la represión de PL por glucosa, observando que el grado de represión de la enzima se hallaba directamente relacionado con la concentración de glucosa utilizada (testearon concentraciones de glucosa de 0,25 a 2%). Los mismos resultados se observaron en tres especies del género *Penicillium*. También en este caso la glucosa resultó la fuente más eficiente para la producción de biomasa. La represión de la síntesis de PL era revertida con el agregado de AMP cíclico (AMPc) sugiriendo que este segundo mensajero estaría involucrado en el mecanismo de represión/inducción.

### 2.4.4. Efecto combinado de la $a_w$ y la glucosa en la evolución de la fermentación

Es un fenómeno conocido, que frente a situaciones de stress, cambia la composición fosfolipídica de la membrana plasmática de muchos microorganismos (Lehninger, 1983).

Para el caso del crecimiento fúngico a actividades de agua bajas, diversos autores reportan que la composición fosfolipídica de la membrana se ve afectada por la $a_w$ del medio en el que éste crece.

Charlang y Horowitz (1994) describieron cambios en la fluidez de la membrana de *Neurospora crassa* como respuesta a la disminución de $a_w$. Lesage y col (1992) también observaron este fenómeno para *Eurotium chevalieri*. En general, la disminución de la $a_w$, redundaba en la disminución de la fluidez de la membrana plasmática.

Por otro lado , Acuña Argüelles y col (1994), reportaron la acumulación de azúcares reductores en el medio extracelular durante el crecimiento de *Aspergillus niger* por fermentación en sustrato sólido a bajas $a_w$. Esto sugeriría

limitaciones en el transporte a través de la membrana como consecuencia de la disminución de la $a_w$.

Maldonado y col (1998), observaron diferencias en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana de *Aspergillus niger*, según el hongo creciera en medio líquido o sólido. Observaron menor fluidez en la membrana plasmática del hongo crecido por FES (menor $a_w$ ) que en FEL.

Bajo la hipótesis de que el transporte de glucosa al medio intracelular podría verse afectado por la $a_w$ del medio y por lo tanto podría afectar la acción de la glucosa como represor catabólico, se estudió su efecto (concentración de glucosa 0,7% en medio líquido) a dos $a_w$ diferentes (0,993 y 0.968). Las variables estudiadas fueron la producción de las tres enzimas (PE, PG, PL), el crecimiento del hongo, la evolución del pH, el consumo de azúcares y la evolución de proteínas solubles en el medio de fermentación.

**Efecto de la $a_w$ y la glucosa en la producción de biomasa**

Morfológicamente, se observaron diferencias de tamaño entre los pellets de los hongos crecidos a alta y baja aw. Estos fueron de mayor tamaño en los medios sin PEG y de menor tamaño en los medios con PEG.

La producción de biomasa en las distintas condiciones se muestra en la Figura 14.

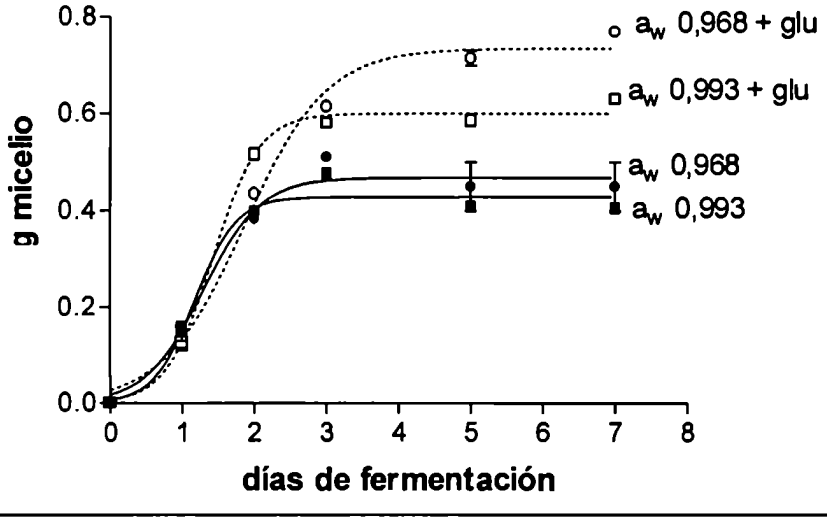



Figura 14: Producción de biomasa por *Aspergillus niger* 148 en distintas condiciones de fermentación. (glu: 0,7% m/v)

En todos los casos la ecuación logística describió bien las curvas de crecimiento, cuyos parámetros se detallan en la Tabla 1:

| Condición | Duración | μ (h⁻¹) | Fase | Biomasa | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| $a_w$ 0,993 | Menos de 24 horas | 0,160 +/- 0,042 | A partir de 2 días | 0,4287 +/- 0,0118 | 0,979 |
| $a_w$ 0,993 + glucosa 0,7% | Menos de 24 horas | 0,130 +/- 0,011 | A partir de 2,5 días | 0,6002 +/- 0,0087 | 0.995 |
| $a_w$ 0,968 | Menos de 24 horas | 0,105 +/- 0,026 | A partir de 2,5 días | 0,4682 +/- 0,0191 | 0,957 |
| $a_w$ 0,968 + glucosa 0,7% | Menos de 24 horas | 0,073 +/- 0,007 | A partir de 4 días | 0,7354 +/- 0,0156 | 0,991 |

Tabla 1: Efecto de las distintas condiciones de fermentación en la cinética de crecimiento de la cepa *Aspergillus niger*148

En general se observó mayor producción de biomasa en presencia de glucosa tanto a $a_w$ bajas como altas, lo cual era esperable ya que este azúcar es una fuente de energía altamente aprovechable.

Este aumento de producción de biomasa en presencia de glucosa es mucho más notorio a bajas $a_w$ (70% más de biomasa máxima a $a_w$ 0,968 en presencia de glucosa contra 50% más a $a_w$ 0,993). Esto indicaría la existencia de sinergismo entre la $a_w$ baja y la presencia de glucosa, fenómeno que podría deberse a que a $a_w$ bajas, cambiase la composición de la membrana plasmática. Por esta razón, el pasaje de sustancias a través de la membrana podría ser diferente pudiendo aprovecharse mejor la glucosa presente.

La presencia de glucosa tendió a enlentecer la velocidad de crecimiento, como se ve reflejado en el parámetro μ, tanto a $a_w$ 0,993 como 0,968, si bien la biomasa máxima alcanzada fue mayor en presencia de glucosa.

El crecimiento del hongo no se vió afectado por la disminución de $a_w$ de 0,993 a 0,968 en cuanto a la biomasa final producida en ausencia de

glucosa. En cambio, tanto en presencia como en ausencia de glucosa, la disminución de la $a_w$ aumentó la duración de la fase exponencial y disminuyó la velocidad de crecimiento ($\mu$). Un crecimiento más lento en respuesta a la disminución de la $a_w$ ha sido reportado como una respuesta común en muchos hongos.

Sarrette y col (1992) observaron la producción de menor biomasa a menor $a_w$ por *Rhizopus oligosporus* utilizando glicerol como depresor. Este efecto era más notorio a tiempos de 46 horas de fermentación que a 28 horas ya que a tiempos tan cortos el hongo aún estaba en la fase lag. En nuestro caso, las diferencias en crecimiento también se observaron despues de 2 días de fermentación.

La ecuación de regresión obtenida utilizando un diseño factorial 2^2 para la producción máxima de biomasa fue la siguiente:

$$\text{Biomasa máx.} = 0{,}5575 + 0{,}1025.[glu] - 0{,}025.a_w.[glu] \qquad R^2=0{,}995$$

Se observa que la presencia de glucosa es la variable que más influencia el crecimiento del hongo (mayor coeficiente) y su efecto es de aumentar la producción de biomasa (coeficiente positivo). También se observa una interacción significativa entre ambas variables que al ser negativa indica que a mayores $a_w$, menor es el efecto de la glucosa en la producción de biomasa. Esto es justamente lo que se observó experimentalmente.

También se realizó la regresión para la velocidad de crecimiento ($\mu$), obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\mu = 0{,}117 - 0{,}016.[glu] + 0{,}028.a_w \qquad R^2=0{,}916$$

De esta regresión, puede interpretarse que la velocidad de crecimiento se ve afectada por la $a_w$ y la presencia de glucosa pero no hay interacción entre estas dos variables. El efecto de la glucosa en el medio es de disminuir la

velocidad de crecimiento durante la fase exponencial (como se observa en su coeficiente negativo) pese a que la biomasa final producida es mayor.
En cambio, el efecto de la $a_w$ en la velocidad de crecimiento es positivo y mayor que el de la glucosa. Esto indica que cuanto mayor sea la $a_w$, más rápidamente crecerá el hongo durante la fase exponencial y el efecto de este parámetro en el crecimiento es más importante que el efecto de la presencia de glucosa.
En general, como se discutió más arriba, con la presencia de glucosa en el medio de fermentación se obtiene mayor biomasa. No hay reportes que indiquen el efecto en la velocidad de crecimiento exponencial.
En cambio, el efecto de la disminución de la $a_w$ descripto en la literatura es la disminución en la velocidad de crecimiento. Mildenhall y col, (1981) observaron una disminución de $\mu$ con la disminución de $a_w$ utilizando diversos depresores en *Erwinia chrysanteml.* Beever y Laracy (1986), observaron el mismo fenómeno para *Aspergillus nidulans*. Corry (1987), describió el efecto de la disminución de la $a_w$ en el crecimiento fúngico en general. Pese a que el efecto depende del represor y el hongo estudiados, en general el crecimiento disminuye a menores $a_w$. Ramakrishna y col (1993) describieron el efecto de la disminución de $a_w$ como enlentecedor del crecimiento, para varios hongos contaminantes de cereales.

**Evolución del pH**

En la Figura 15 se muestra la evolución del pH de las fermentaciones en el tiempo y se puede apreciar que la tendencia es inversa a la producción de biomasa, debido probablemente a la producción de ácido cítrico. Es sabido que el hongo *Aspergillus niger* es en muchos casos un excelente productor de ácido cítrico. De hecho, se lo usa industrialmente como productor de este metabolito (Bigeli, 1987; Crueger y Crueger, 1989; Ward, 1989; Friedrich, 1992; Sato y Sudo, 1999).

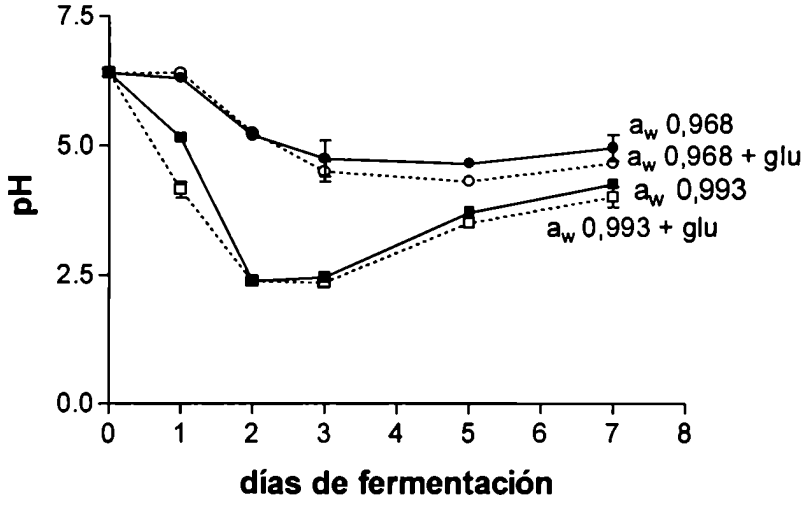



Figura 15: Evolución del pH en el medio de fermentación. (glu: 0,7% m/v)

Se observa que el descenso del pH es mucho más marcado a las $a_w$ más altas. Esto puede deberse a que la producción de metabolitos ácidos sea mayor a $a_w$ altas o al efecto buffer del $PEG_{200}$ "per se".

Se ve claramente que la variación del pH está asociada a la $a_w$ de la fermentación y no a la presencia de glucosa.

**Evolución de proteínas solubles**

Como se observa en la Figura 16, en todos los casos es mucho más rápido el consumo que la secreción de proteínas, sobre todo a tiempos cortos (las primeras 48 horas) en los cuales el cultivo se encuentra en fase exponencial. Entre las 72 y 96 horas de fermentación se llega a un equilibrio entre consumo y secreción de proteínas en todos los casos.

Si se comparan los sistemas con y sin agregado de glucosa, se observa que en presencia de glucosa las proteínas se consumen mucho más rápidamente y el nivel de equilibrio entre entrada y salida de proteínas es mucho más bajo, lo cual es coherente con el mayor crecimiento observado.

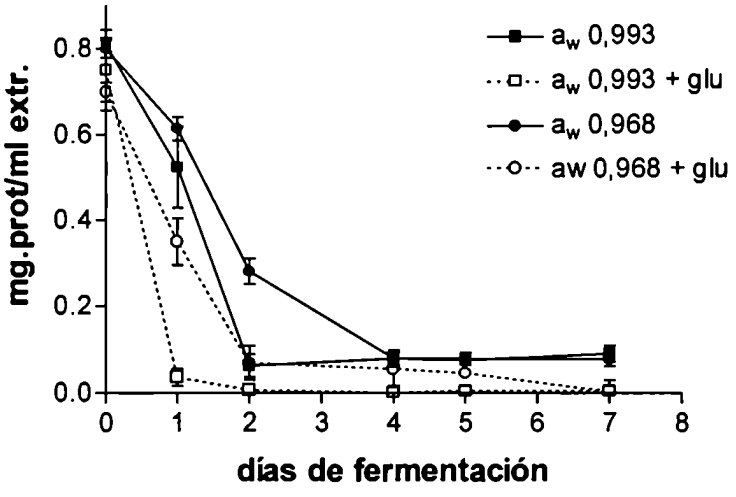



Figura 16: Evolución de las proteínas solubles en el medio de fermentación. (glu: 0,7% m/v)

Con respecto al efecto del $a_w$, se observa nuevamente un retardo en el consumo de proteínas a menores $a_w$ tanto en presencia como en ausencia de glucosa. Esto podría deberse a las alteraciones en la membrana celular que se producen por el shock osmótico a $a_w$ bajas, como ha sido explicado anteriormente. Por otro lado, ya se ha visto que a baja $a_w$, el crecimiento fue más lento y la fase de crecimiento exponencial, más larga. Por esta razón, la incorporación de proteínas al medio intracelular puede verse retrasada respecto al hongo crecido a mayor $a_w$.

**Evolución de los azúcares reductores en el medio de fermentación**

La importancia de éste parámetro reside en que refleja un balance entre el consumo (disminución en la cantidad de azúcares reductores) y la degradación de polisacáridos del medio (aumento de extremos reductores libres) debido a las enzimas extracelulares producidas.

En la Figura 17 se aprecia que hay más acumulación de azúcares reductores en el medio extracelular a bajas $a_w$ (tanto en ausencia como en presencia de glucosa). Esto podría estar relacionado a la menor $\mu$ que se observa a bajas $a_w$.

Acuña Argüelles (1994) describió la acumulación de azúcares reductores en el medio extracelular como consecuencia de la depresión de la $a_w$, sugiriendo limitaciones en el transporte de azúcares a través de la membrana a $a_w$ bajas.

En el caso de las fermentaciones sin glucosa, se observa un aumento de los azúcares reductores en el medio a las 24 horas de fermentación, (que probablemente coincide con la degradación de polisacáridos para su posterior incorporación). Este aumento es seguido de un descenso de extremos reductores (seguramente debido a la incorporación de los monosacáridos).

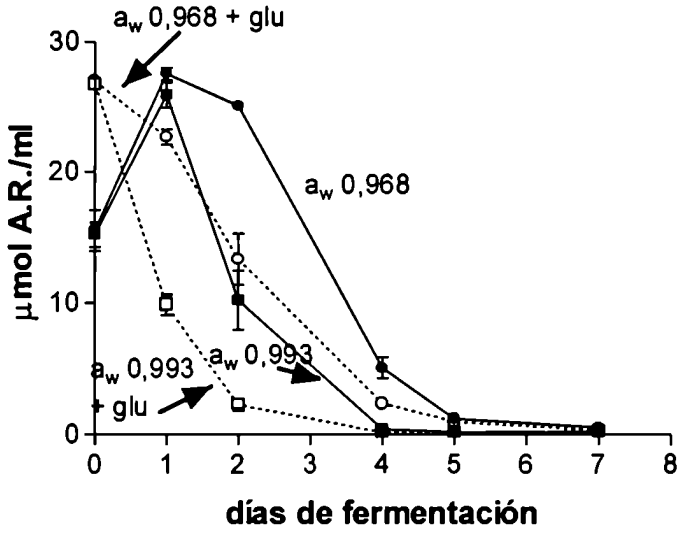



Figura 17: Evolución de los azúcares reductores en el medio en las distintas condiciones de fermentación. (glu: 0,7% m/v).

Se observa que la fase estacionaria comienza cuando baja el nivel de azúcares en el medio de fermentación. Esto es lógico ya que habiendo limitaciones en la existencia de fuentes de energía, la tasa de crecimiento disminuye.

Cuando existe glucosa en el medio de fermentación, no se observa un aumento de los azúcares reductores respecto del nivel inicial sino que éstos son consumidos muy rápidamente. La degradación de los polisacáridos del medio a tiempos cortos (0 – 2 días) no se produce por la ausencia de síntesis de polisacaridasas por represión catabólica o se produce simultáneamente

al consumo de glucosa, y los monosacáridos generados por esta degradación también son consumidos velozmente. Es por esto que a las 24 horas ($a_w$ 0,993) o a las 48 horas ($a_w$ 0,968), se ha consumido más de la mitad de los azúcares del medio. Este mayor consumo de azúcares en los medios que contienen glucosa, se relaciona también con la mayor producción de biomasa observada (Figura 14).

**Producción de PL**

Se puede apreciar en la Figura 18 que la glucosa a altas $a_w$ enlenteció la producción de PL durante la primera fase de producción de la enzima (0 – 2 días), pero a tiempos mayores no se observaron diferencias significativas. Esto indicaría que la PL producida en la fase exponencial es parcialmente reprimida por glucosa, mientras que la PL producida en la fase estacionaria o no es reprimida por glucosa o ésta ya fue consumida por el hongo por lo que no se apreciarían diferencias.

Brumano y col. (1993) reportaron la represión catabólica de PL por 0,1% de glucosa en *Penicillium griseoroseum* crecido por fermentación sumergida. Los autores obtuvieron un 60% más de biomasa en presencia de glucosa, pero la producción de PL fue la mitad.

Mikhailova y col, (1994) describieron la represión de la síntesis de esta enzima por glucosa en tres especies del género *Penicillium*, pese al mayor crecimiento obtenido. El grado de inhibición de la producción de PL por glucosa era dependiente de la concentración y se revertía con cAMP. Tanto la pectina obtenida de distintas fuentes, como el ácido galacturónico fueron excelentes inductores de la síntesis de PL. Los autores demostraron la existencia de distintas isoformas de PL, algunas constitutivas y otras inducibles por pectina; algunas de estas últimas dejaban de sintetizarse en presencia de glucosa y otras no.

A bajas $a_w$, la glucosa estimuló la producción de PL a tiempos largos (2 – 6 días) y no presentó efecto a tiempos cortos.

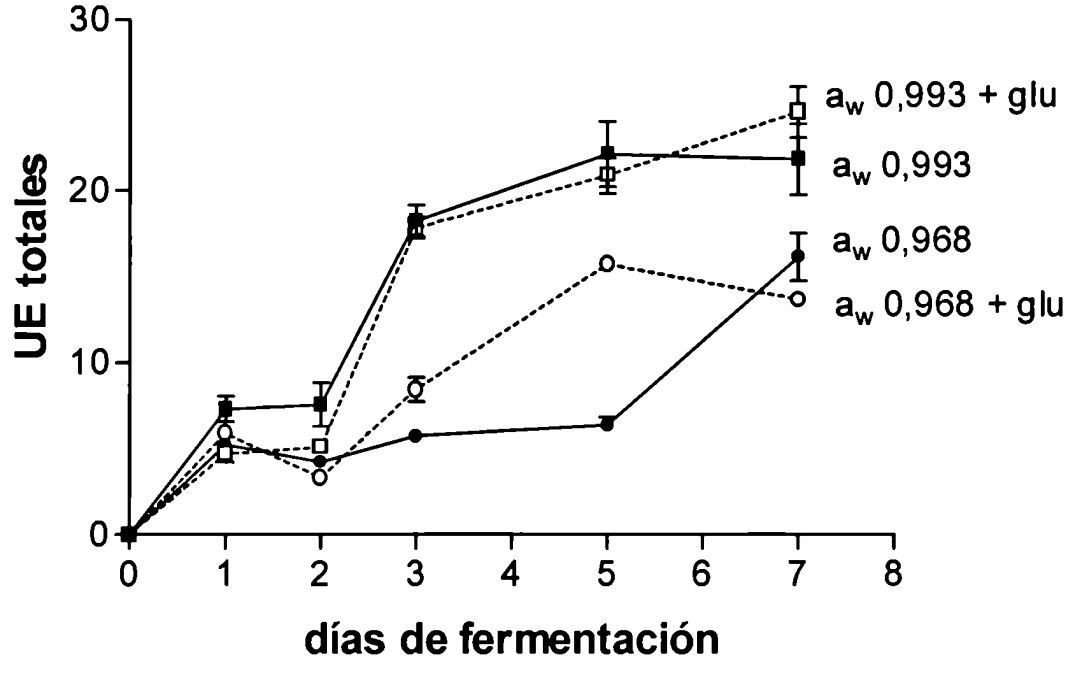



Figura 18: Producción de actividad PL en las distintas condiciones de fermentación. (glu: 0,7% m/v)

La glucosa, entonces presentó un efecto diferente a las dos $a_w$ estudiadas. Reprimió aproximadamente en un 30% la síntesis de PL secretada durante la fase exponencial a alta $a_w$ y estimuló la síntesis de la PL secretada durante la fase estacionaria a bajas $a_w$ (la mayor producción de biomasa en presencia de glucosa no alcanza para explicar la mayor PL observada).

Repecto del efecto de la $a_w$, se puede ver que la producción de PL fue mayor a $a_w$ altas (especialmente de la PL secretada más tardíamente), por lo tanto, éste es un factor a tener en cuenta para aumentar la producción de esta enzima en fermentación sumergida.

Este efecto puede deberse a la $a_w$, a la mayor disminución de pH observada a $a_w$ 0,993 o a ambos motivos. La llegada al mínimo pH a los 2 días de fermentación podría disparar la producción de la segunda forma de PL.

Baracat Pereira y col, (1994) sugierieron que el pH podría regular la síntesis de PL por *Penicillium griseoroseum* en FEL ya que obtuvieron mayor producción de esta enzima en los sistemas en los que la disminución del pH en el tiempo fue mayor.

Friedrich y col (1994), también obtuvieron mayor síntesis de PL por *Aspergillus niger* en los sistemas en los que el pH disminuía más.
La menor PL observada a menores $a_w$, podría deberse a una inhibición de su síntesis por el pH, o a dificultades en el transporte de la enzima al medio extracelular.

Se realizó la regresión para la producción máxima de PL obteniéndose la siguiente ecuación:

Act. Máx. PL = 19,02 + 4,15.$a_w$ $R^2$ =0,918

Según esta expresión, la presencia de glucosa no altera la cantidad máxima de PL que puede ser obtenida (la ecuación no contempla el factor tiempo, con lo que no se refleja que en presencia de glucosa se demora distinta cantidad de tiempo en obtener esa producción de PL).
El coeficiente de regresión positivo para la $a_w$, refleja que la producción máxima de PL se ve favorecida por altas $a_w$.

**Producción de PE**

La Figura 19 muestra la producción de PE en el tiempo para las distintas condiciones de fermentación.
El efecto de la glucosa a $a_w$ altas se observó en el retraso en la producción de PE a tiempos cortos (antes de los 2 días). Este comportamiento es similar al observado para PL. Sin embargo, a $a_w$ bajas, la glucosa actuó como un poderoso represor de la PE, reduciendo en aproximadamente 65% la producción de esta enzima en forma sostenida en el tiempo.

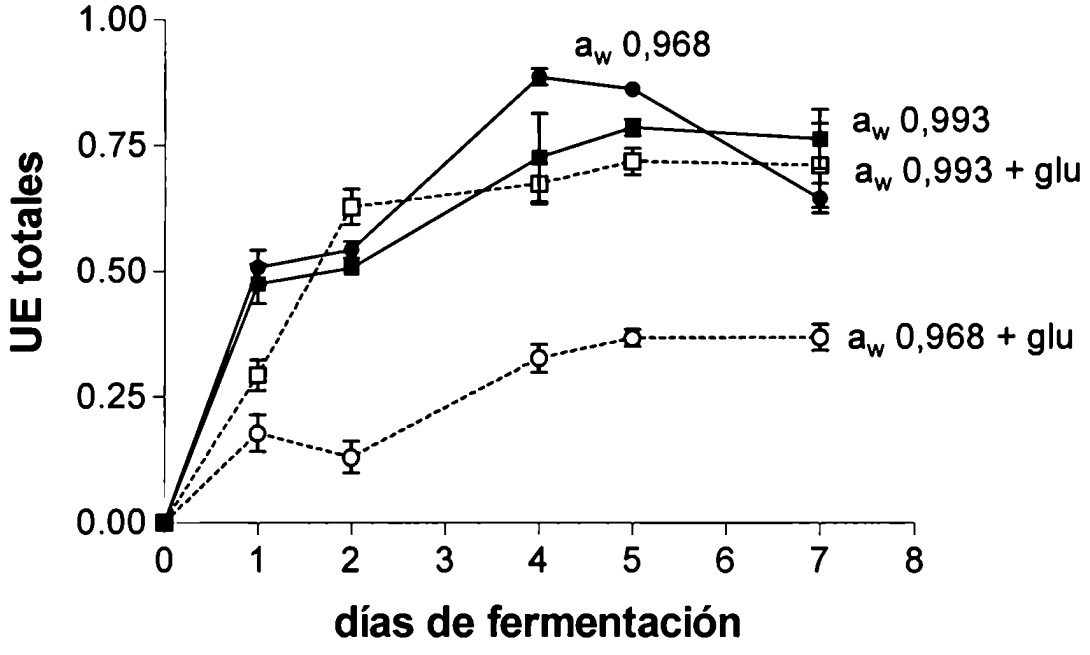



Figura 19: Producción de PE en el tiempo para las distintas condiciones de fermentación. (glu: 0,7% m/v).

Maldonado y col (1989 a y b, 1998) reportaron represión catabólica de PE producida por una cepa de *Aspergillus niger* crecida por fermentación sumergida (0,5 – 2% de glucosa) pero no estudiaron el efecto de la $a_w$ ni reportaron la actividad de agua del sistema en el que trabajaron. El grado de represión estaba directamente relacionado con la cantidad de glucosa en el medio, y a medida que ésta se consumía, la cantidad de PE producida era la misma en ambas condiciones. Esto explicaría por qué a partir de los dos días de fermentación, se observó similar cantidad de PE para los medios con y sin glucosa a $a_w$ 0,993.

La siguiente ecuación describe la máxima producción de PE en función de la glucosa y la actividad de agua:

$$\text{Act. Máx. PE} = 0{,}69 + 0{,}05.a_w - 0{,}147.\,[\text{glu}] + 0{,}11.a_w.[\text{glu}] \qquad R^2 = 0{,}982$$

Se observa que la variable de más peso en la producción de PE es la presencia de glucosa (mayor coeficiente) y que influencia de modo negativo (en presencia de glucosa, menor actividad máxima de PE lograda).

La $a_w$ es la variable que menos afecta la producción de PE, y al ser positiva indica que a mayor $a_w$, mayor es la actividad máxima de PE que se puede obtener. Por otro lado, el término de interacción es importante y positivo, lo que indica que hay sinergismo entre las dos variables en la obtención de la máxima actividad de PE.

**Producción de PG**

En la Figura 20, se puede ver que a $a_w$ altas, la producción de PG es bifásica y la PG producida tempranamente está retrasada en presencia de glucosa con respecto a la producción en ausencia de glucosa. Sin embargo, las producciones máximas obtenidas en fase estacionaria no son diferentes.

Maldonado y col (1989 a y b) reportaron un retraso en la producción de PG por *Aspergillus niger* por FEL en presencia de glucosa. Este retraso se debía a la inhibición de la traducción de los mensajeros de la enzima mientras la glucosa se encontraba en el medio, pero una vez que ésta se consumía, el patrón de producción de PG era similar en ambas condiciones de fermentación. Solís Pereira y col (1993), también observaron un retraso en la producción de PG por *Aspergillus niger* en presencia de glucosa 3%, llegándose a niveles similares en ambas condiciones de fermentación pero en distintos momentos. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo a $a_w$ 0,993.

A bajas $a_w$, el efecto de la glucosa es el de estimular en forma muy importante la producción de la enzima secretada tempranamente (2 días). A tiempos más largos (5 – 7 días), sin embargo, la producción en ausencia o presencia de glucosa se asemeja.

Solís Pereira y col (1993), y Maldonado y col, (1998) estudiaron la producción de PG por *Aspergillus niger* en fermentación líquida y sólida. Ambos autores observaron que la glucosa en el medio líquido actuaba como represor de la síntesis de la enzima, mientras en medio sólido, la estimulaba. Teniendo en cuenta que una de las principales diferencias entre ambas tecnologías de fermentación es que la $a_w$ en FES es mucho menor que en FEL, esto explicaría el pico observado a bajas $a_w$ en presencia de glucosa (hasta 2 días de

fermentación). Es probable que el mecanismo de regulación de la producción de PG sea diferente en distintas condiciones de crecimiento y por ello se observen estas diferencias.

Respecto del efecto de la $a_w$, no se observaron diferencias importantes entre $a_w$ 0,993 y 0,968, lo cual no coincide con los reportes previos de producción de PG en medio sólido por *Trichoderma viridae* (Grajek y Gervais, 1987); *Rhizopus oligosporus* (Sarrete, 1992) y *Aspergillus niger* (Acuña Argüelles, 1994) en los que se describe la menor producción de PG a $a_w$ bajas. Las diferencias entre lo observado por estos autores y en el presente trabajo pueden deberse al uso de diferentes depresores de $a_w$ (en los trabajos arriba mencionados se utilizó glicerol, sorbitol y/o etilenglicol y en este, $PEG_{200}$) o a la diferente tecnología de fermentación que utilizaron estos autores (FES y en este trabajo, FEL). Solís Pereira y col (1993) y Maldonado y col (1998), demostraron que la síntesis de pectinasas por *Aspergillus niger* era regulada en forma diferente en fermentación en medio líquido o sólido.

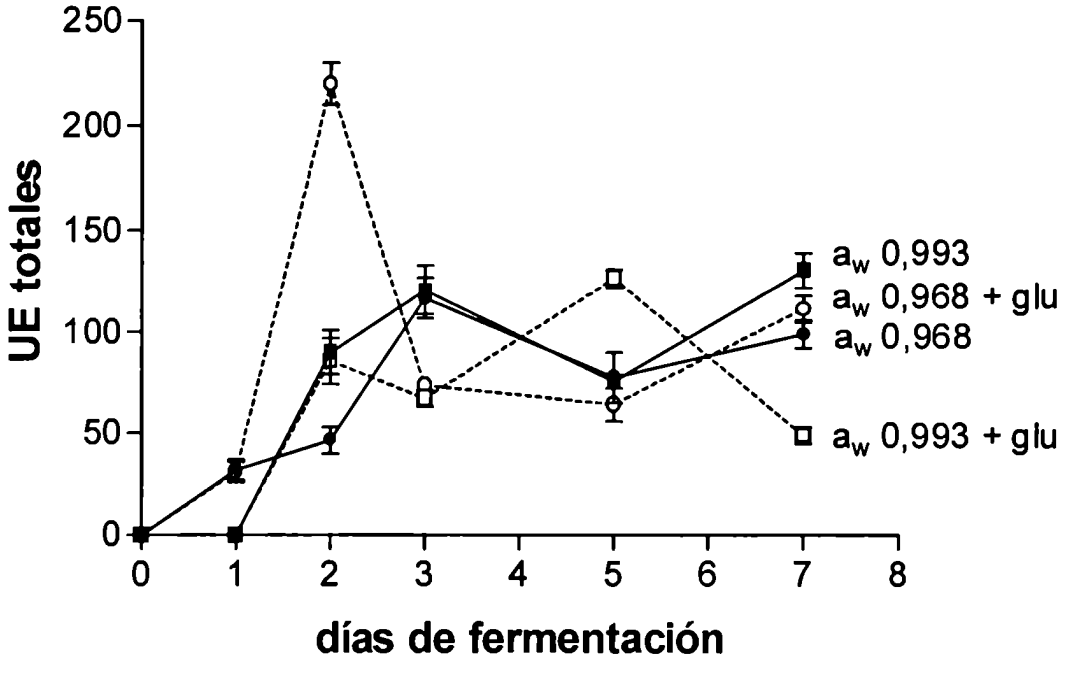



Figura 20: Producción de actividad PG en las distintas condiciones de fermentación. (glu: 0,7% m/v)

La siguiente ecuación describe la máxima producción de PG:

Act. Máx. PG = 148,5 – 20.$a_w$ +24,7.[glu] –26,8.$a_w$.[glu] $R^2$ = 0,959

Se puede ver que los tres términos tienen un peso similar siendo el efecto de la $a_w$ negativo (lo que quiere decir que a mayor $a_w$, menor será la producción máxima de PG). El efecto de la adición de glucosa es positivo lo que indica que la glucosa actúa como estimulante de la producción de PG. Por otra parte, la interacción negativa indica que ambas variables actúan en forma antagónica.

Los resultados muestran que hay una respuesta diferencial en la producción de pectinasas extracelulares en fermentación sumergida a la depresión de $a_w$ y agregado de glucosa.

La glucosa (0,7%) actuó como represor catabólico de PE a $a_w$ bajas. En cambio, la producción de PG en condiciones similares, fue altamente estimulada en la fase de crecimiento exponencial y la producción de PL fue estimulada a tiempos intermedios (2 – 6 días) correspondiendo al fin de la fase exponencial y a la fase estacionaria. Los efectos diferentes en el tiempo, podrían deberse a la secreción de distintas isoformas de cada enzima reguladas de manera diferente.

El efecto de la glucosa a $a_w$ alta, se manifestó principalmente como un retardo en la producción de las enzimas, pero no afectó significativamente la producción máxima de las mismas.

La diferencia en el efecto de la glucosa a ambas $a_w$ puede explicarse por las diferentes condiciones de fermentación que se generan a baja $a_w$ . Por ejemplo:

⇒ El pH disminuye menos a $a_w$ 0,968 que a $a_w$ 0,993

⇒ Pueden existir dificultades en la incorporación de glucosa por parte del hongo a menor $a_w$ (debido a cambios en la fluidez de la membrana en

esas condiciones). Esto se ve reflejado en una mayor acumulación de azúcares reductores en el medio de fermentación a $a_w$ 0,968.

⇒ Debido a los posibles cambios en la membrana, pueden existir dificultades en el transporte de las enzimas hacia el medio extracelular.

La diferente respuesta de cada enzima a las condiciones de $a_w$ y presencia de glucosa estaría relacionada a distintos mecanismos regulatorios para la producción de cada una de ellas.

Se observa, por ejemplo, que la PE es una enzima temprana que comienza a producirse desde la fase de crecimiento exponencial del hongo, siendo más sensible a las condiciones iniciales de la fermentación. De hecho esta enzima muestra una gran sensibilidad a la presencia de glucosa en el medio.

La PL parece ser poco sensible a la presencia de glucosa 0,7% en el medio y, en cambio, aparenta ser muy sensible al pH y/o al $a_w$ del medio de fermentación.

La PG se comienza a producir al final de la fase exponencial y la PL muestra una curva de producción marcadamente bifásica que puede corresponder a dos isoformas diferentes reguladas de distinto modo.

Se comprueba con estos resultados, la importancia de verificar las interacciones entre los distintos factores estudiados ya que el efecto de un factor solo puede ser muy diferente si se lo combina con otro.

## *2.5 EFECTO DE LA $a_w$ Y EL pH DE FERMENTACIÓN EN LA INCORPORACIÓN DE AZÚCARES*

Para corroborar si la disminución de la $a_w$ del medio de fermentación efectivamente dificulta la incorporación de monosacáridos por parte del hongo, se utilizó el diseño experimental basado en una red de Doehlert descrito en la sección 4.3.1. de Materiales y Métodos y se estudió el efecto de la $a_w$, pH y tiempo de fermentación en relación a la cantidad de azúcares reductores presentes en el medio (se partió de un medio de fermentación que tenía 18,5 µmoles de extremos reductores/ml de medio y no estaba suplementado con glucosa).

En la Tabla 2 se muestran las condiciones de fermentación de los distintos experimentos así como la cantidad de azúcares medidos en el medio de fermentación.

Se puede observar que en las fermentaciones analizadas luego de 1 día, se detectan más extremos reductores que los presentes en el inicio de la fermentación, coherentemente con lo observado en experimentos anteriores.

A partir de estos resultados, y usando los valores codificados según la matriz experimental, se realizó la regresión múltiple para vincular el patrón de azúcares reductores en el medio de fermentación con las variables en estudio. Los coeficientes no significativos ($p > 0,05$) fueron eliminados de la ecuación de regresión, obteniéndose la siguiente expresión reducida:

$$A = 12,34 - 2,89.a_w - 19,71.t - 5,28.a_w^2 + 10,26.t^2 \qquad R^2 = 0,997$$

Donde: A: son los µmoles de extremos reductores/ml de medio y t es el tiempo de fermentación en días.

El análisis de esta ecuación de regresión indica que el pH inicial de la fermentación no afecta la degradación de los polisacáridos ni la incorporación de los monosacáridos resultantes.

| Experimento N° | Días de ferment. | pH | $a_w$ | µmoles de Az. Red./ml |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,5 | 7 | 0,974 | 12,21 |
| 2 | 2,5 | 5 | 0,974 | 10,81 |
| 3 | 2,5 | 6,5 | 0,994 | 5,36 |
| 4 | 2,5 | 5,5 | 0,954 | 10,27 |
| 5 | 2,5 | 6,5 | 0,954 | 10,67 |
| 6 | 2,5 | 5,5 | 0,994 | 6,38 |
| 7 | 4 | 6,5 | 0,981 | 1,53 |
| 8 | 1 | 5,5 | 0,968 | 37,0 |
| 9 | 1 | 6,5 | 0,968 | 33,3 |
| 10 | 1 | 6 | 0,987 | 32,4 |
| 11 | 4 | 5,5 | 0,981 | 0,28 |
| 12 | 4 | 6 | 0,961 | 4,4 |
| 13 | 2,5 | 6 | 0,974 | 12,97 |
| 14 | 2,5 | 6 | 0,974 | 12,71 |
| 15 | 2,5 | 6 | 0,974 | 11,34 |

Tabla 2: Matriz experimental (los valores de los niveles de cada factor se muestran sin codificar para facilitar la interpretación) y azúcares reductores observados en el medio de fermentación.

En cambio, tanto la $a_w$, como el tiempo de fermentación influenciaron de manera importante el patrón de azúcares remanentes en el medio de fermentación (el tiempo en mayor medida, como se ve reflejado por los mayores coeficientes que lo acompañan).

El signo negativo que acompaña al coeficiente lineal del tiempo de fermentación, indica que a mayores tiempos, menor será la cantidad de azúcares remanentes en el medio a causa del consumo de éstos por el hongo (entre 1 y 4 días de fermentación). La existencia de un término cuadrático positivo para el tiempo, indica que la disminución de extremos reductores en el tiempo no es estrictamente lineal.

Respecto del efecto de la $a_w$, el coeficiente negativo que acompaña al término lineal indica que en condiciones de stress osmótico, mayor será la cantidad de azúcares remanentes en el medio, prueba inequívoca de un uptake más lento a menores $a_w$. El término cuadrático negativo para esta variable indicaría que el efecto no es estrictamente lineal, sino que existen menos diferencias en la incorporación de azúcares entre las $a_w$ más bajas estudiadas, y éstas se acrecientan entre valores más altos de $a_w$.

## 3. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Existen reportes en los que se mencionan diferencias de productividad enzimática de una misma cepa en sistemas de fermentación líquido o sólido. Solís Pereira y col (1993) describieron mayor rapidez en el crecimiento y producción de PG por *Aspergillus niger* en FES respecto a FEL, pero como los medios de fermentación eran diferentes entre sí, resultaba difícil establecer una comparación muy exacta entre ambos sistemas.

Acuña Argüelles y col., 1995 reportaron mayor productividad de exo y endo pectinasas por *Aspergillus niger* en FES respecto a FEL.

Maldonado y col (1998) observaron mayor producción de PG y PE (6 y 4 veces más respectivamente) cuando una cepa de *Aspergillus niger* era crecida en FES respecto a cuando crecía en FEL.

Por otra parte, Antier y col (1993 a y b) remarcan que las cepas que producen enzimas en FES con una buena eficiencia, no lo hacen en FEL. Augur y Viniegra González (1998) aislaron mutantes de *Aspergillus niger* sobreproductoras de pectinasas, comprobando que las hiperproductoras en FES, producían menos o igual que la cepa original cuando se las cultivaba por FEL , mientras que las cepas de alta productividad por FEL, no eran buenas productoras de pectinasas en FES.

Por otro lado, una de las ventajas de la FES respecto a la FEL, es la posibilidad de aprovechar productos agroindustriales como soporte y fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos.

Friedrich y col (1987) y Hang y Woodams, (1994) utilizaron residuos del procesamiento industrial de manzana para la producción de PG por distintos hongos filamentosos, aprovechando el alto contenido de pectinas de la manzana como inductor para la síntesis de pectinasas.

Los residuos de naranja derivados de la industria juguera (con alto contenido en pectina), fueron utilizados con éxito por Siessere y Said (1989) ; Hart y col (1991) y Parrish y col (1993) para aumentar su digestibilidad, contenido proteico y en algunos casos, se obtuvieron también pectinasas.

Soccol, (1998) describió la utilización de bagaso de mandioca (un residuo agroindustrial que se genera en gran cantidad en Brasil) para producción de ácido cítrico y alimento enriquecido en proteínas para ganado por FES.

Por todas estas razones, una vez elegida la cepa de *Aspergillus niger* 148, se evaluó su comportamiento en fermentación en medio sólido sobre diversos productos agroindustriales.

## *3.1. Evaluación de distintos sustratos para FES*

En la Tabla 3 se muestran los sustratos analizados, así como las condiciones iniciales de fermentación de cada sustrato. Como los distintos subproductos son tan diferentes entre sí, las condiciones iniciales de fermentación no siempre fueron similares.

Se eligió un tiempo de fermentación de 3 días para analizar la producción de pectinasas.

En el caso de los alcahuciles (despuntes y braquias, resultado de la elaboración de corazones de alcahucil en escabeche), no se observó desarrollo de micelio ni aún después de una semana de incubación.

En todos los otros sustratos, hubo desarrollo del hongo y se estudió la productividad de pectinasas en los extractos (Figuras 21a, b, c).

Respecto de la actividad PE, se observó que la pectina actuó como inductor sólo en el mosto, mientras que en el salvado tuvo un efecto inhibidor sobre esta enzima y en la okara o la mezcla de okara y salvado, no tiene efecto. El medio más propicio para la producción de esta enzima fue el salvado sin pectina.

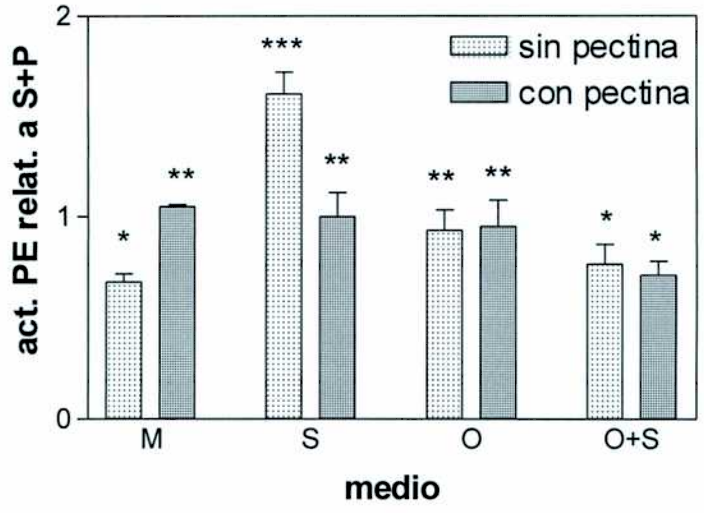
| | pH inicial | $a_w$ inicial | Hum. Inicial (% b. seca) |
|---|---|---|---|
| Alcahucil (A) | 5,7 | 0,983 | 50,7 |
| A +pectina (A+P) | 5,6 | 0,984 | 51,1 |
| Mosto de uva (M) | 4 | 0,989 | 47 |
| M + pectina (M+P) | 4 | 0,989 | 47,3 |
| Salvado de trigo (S) | 6,1 | 0,984 | 52,8 |
| S + pectina (S + P) | 6,5 | 0,981 | 50,5 |
| Okara (O) | 6,1 | 0,983 | 51,6 |
| O +pectina (O+P) | 6,4 | 0,981 | 51,2 |
| O + S | 6,3 | 0,981 | 51,7 |
| O + S + P | 6,3 | 0,979 | 52,7 |

Tabla 3: Características iniciales de los distintos sistemas de FES

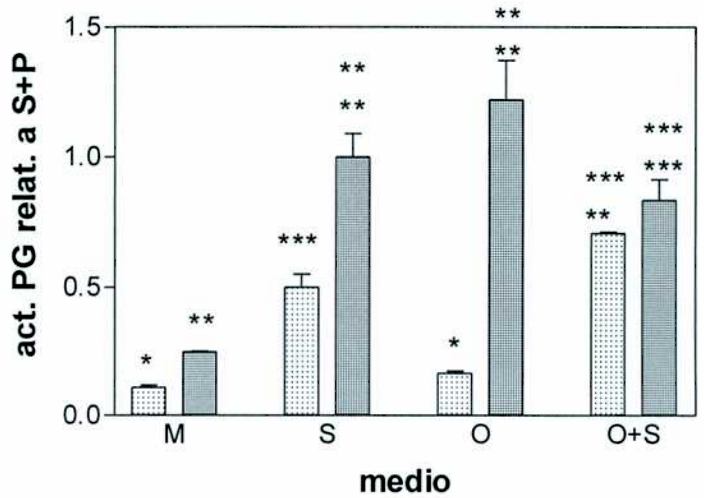
Se observó una producción de PG mucho menor por esta tecnología de fermentación comparada con la producción en medio líquido (para los extractos diluídos en la misma proporción que los obtenidos por FEL no se pudo apreciar actividad de esta enzima).

En todos los casos, la pectina actuó como inductor de la producción. La inducción por pectina fue mucho mayor en okara, llegando a niveles de productividad similares a los observados en salvado. La mayor producción de PG se obtuvo en okara y salvado suplementados con pectina y el mosto resultó un sustrato poco propicio para la obtención de esta enzima.

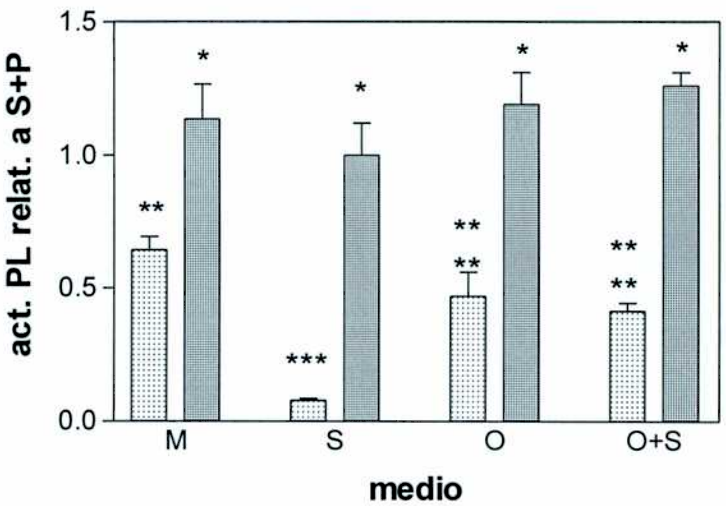
En el caso de la PL, la pectina también resultó un importante inductor en todos los sustratos ensayados (con un efecto proporcionalmente mayor en el salvado). Respecto de las mejores condiciones para la producción de esta enzima, se observó similar productividad en todos los sustratos suplementados con pectina.




a)




b)




c)

Figura 21: producción de PE, PG y PL (a, b, c respectivamente) en distintos sustratos por FES. Igual cantidad de símbolos indican grupos estadísticamente iguales ($p < 0,05$)

De los resultados se concluye que la pectina es un inductor indispensable para aumentar la producción de PL y, en menor medida, de PG, siendo todos los sustratos suplementados con pectina (salvo el alcahucil), aptos para ser utilizados en la producción de PL por FES. Dado que la pectina no mejoró sensiblemente la productividad de PE en los sustratos okara y okara-salvado y la disminuyó sensiblemente en salvado, cualquiera de estos tres sustratos sería conveniente desde el punto de vista de minimizar la producción de esta enzima y obtener una alta producción de PL y PG.

En vista de que uno de los objetivos del trabajo de tesis es estudiar la producción de pectinasas en medio líquido y sólido en forma comparativa, se decidió elegir como sustrato para ambas tecnologías de fermentación al salvado suplementado con pectina, puesto que demostró en ambos casos, promover la producción de extractos pectinolíticos con la composición relativa de pectinasas deseada (alta PG y PL en relación a la PG).

## *3.2. Isoterma de adsorción de salvado –pectina*

El conocimiento de la isoterma de adsorción de agua del sustrato es fundamental en los procesos de FES, puesto que brinda información acerca de la vinculación entre el contenido de agua del material (el sustrato) y la actividad de agua, siendo esta última el parámetro más adecuado para describir la disponibilidad de agua para los procesos biológicos.

En condiciones de equilibrio, la actividad de agua está relacionada con la humedad y la presión de vapor de la siguiente manera (Le Maguer, 1987):

$$a_w = p/p_0 = HR_e/100$$

Donde: $a_w$: actividad de agua

$p_0$: presión de vapor del agua pura

p : presión de vapor del sistema a la misma temperatura y presión

$HR_e$: Humedad relativa en equilibrio

La mayoría de los autores están de acuerdo en delimitar tres secciones diferentes de isotermas de sorción (Labuza, 1986):

⇒ Primer estado de sorción: Esta región corresponde a la adsorción de una capa monomolecular de agua ($0 < a_w < 0,2$). Esta agua está ligada a los grupos polares de los componentes del sistema. La energía de adsorción de esta capa es del orden de 1-15 Kcal/mol. Esto explica que el agua de esta capa sea difícil de extraer y que no congele. Un alto valor del contenido de agua de la monocapa indica un alto contenido de grupos hidrofílicos. Esta agua no tiene actividad físico-química.

⇒ Segundo estado de sorción: Está constituída por agua débilmente ligada ($0,2 < a_w < 0,8$) Se trata de sucesivas capas de agua , fijas sobre la primera por intermedio de uniones puente de hidrógeno. Tiene actividad físico-química ya que comienzan los procesos de disolución y reacciones químicas y bioquímicas.

⇒ Tercer estado de sorción: Consiste de agua prácticamente libre, mecánicamente atrapada en los espacios vacíos del material ($a_w > 0,8$). Actúa como solvente de los componentes solubles. Esta agua tiene prácticamente las mismas propiedades que el agua pura.

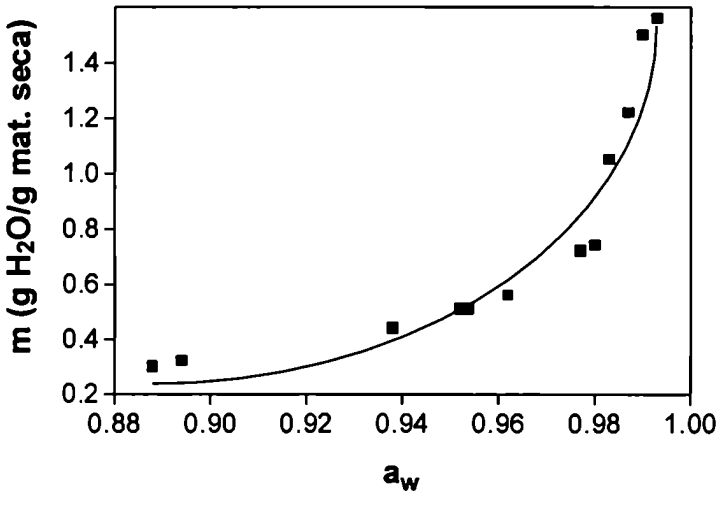



Figura 22: Isoterma de adsorción del sistema salvado-pectina a 28°C.

El rango de $a_w$ de interés para relizar fermentaciones en estado sólido coincide con la tercer etapa de sorción, zona donde existen pocos datos en

bibliografía ya que existen dificultades experimentales para la determinación de humedades de equilibrio por encima de $a_w$ 0,90.

La isoterma (Figura 22) se construyó a 28 °C, dentro de los rangos de $a_w$ compatibles con la realización de una FES.

## *3.3. Caracterización de la fermentación*

Se realizaron fermentaciones en medio sólido sobre salvado suplementado con 1% de pectina para estudiar el crecimiento, la variación de pH y la producción de enzimas y biomasa en el curso del tiempo. Se eligió una $a_w$ inicial de 0,981 (55% de humedad en base húmeda) y pH inicial 6,1 (pH natural del salvado sin aditivos).

### 3.3.1. Crecimiento fúngico

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

- 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).
- Medición de un constituyente celular: nitrógeno y proteínas, ácidos nucleicos, ergosterol, glucosamina (quitina).
- Medición de consumo de nutrientes: por ejemplo carbohidratos.
- Medición física: conductividad eléctrica, caída de presión dentro de una columna empaquetada durante la FES.

Más recientemente, Terebiznik y Pilosof (1999) demostraron que la pérdida de peso seco en un sistema de fermentación en medio sólido es un muy buen estimador de la biomasa fúngica. A partir de la ecuación de Okasaki (1980), estos autores desarrollaron la siguiente ecuación que correlaciona la pérdida de peso seco del sistema con la biomasa:

$$PPS_t = \frac{k_1.X_{max}}{1+k.e^{-\mu.t}} + \frac{k_2.X_{max}}{\mu}.\ln\left[\frac{e^{\mu.t}+k}{1+k}\right] - \frac{k_1.X_{max}}{1+k} - \frac{X_{max}}{1+k.e^{-\mu.t}}$$

Donde: $PPS_t$ es la pérdida de peso seco del sistema en el tiempo t

$k=(X_{max}/X_0)-1$

$k_1$ es g de materia seca consumida para formación de micelio por g de micelio formado $= \frac{PPS_{exp}}{X} + 1 - \frac{k_2}{\mu}$

$k_2$ son los g de materia seca consumidos para el mantenimiento del micelio por g de micelio y por hora $= \frac{PPS_{est}}{X_{max}} + 1$

$X_{max}$ es la biomasa alcanzada en la fase estacionaria

Por lo tanto, en el presente trabajo, la evolución de la biomasa se estimó mediante la evolución del peso seco del micelio fermentado.

En la Figura 23, se muestra la curva de crecimiento obtenida para *Aspergillus niger* 148 .

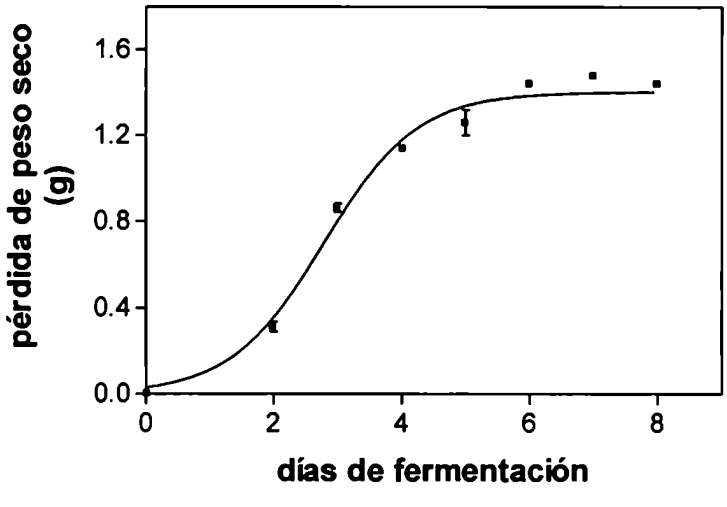



Figura 23: Crecimiento fúngico durante la FES

La curva de crecimiento ajustó al modelo logístico. Los parámetros obtenidos se detallan a continuación:

$X_{max}$: (1,402 +/- 0,037) g

k: 45,23 +/- 17,27

$\mu$: (0,0569 +/- 0,0060) $h^{-1}$

$R^2$: 0,982

Se observó una fase lag mucho más prolongada en FES (48 hs) que en FEL (12 hs), debido, probablemente al stress que le implica al hongo el crecimiento en un medio de menor $a_w$, donde los sustratos para el crecimiento no están rápidamente disponibles por limitaciones difusionales.

La fase de crecimiento exponencial comenzó luego de las 48 horas de fermentación hasta los 5 días, momento en el que se estableció el régimen estacionario.

### 3.3.2. Evolución del pH en el medio de fermentación

En la Figura 24, se aprecia la disminución del pH en el tiempo en tres etapas bien diferenciadas:

Durante el transcurso de las fases lag y exponencial de crecimiento, el pH bajó gradualmente de 6 a 4,7.

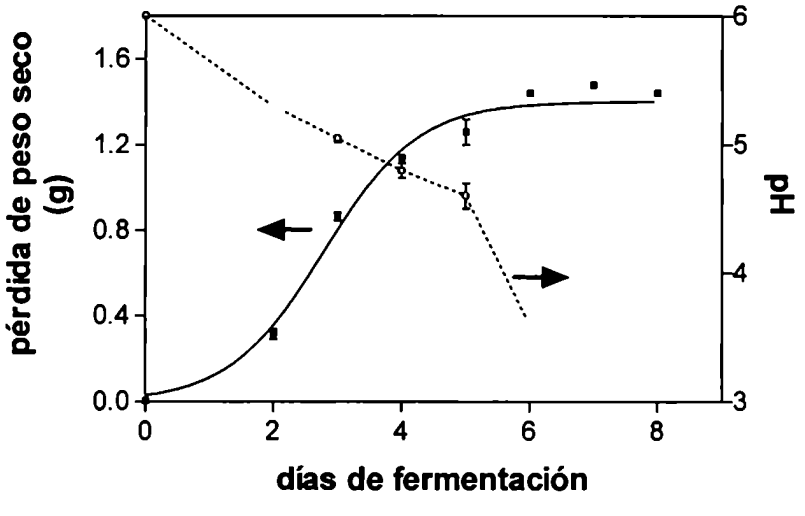
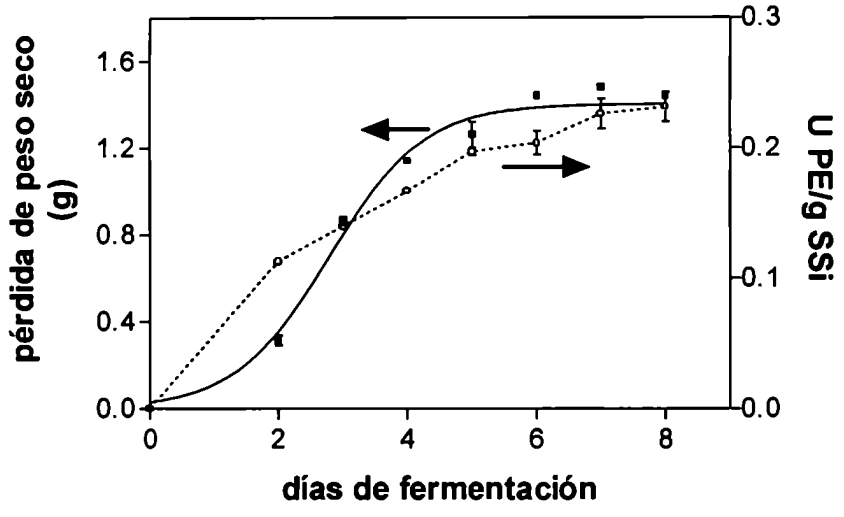


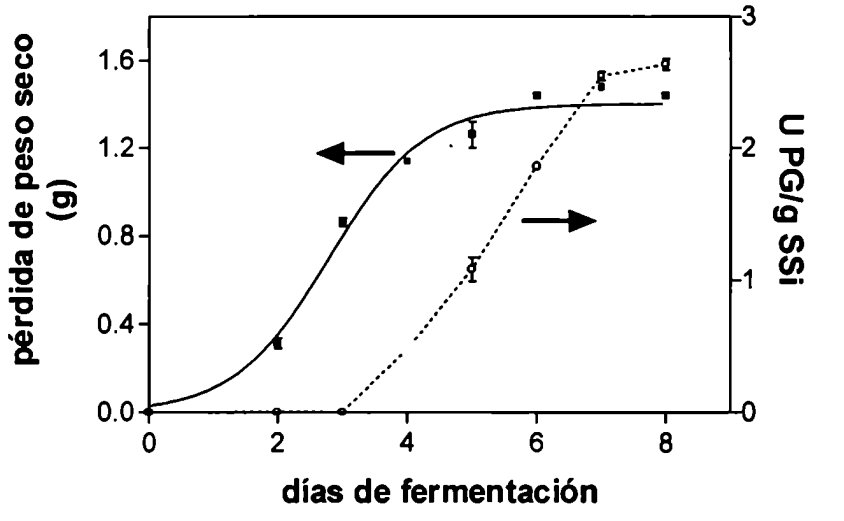

Figura 24: Crecimiento y evolución del pH durante el curso de la fermentación

En la fase de desaceleración que precede al establecimiento de la fase estacionaria, el pH descendió abruptamente hasta 3,6.
Se puede apreciar que la disminución de pH en FES es menor y más lenta que en FEL, probablemente debido a los distintos mecanismos que regulan la fisiología del hongo en ambos tipos de fermentación.

### 3.3.3. Producción de pectinasas por FES

En las Figuras 25 a, b y c, se muestra la producción de pectinasas por *A. niger* 148 en el tiempo para el sistema sólido (salvado más pectina).
Respecto de la PE (Figura 25 a), se puede apreciar que esta enzima se sintetiza desde el comienzo de la fermentación y que la actividad medida en el extracto aumenta con el tiempo sostenidamente. Después del quinto día de fermentación, la síntesis de esta enzima parece frenarse un poco.
Cavallito y col (1996) detectaron actividad PE a partir de 12 horas de fermentación en estado sólido de *Aspergillus foetidus* en salvado aunque trabajaron a pH menores que en el presente trabajo.
Maldonado y col (1998), trabajando con *Aspergillus niger* crecido por FES en un medio suplementado de bagaso de caña, observaron un patrón de producción de PE muy similar al observado en el presente trabajo.
La producción de PG (Figura 25 b), a diferencia de la de PE, comienza recién a detectarse a partir del cuarto día de fermentación, indicando que esta es una enzima más tardía, al igual que lo observado para FEL. El aumento en la actividad PG del extracto es casi lineal y el máximo de producción se alcanza a los 7 días de fermentación.
Siessere y col (1994), usaron residuos de la industria cítrica para obtener PG a partir de tres hongos diferentes, observando distintos patrones de producción. Por ejemplo, *Penicillium charlesi* y *Tuberculoria vulgaris* producían PG a partir del cuarto día de fermentación, mientras que *Talaromyces flavus*, producía actividad PG desde el primer día de fermentación llegando a su máximo a partir de los 4 días.



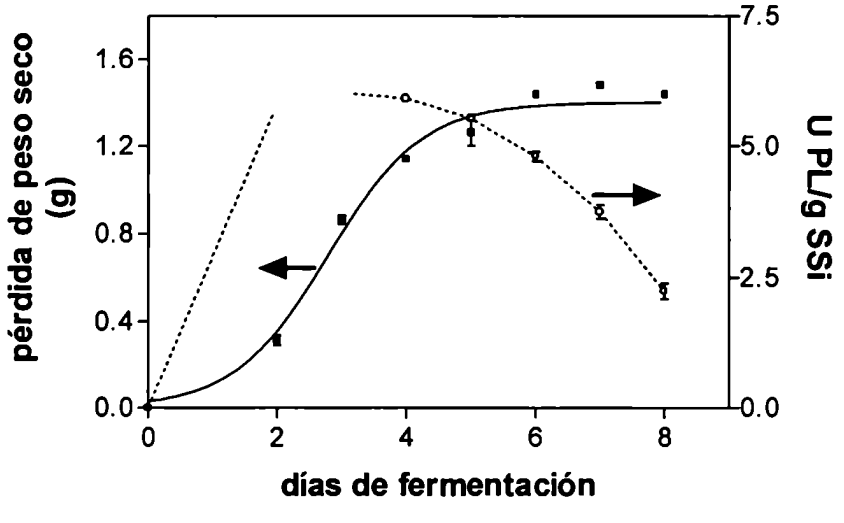




Figura 25: Evolución de biomasa y producción de pectinasas en el curso de la fermentación. a) PE; b): PG; c) PL.

Hart y col (1991) describieron un sistema de fermentación para *Rhizopus oryzae*, sobre residuos de naranja de la industria juguera en el que detectaron actividad de PG recién después del segundo día de fermentación, llegando a una meseta a partir del cuarto día de producción.

Acuña Argüelles y col, (1994) observaron producción de PG por *Aspergillus niger* en bagaso de caña suplementado con pectina a partir del comienzo de la fermentación, pero no llegaron a observar un máximo de producción de la enzima, ya que realizaron fermentaciones de sólo 3 días de duración.

Hang y col (1994), describieron un sistema de fermentación a base de pulpa de manzana en el que obtuvieron PG de *Aspergillus niger*. Los autores realizaron fermentaciones más cortas que en el presente trabajo, y detectaron actividad de PG desde el comienzo de la fermentación, encontrándose el óptimo de producción de esta enzima a las 72 horas de fermentación.

Sakai (1994), realizó fermentaciones de 2 días sobre salvado, observando actividad de PG de *Aspergillus awamori* a partir de las 24 horas de fermentación. No llegó a observar un máximo en la producción de esta enzima.

Cavallito y col, (1996), estudiaron la producción de PG por *Aspergillus foetidus* en FES usando salvado como sustrato y observaron producción de esta enzima a partir de 24 o 36 horas de fermentación.

Maldonado y col (1998), reportaron actividad de PG en FES a partir de las 12 horas de fermentación, trabajando con *Aspergillus niger* sobre bagaso de caña.

Como puede verse, en distintos sistemas y usando distintos microorganismos, se pueden obtener patrones muy diferentes de producción enzimática.

La PL, en el sistema estudiado se produce desde los dos días de fermentación, llegando a su máximo entre los 2 y los 4 días, luego de lo cual, la actividad PL en el extracto comienza a decaer (Figura 25 c). Esto puede deberse a que la enzima sea más lábil en las condiciones ambientales a

partir de este momento (por ejemplo bajo pH) y, por lo tanto, vaya inactivándose.

Cavallito y col (1996), reportaron la producción de PL por *Aspergillus foetidus* en salvado, describiendo mayor producción pero también mayor inactivación a pH más bajos (2,3) que a pH mayores (4).

### 3.3.4. Estudio de la conidiación en FES: Efecto de la $a_w$, pH inicial y tiempo de fermentación

Durante la fermentación sobre sustratos sólidos se ve favorecida la producción de esporas por los hongos filamentosos (Silman y col., 1993; Larroche, 1996), a diferencia de lo que ocurre en las fermentaciones sumergidas.

Según el proceso, esto puede ser deseable, como por ejemplo para la producción de inóculo (Roussos y col, 1991; Grajek,1994 ; Larroche, 1996). En cambio, durante la producción de metabolitos secundarios, la esporulación no es deseable, ya que los conidios interfieren con la extracción y son altamente contaminantes (Couri y Farías, 1995).

La variable de control más estudiada en fermentación sólida respecto de la conidiación es la actividad de agua.

Beuchat (1983), describió el efecto de la disminución de la $a_w$ como retardador del crecimiento y la esporulación en varios hongos.

Gervais y col (1988) estudiaron el efecto de la $a_w$ (entre 0,86 y 1 usando glicerol como depresor de $a_w$) en la esporulación de *Trichoderma viride* y *Penicillium roqueforti*, detectando un óptimo en 0,96 y 0,95 respectivamente.

Cahagnier y col (1995) reportaron una mayor conidiación de *Aspergilius candidum* y *Penicillium implicatum* crecidos en granos de arroz o maíz como respuesta a la disminución de la $a_w$ desde 1 hasta 0,96. En cambio Grajek, (1994), reportó la influencia positiva y lineal del aumento de $a_w$ ( entre 0,95 y 1) en la esporulación del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* por FES.

Utilizando el diseño experimental basado en una red de Doehlert (descripto en la sección 4.3.1. de Materiales y Métodos), se estudió el efecto de la $a_w$, pH y tiempo de fermentación en la conidiación de la cepa de estudio.

En primer lugar, se realizó la observación a simple vista de la esporulación en las distintas condiciones de experimentación. A igual tiempo y pH, los sistemas fermentados a $a_w$ menores, presentaron menos conidiación evidenciándose la influencia positiva de la $a_w$ (a mayor $a_w$, mayor producción de esporas). A tiempos de fermentación mayores, los sistemas fermentados en las mismas condiciones de $a_w$ y pH , evidenciaron mayor esporulación. El efecto del pH a los mismos tiempos y $a_w$, no resultó evidente a simple vista.
Luego de la finalización de la fermentación a los tiempos correspondientes según el diseño experimental, se realizó el conteo de esporas. Los resultados obtenidos para cada condición se muestran en la Tabla 4:
Estos resultados, se utilizaron para realizar el modelado matemático por regresión lineal múltiple (siempre utilizando los valores codificados para los distintos niveles de cada variable). De los coeficientes obtenidos, se retuvieron aquéllos significativos a un nivel de $p< 0,05$, obteniéndose una ecuación reducida que explica la respuesta observada:

$$E= 2,17\ 10^9+ 4,24\ 10^9\ a_w+ 3,58\ 10^9\ t - 1,97\ 10^9\ pH+ 2,31\ 10^9\ a_w.t - 4,11\ 10^9\ t.\ pH + 3,09\ 10^9\ a_w^2 - 1,26\ 10^9\ pH^2 \qquad R^2: 0,939$$

Donde E es la cantidad de esporas /g de koji.
El coeficiente $R^2$ obtenido, indica que este modelo explica la respuesta observada en un 93,9% de los casos. El test del "lack of fit" fue significativo lo que significa que el orden de la ecuación no era secundario (el modelo no había incluido todas las funciones apropiadas de las variables independientes o el dominio experimental era demasiado grande para usar un modelo cuadrático). De todos modos, aún con un "lack of fit" significativo, el modelo puede ser usado si se tiene suficiente cantidad de datos (Box and Draper,

1987). Los altos coeficientes $R^2$ fueron considerados como evidencia de la aplicabilidad de cada modelo en el rango de estudio.

| Experimento N° | pH | $a_w$ | Días de ferment. | Conidiación (esp/g. Kojl) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 0,981 | 5 | $1,03.10^{10}$ |
| 2 | 6 | 0,931 | 5 | $2,10.10^{8}$ |
| 3 | 6 | 0,968 | 8 | $7,22.10^{9}$ |
| 4 | 6 | 0,943 | 2 | $2,26.10^{7}$ |
| 5 | 6 | 0,968 | 2 | $4,94.10^{7}$ |
| 6 | 6 | 0,943 | 8 | $3,19.10^{9}$ |
| 7 | 7 | 0,968 | 6 | $5,20.10^{9}$ |
| 8 | 5 | 0,943 | 4 | $4,73.10^{8}$ |
| 9 | 5 | 0,968 | 4 | $5,19.10^{9}$ |
| 10 | 5 | 0,955 | 7 | $9,5.10^{9}$ |
| 11 | 7 | 0,943 | 6 | $2,25.10^{8}$ |
| 12 | 7 | 0,955 | 3 | $1,01.10^{8}$ |
| 13 | 6 | 0,955 | 5 | $1,95.10^{9}$ |
| 14 | 6 | 0,955 | 5 | $2,1.10^{9}$ |
| 15 | 6 | 0,955 | 5 | $2,53.10^{9}$ |

Tabla 4: Matriz experimental (los valores de los niveles de cada factor se muestran sin codificar para facilitar la interpretación) y conidiación observada.

Analizando los coeficientes de regresión, se observa el efecto positivo de la $a_w$ que indica que a mayor $a_w$, mayor será la esporulación, en concordancia con lo reportado por Grajek, (1994) para *Verticillum album*. Al existir también un efecto cuadrático de la $a_w$, se evidencia que el efecto positivo de la $a_w$ en la esporulación no es estrictamente lineal. Gervais, (1988) encontró una $a_w$ óptima para la esporulación de *Trichoderma viride y Penicillium roqueforti*, con lo que el efecto de esta variable sobre la conidiación no resulta siempre lineal. Sánchez (1999) observó una menor esporulación de *Aspergillus niger*

crecido por FES sobre soja y afrechillo de arroz al disminuir la humedad del sustrato y/o agregar NaCl para reducir el $a_w$.

El efecto positivo del tiempo indica que la esporulación aumenta con el tiempo de fermentación y este efecto es lineal al menos hasta los 8 días de fermentación. Varios autores han estudiado la conidiación en el curso de la fermentación. Desfarges y col (1987), para *Penicillium roqueforti* en semillas de trigo sarraceno observaron que la velocidad de conidiación decaía luego de más de 14 días. Dorta y col, (1996), para *Metharhizium ansoplae* crecido por FES en salvado de arroz, en cambio observaron que decaía luego de 9 días.

El efecto negativo del pH es el más débil (implica menor esporulación a mayor pH) y su efecto cuadrático negativo evidencia que esta tendencia no es lineal.

Las interacciones significativas entre $a_w$ y tiempo (positiva) y tiempo y pH (negativa) implican sinergismo entre el primer par de variables y antagonismo en el segundo.

En las Figuras 26 a, b y c se observan las superficies de Isorespuesta (combinaciones de pH y $a_w$ que dan la misma cantidad de esporas/g) para 3, 4 y 7 días de fermentación respectivamente.

Debido a que la metodología de conteo de esporas utilizada tiene un límite de sensibilidad del orden de $10^7$ esporas/g de koji, las respuestas presentadas en la Figura 26 se muestran para el rango experimental medible. Los resultados obtenidos en ese orden de esporulación conllevan mucho error experimental y si bien se utilizaron esos datos para generar la ecuación de modelado, no es conveniente utilizarlos para corroborar la validez del modelo por estar en el límite de detección del método de conteo utilizado.

En todos los tiempos estudiados, la $a_w$ fue la variable que más influyó en la conidiación, siendo ésta inhibida a valores bajos de $a_w$. Para el tiempo más corto (3 días, Figura 26 a), el pH no afectó en forma importante la esporulación, sino que la $a_w$ fue la variable de mayor peso en la respuesta observada. Para tiempos más largos (4 y 7 días, Figuras 26 b y c), la esporulación fue afectada tanto por el pH como por la $a_w$ del medio, siendo

las $a_w$ más altas y los pH más bajos, las condiciones necesarias para obtener mayor producción de conidios, mientras que los pH mayores y las $a_w$ bajas, fueron las condiciones que menos favorecieron la esporulación.

Se eligieron tres condiciones dentro del dominio experimental (pH 5,2-$a_w$ 0,939- 8 días; pH 6,6-$a_w$ 0,959-3 días y pH 7-$a_w$ 0,981-3 días) para validar el modelo de esporulación.

En la Figura 27 se muestra la relación entre la predicción de la conidiación por el modelo y la esporulación observada. Las tres condiciones de validación (triángulos grises) cayeron en el intervalo correspondiente a un 95% de confianza. De esto puede concluirse que el modelo matemático obtenido fue satisfactorio para predecir la esporulación dentro de las condicionesexperimentales estudiadas.

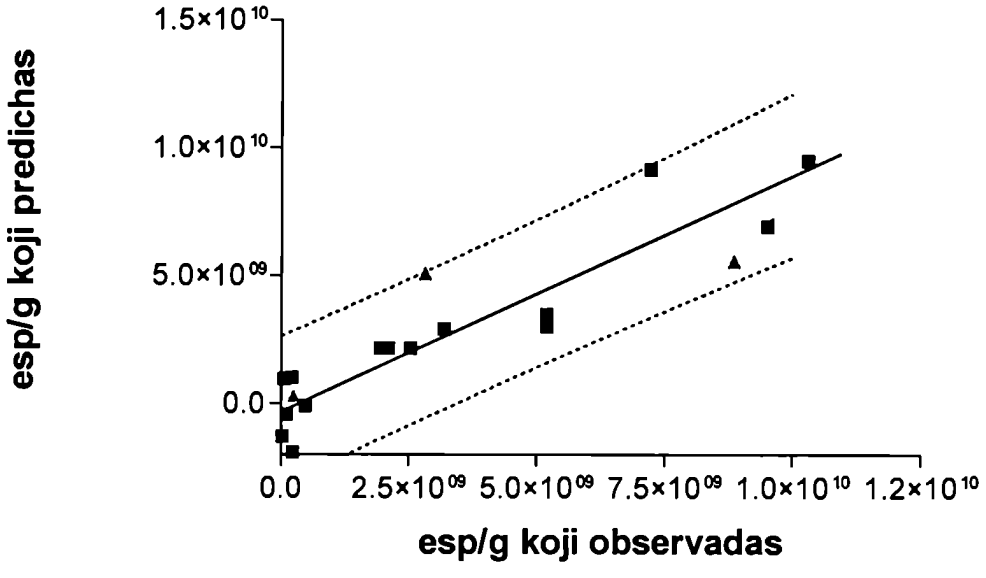
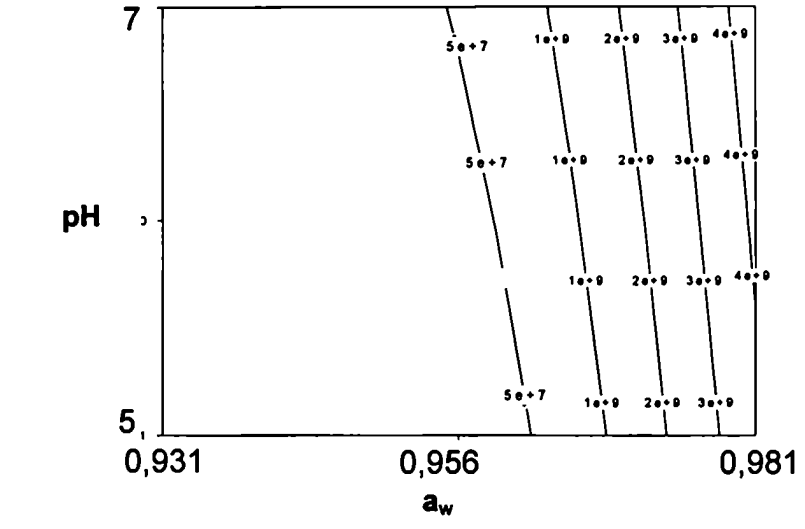
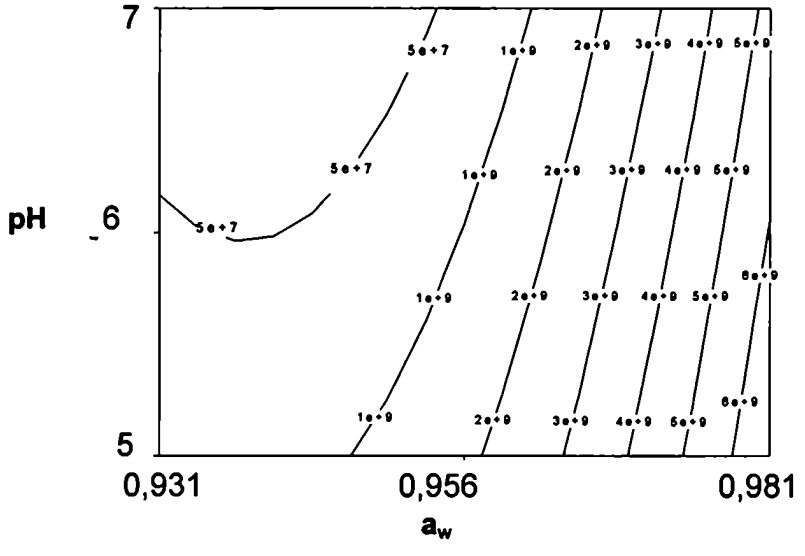


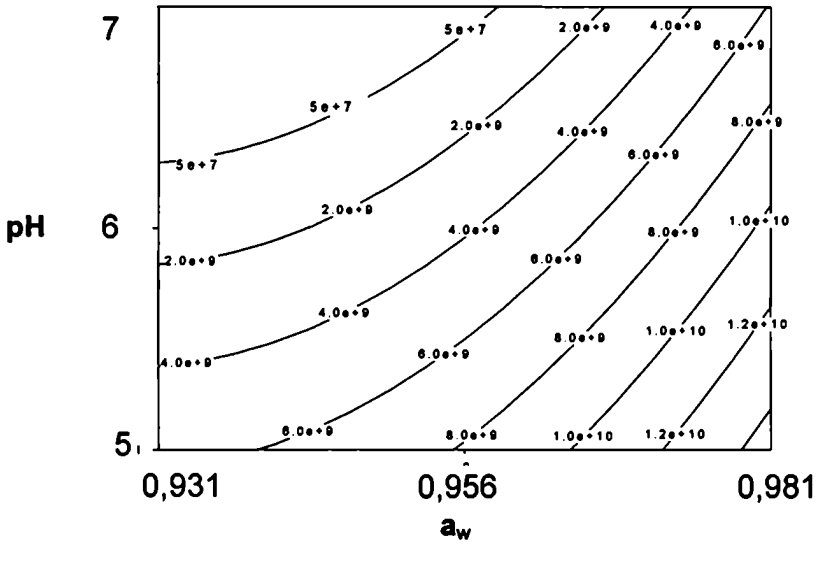

Figura 27: Comparación entre la observación y predicción de la conidiación. : Puntos del diseño experimental; ▲ : Puntos de la validación del modelo para la conidiación. Las líneas punteadas marcan el intervalo de confianza del 95% de la regresión lineal.




a)




b)




c)

Figura 26: Superficie de isorespuesta para la conidiación (esp/g de koji) en función del pH y $a_w$ iniciales. a) 3 días; b) 4 días, y c) 7 días de fermentación

De los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

⇒ En caso de desear alta producción de esporas para la preparación de inóculo, las condiciones óptimas son: $a_w$ Inicial: 0,98; pH inicial: 5; tiempo de fermentación: 8 días. En estas condiciones se espera obtener 2,02 $10^{10}$ esporas/g de koji.

⇒ En caso de utilizar la fermentación para producir enzimas y desear una mínima esporulación, conviene superponer las superficies de respuesta de producción enzimática y esporulación y buscar la combinación de las condiciones para buena producción enzimática y baja conidiación.

# 4. CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PECTINASAS

Se realizó la comparación y caracterización de las pectinasas obtenidas por ambas tecnologías de fermentación (FES y FEL) por medio de geles de poliacrilamida –pectina nativos y desnaturalizantes.

Los extractos analizados corresponden a fermentaciones realizadas sobre extractos a base de salvado suplementado con pectina, en las siguientes condiciones:

FEL: $a_w$ 0,994; pH 5,8 y 3 días de fermentación;

FES: $a_w$ 0,931; pH 6,6 y 3 días de fermentación.

En la Figura 28, se observan los geles teñidos para actividad y proteínas, corridos en condiciones desnaturalizantes. Se corrieron patrones comerciales (Sigma Inc.) de PL y PG purificados.

Se puede observar que la PL comercial posee contaminación con actividades PG y PE (Figura 28 b, calle 2) y que la mayor banda proteica que le corresponde es la paralela a la PG, aunque la actividad mayoritaria está representada por la PL.

En el caso de los extractos obtenidos por FES y FEL, se observa que la proteína mayoritaria es la PL (Figura 28 a, calles 4 y 5).

Dado que el gel fue corrido en condiciones desnaturalizantes y la visualización de actividad enzimática implicó un paso de renaturalización, las proteínas más lábiles pueden no renaturalizarse correctamente y la existencia de esta enzima no fue detectada en estos geles.

Algo similar ocurrió con la PE (banda oscura en el gel de actividad), ya que no se recuperó actividad de esta enzima ni en el extracto obtenido por FEL ni en el obtenido por FES (Figura 28, calles 4 y 5). Sin embargo, la actividad PE presente en el preparado comercial de Sigma, sí pudo ser recuperada, indicando que se trata de una isoforma más resistente. En la Figura 29 a (calles 2 y 3), se puede observar que la PE del extracto comercial, presenta una movilidad electroforética diferente a la producida por la cepa *Aspergillus niger* 148, por lo que sus propiedades no son indicativas de las de la PE obtenida en el presente trabajo.

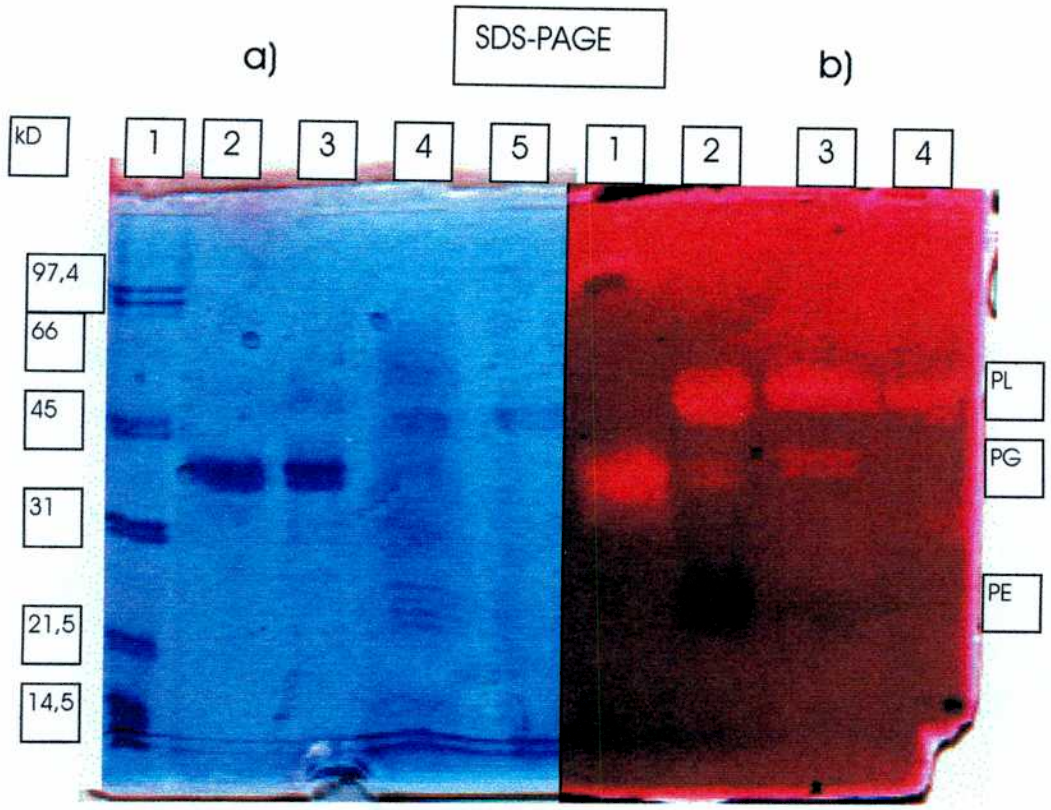



Figura 28: Electroforesis desnaturalizantes. a): Tinción para proteínas. b): Tinción para actividad pectinolítica. Calle 1a: Marcadores de peso molecular; Calles 2a y 1b: PG purificada comercial (Sigma-Aldrich Inc.); Calles 3a y 2b : PL purificada comercial (Sigma-Aldrich Inc.); Calles 4a y 3b: Extracto pectinolítico obenido por FEL; Calles 5a y 4b: Extracto pectinolítico obenido por FES.

La producción de distintas isoformas de pectinasas en diferentes condiciones de fermentación ha sido reportada por varios autores.

Mikhailova y col (1992), describieron la producción de distintas isoformas de PG por *Aspergillus alliaceus* en FEL según las fuentes de carbono presentes en el medio de fermentación.

Acuña Argüelles y col, (1995) reportaron la obtención de endo y exopectinasas a partir de *Aspergillus niger* con mayor resistencia térmica y al pH por FES que por FEL. Además, detectaron 4 isoformas producidas por FES y sólo 3, cuando el hongo era crecido en FEL.

Minjares Carranco y col (1997), observaron que una PE de 70 kDa producida por una cepa de *Aspergillus niger* en medio líquido, no era sintetizada cuando el microorganismo era crecido en medio sólido.

Los cambios en el número y peso molecular de las isoformas obtenidas en distintas condiciones de fermentación, pueden deberse a diferentes mecanismos de inducción-represión (Shevchik y col, 1999) o diferencias en las modificaciones postraduccionales de las enzimas (por ejemplo distintos grados de glicosilación) ( Neidelmann, 1990; Lis y Sharon, 1993).
Sin embargo, en el presente caso, la tecnología de fermentación (FES o FEL) no pareció influir en la movilidad electroforética de las pectinasas obtenidas a partir de *Aspergillus niger* 148.

Utilizando el Software Molecular Analyst II, se calcularon los pesos moleculares de las enzimas obtenidas (se observó que . En todos los casos, se analizaron dos geles corridos con SDS y se reporta el promedio de los pesos moleculares calculados.

⇒ PL: 48,2 kDa.

⇒ PG 39,1 kDa.

⇒ PE: Al no recuperarse actividad de esta enima, no se pudo determinar su PM. La banda de actividad PE presente en la pectinliasa comercial presentó un PM de 26,9 kDa.

Al respecto de los datos bibliográficos de los pesos moleculares de estas enzimas, se encontraron citas acerca de PL de *Penicillium italicum* cuyo peso fue estimado en 22 kDa por filtración en gel (Alaña et al., 1990); de *Colletotidium gloeosporioides* cuyo PM se estimó por gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en 40kDa (Wattad, 1994); de *Erwinia chrysanteml*, cuyo peso se estimó en 34 kDa, a partir de la clonación del gen correspondiente. Por otra parte, Kim y col (1998), describen una PL de *Bacillus sp* monomérica y de un PM de 52 kDa estimada por SDS-PAGE. Según la página Swiss Prot de Internet, la PL de *Aspergillus niger* presenta dos isoformas de 39 y 39.85 kDa cada una. Existen múltiples genes que codifican para distintas isoformas de esta enzima, ya clonados en diversos hongos (sobre todo de los géneros *Erwinia* y *Aspergillus*). En general, la síntesis de las distintas isoformas es regulada de modo diferente (Shevchik, 1999) y se encuentran diferencias en

las proteínas a nivel estructural (Mayans y col, 1997), lo que explica la variedad de PM encontrados en la literatura para la PL.

Respecto de la PG, se encontraron reportes de una PG de *Verticillium albo-atrum*, cuyo PM se estimó por filtración en gel en 29 kDa (Wang and Keen, 1970). Kester (1990) describió 5 isoformas de PG cuyos PM estimados por SDS-PAGE y filtración molecular fueron de 32 a 59 kD. Otra PG de *Aspergillus sp* fue caracterizada por PAGE obteniéndose un PM de 38 kDa (Stratilova, 1993); mientras que Hang y Woodams (1994) reportaron una PL de *Aspergillus niger* de 34 kDa por filtración en gel y Clausen y Green (1996), usando SDS-PAGE, estimaron en 34 kDa el PM de la PG de *Postia placenta*. El mismo peso fue reportado por Clay y col (1997), para una PG *Cochliobolus sativus* por SDS-PAGE 10%. Schwan y col (1997) encontraron 4 isoformas de PG diferentes en la levadura *Kluveromyces marxianus*, obteniendo PM de entre 33 y 47 kDa por filtración molecular y entre 36 y 45 kDa, por SDS-PAGE. Finalmente, la PG de *Aspergillus niger* descripta por la página de Swiss Prot en Internet, estima su PM en 38.1 kDa.

Los datos bibliográficos respecto del peso molecular de la PE arrojaron las siguientes descripciones: dos isoformas de pomelo de 37.3 y 53.5 kDa estimados por SDS-PAGE (Seymour et. al, 1991); varias isoformas de PE de limón con PM entre 37 y 49 kDa estimados por filtración en gel y por SDS-PAGE; PE de Papaya y de tomate con pesos de 32 y 24 kDa respectivamente (Fayyaz et. al, 1993) estimados por PAGE; PE de mandarina cuyo PM calculado por FPLC se estimó en 37 kDa (Rillo et al, 1992);. Minjares Carranco y col (1997) encontraron una PE de *Aspergillus niger* de 70 kDa. Finalmente, la PE de *A. niger* descripta por la hoja de Swiss Prot en internet, tenía un PM de 35.7 kDa.

En la Figura 29 se muestran los patrones de actividad obtenidos comparando los geles nativos y desnaturalizantes.

Se puede ver que en los geles nativos la PG y la PL no se separan completamente revelando una relación carga/masa muy similar (calles 1, 2 y 3). Sin embargo, en condiciones desnaturalizantes, estas dos enzimas se

separan, lo cual indica que sus PM son diferentes (calles 6, 7 y 8) (PG menor que PL).

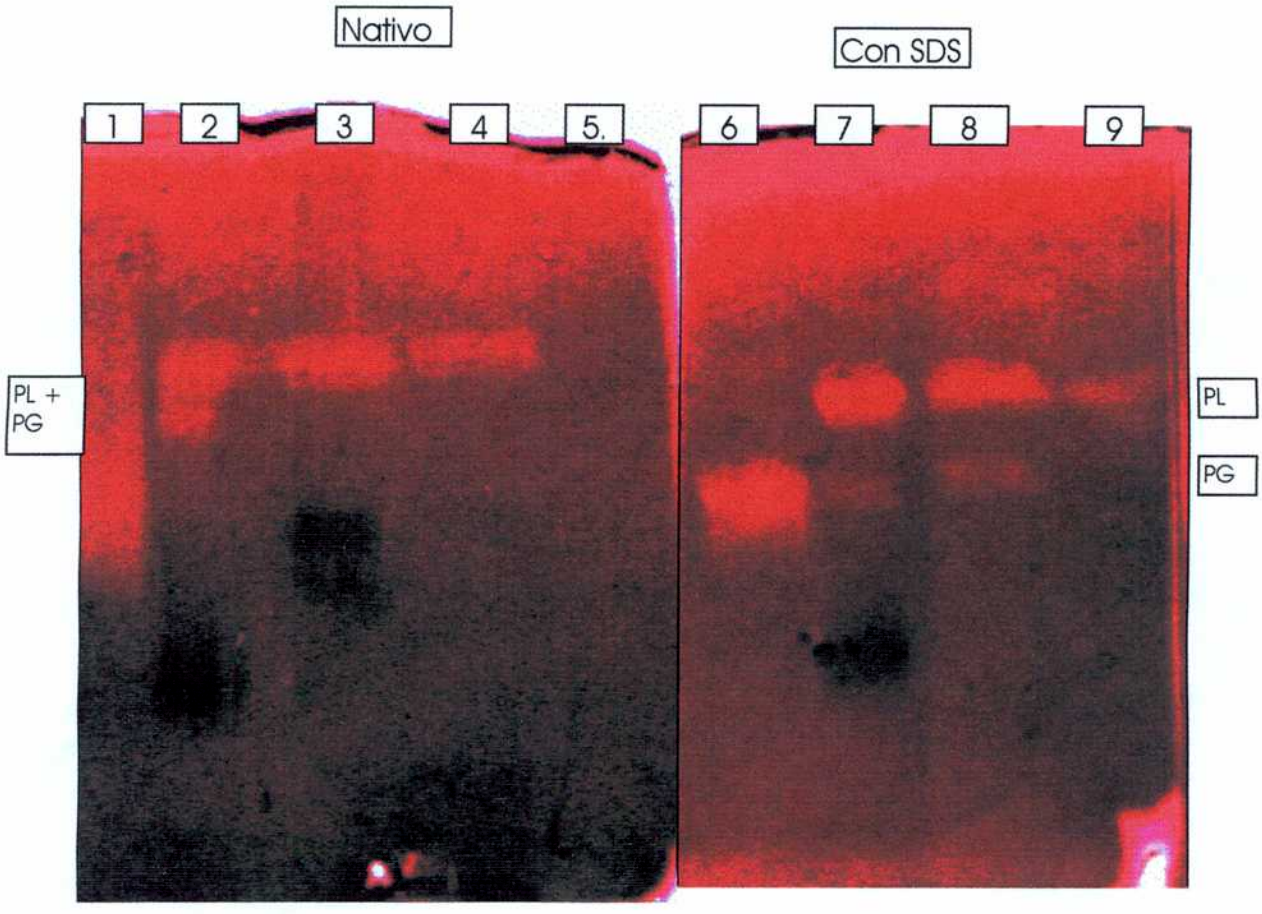



Figura 29: Geles de actividad pectinolítica nativos o desnaturalizantes. Calles 1 y 6: PG purificada comercial (Sigma-Aldrich Inc.); Calles 2 y 7: PL purificada comercial (Sigma-Aldrich Inc.); Calles 3 y 8: Extracto pectinolítico obenido por FEL; Calles 4 y 9: Extracto pectinolítico obenido por FES. Calle 5: Extracto obtenido de un sistema de FES sin inocular

Para dilucidar si la PG y la PL pueden separarse en geles de poliacrilamida pectina nativos, se sembraron los patrones comerciales de estas enzimas en dichos geles, pero en vez de correrlos durante 70 minutos, se los corrió durante 90 minutos, permitiendo una mayor resolución de las bandas de actividad.

Los resultados (Figura 30) muestran que en condiciones nativas, la PG corrió menos que la PL, probablemente debido a que su relación carga/masa es un poco mayor que la de la PL pese a que su peso molecular sea menor.

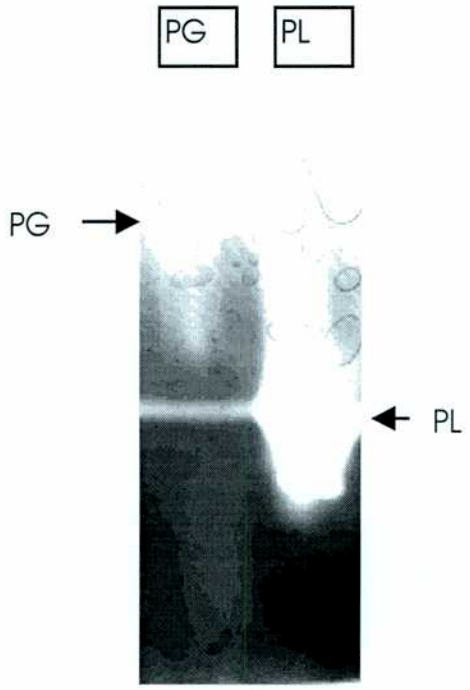



**Figura 30:** Patrón electroforético de PG y PL comerciales corridos 90 minutos en condiciones nativas

# 5. COMPARACIÓN ENTRE FES Y FEL: EFECTO DE LA $a_w$, pH Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS

Existen pocos trabajos en los que se compara la producción de pectinasas por distintas técnicas de fermentación.

Solís Pereira y col. (1993) encontraron que la síntesis de pectinasas es menos sensible a la represión catabólica cuando es obtenida por FES respecto a FEL. Acuña Argüelles y col (1995) reportaron mayor productividad de endo y exo-pectinasas por *Aspergillus niger* en FES, así como también mayor resistencia térmica y al pH de las enzimas producidas. Maldonado y col (1998) hallaron menores tiempos de producción y mayores rendimientos para la obtención de PG y PE a través de fermentación en estado sólido.

La mayoría de los estudios mencionados, se focalizan en el efecto de un factor a la vez (pH, temperatura, $a_w$), pero ninguno examina las interacciones entre los mismos. Dado que estas interacciones pueden ser sinérgicas o antagónicas, podrán favorecer o disminuir el desarrollo de la biomasa y la producción de enzimas. La cuantificación de estos efectos es, por lo tanto, de suma importancia y se puede lograr únicamente aplicando un diseño experimental adecuado.

Es esperable que la $a_w$ óptima para el crecimiento del hongo y la producción enzimática dependa de las interacciones con otros parámetros de crecimiento así como también del sistema de fermentación (sólido o líquido).

La $a_w$, pH y tiempo tienen enorme influencia en diversos procesos como crecimiento, esporulación y producción de enzimas (Davies y Baudoin, 1987; Grajek y Gervais, 1987; Sarrette y col., 1992; Acuña Argüelles y col., 1994), por lo cual se comparó el crecimiento y la producción de pectinasas por la cepa *Asperillus niger* 148 por fermentación en estado sólido y en medio líquido en condiciones variables de $a_w$ inicial, pH inicial y tiempo de fermentación. Para ello, se utilizó la metodología de las superficies de respuesta y un diseño experimental basado en una red de Doehlert.

## *5.1 Crecimiento fúngico*

La biomasa producida durante la fermentación se determinó directamente (por filtración y gravimétría) en FEL o indirectamente (como pérdida de peso seco) en FES. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6 respectivamente.

| Experimento N° | Días de ferment. | pH | $a_w$ | Biomasa total (g) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,5 | 7 | 0,974 | 0,4134 |
| 2 | 2,5 | 5 | 0,974 | 0,3967 |
| 3 | 2,5 | 6,5 | 0,994 | 0,39 |
| 4 | 2,5 | 5,5 | 0,954 | 0,3007 |
| 5 | 2,5 | 6,5 | 0,954 | 0,2752 |
| 6 | 2,5 | 5,5 | 0,994 | 0,4152 |
| 7 | 4 | 6,5 | 0,981 | 0,4507 |
| 8 | 1 | 5,5 | 0,968 | 0,1886 |
| 9 | 1 | 6,5 | 0,968 | 0,1861 |
| 10 | 1 | 6 | 0,987 | 0,1270 |
| 11 | 4 | 5,5 | 0,981 | 0,4698 |
| 12 | 4 | 6 | 0,961 | 0,5537 |
| 13 | 2,5 | 6 | 0,974 | 0,3860 |
| 14 | 2,5 | 6 | 0,974 | 0,3789 |
| 15 | 2,5 | 6 | 0,974 | 0,4021 |

Tabla 5: Matriz experimental (los valores de los niveles de cada factor se muestran sin codificar para facilitar la interpretación) y biomasa observada para FEL.

| Experimento Nº | pH | $a_w$ | Días de ferment. | Biomasa (pérd. peso seco en g) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 0,981 | 5 | 1,20 |
| 2 | 6 | 0,931 | 5 | 0,50 |
| 3 | 6 | 0,968 | 8 | 1,36 |
| 4 | 6 | 0,943 | 2 | 0 |
| 5 | 6 | 0,968 | 2 | 0,10 |
| 6 | 6 | 0,943 | 8 | 0,76 |
| 7 | 7 | 0,968 | 6 | 0,96 |
| 8 | 5 | 0,943 | 4 | 0,84 |
| 9 | 5 | 0,968 | 4 | 1,06 |
| 10 | 5 | 0,955 | 7 | 1,20 |
| 11 | 7 | 0,943 | 6 | 0,25 |
| 12 | 7 | 0,955 | 3 | 0,04 |
| 13 | 6 | 0,955 | 5 | 0,85 |
| 14 | 6 | 0,955 | 5 | 1,04 |
| 15 | 6 | 0,955 | 5 | 0,93 |

Tabla 6: Matriz experimental (los valores de los niveles de cada factor se muestran sin codificar para facilitar la interpretación) y pérdida de masa seca del sistema de FES observada.

A partir de estos resultados se realizó la regresión múltiple utilizando el Software Statgraphic 5.1. Se obtuvo un coeficiente de regresión lineal y otro cuadrático para cada factor y un coeficiente de regresión para la interacción entre cada par de variables. Sólo se retuvieron, en la ecuación final (modelo reducido), los coeficientes significativos ($p < 0,05$), llegándose de este modo a las siguientes expresiones matemáticas que vinculan el crecimiento con el pH, $a_w$ y tiempo de fermentación:

Para FEL:

$$B = 0{,}3895 + 0{,}0273.a_w + 0{,}1990.t - 0{,}0637.a_w^2 - 0{,}0777.t^2$$

$R^2$: 0,901 Lack of fit : significativo

Donde: B es la biomasa en gramos

Para FES:

$$B' = 0{,}94 + 0{,}379.a_w + 0{,}555.t - 0{,}378.pH - 0{,}483.t^2$$

$R^2$; 0,986 Lack of fit : no significativo

Donde: B' es la pérdida de peso seco del sistema como estimador de la biomasa.

En el caso de la fermentación sumergida, se puede observar que el factor que más afecta a la producción de biomasa es el tiempo, ya que los coeficientes relacionados con esta variable son los más altos. El efecto lineal, al ser positivo, indica que a mayor tiempo de fermentación (entre 1 y 4 días), se espera obtener mayor biomasa. El efecto cuadrático, refleja la existencia de una meseta, en cuanto a producción de biomasa, correspondiente a la fase estacionaria de crecimiento.

Por otro lado, la $a_w$ inicial del medio de fermentación, también influye en la producción de biomasa presentando un coeficiente lineal positivo (a mayor $a_w$, mayor producción de biomasa entre 0,954 y 0,993) y un coeficiente cuadrático negativo (existe una $a_w$ óptima para el crecimiento, probablemente cercana a 0,99).

Mildenhall y col (1981) observaron mayor crecimiento para *Erwinia chrysanteml* en fermentación sumergida a $a_w$ 0,99 que a $a_w$ 0,98 o 1 usando manosa o NaCl como depresor de $a_w$.

A simple vista, se observó que a menor $a_w$, menor era el tamaño de los pellets formados por el hongo, de manera similar a lo observado en la sección 2.4 de este capítulo.

El coeficiente $R^2$ observado indica que más del 90% de los resultados pueden ser explicados mediante esta ecuación, mientras que el "lack of fit" significativo es un reflejo de que una ecuación de segundo grado no es capaz de modelar con exactitud la respuesta (producción de biomasa), aunque es capaz de predecirla con bastante eficiencia. De todos modos, aún con un "lack of fit" significativo, el modelo puede ser usado si se tiene suficiente cantidad de datos (Box y Draper, 1987), sobre todo, en vista del alto $R^2$ observado.

Respecto al crecimiento en FES, éste fue afectado principalmente por el tiempo de fermentación (mayores coeficientes lineal y cuadrático), seguido de efectos lineales para $a_w$ y pH inicial. No hubo interacciones significativas entre ningún par de variables.

El coeficiente lineal positivo para el tiempo de fermentación indica que a más tiempo, mayor es la biomasa generada, pero el coeficiente cuadrático negativo, refleja la existencia de la meseta correspondiente a la fase estacionaria de crecimiento.

El efecto lineal positivo de la $a_w$ significa que cuanto mayor sea éste parámetro, mayor será también el crecimiento observado. Esta respuesta ha sido observada por varios autores en sistemas de fermentación sólida para $a_w$ similares a los evaluados en este trabajo (Gervais y col (1998) para *Trichoderma viride* y *Penicillium roqueforti* usando glicerol como depresor; Augur y Viniegra González (1998) para *Aspergillus niger* usando glicerol como depresor de $a_w$; Baxter y col, (1998) para *Phoma sp* usando NaCl o glicerol como depresores de la $a_w$.

El coeficiente lineal y negativo que acompañó a la variable pH inicial, indica que se espera mayor biomasa a pH 5 que a pH 6 o 7. En FEL, el pH no fue una variable que influenciara la producción de biomasa, pero en FES,

debido, probablemente a diferencias en la fisiología para ambos sistemas de fermentación, resultó un factor que afectó el crecimiento.

En la Figura 31, se muestran las superficies de isorespuesta para la máxima producción de biomasa (fase estacionaria) po FEL (a) y FES (b).

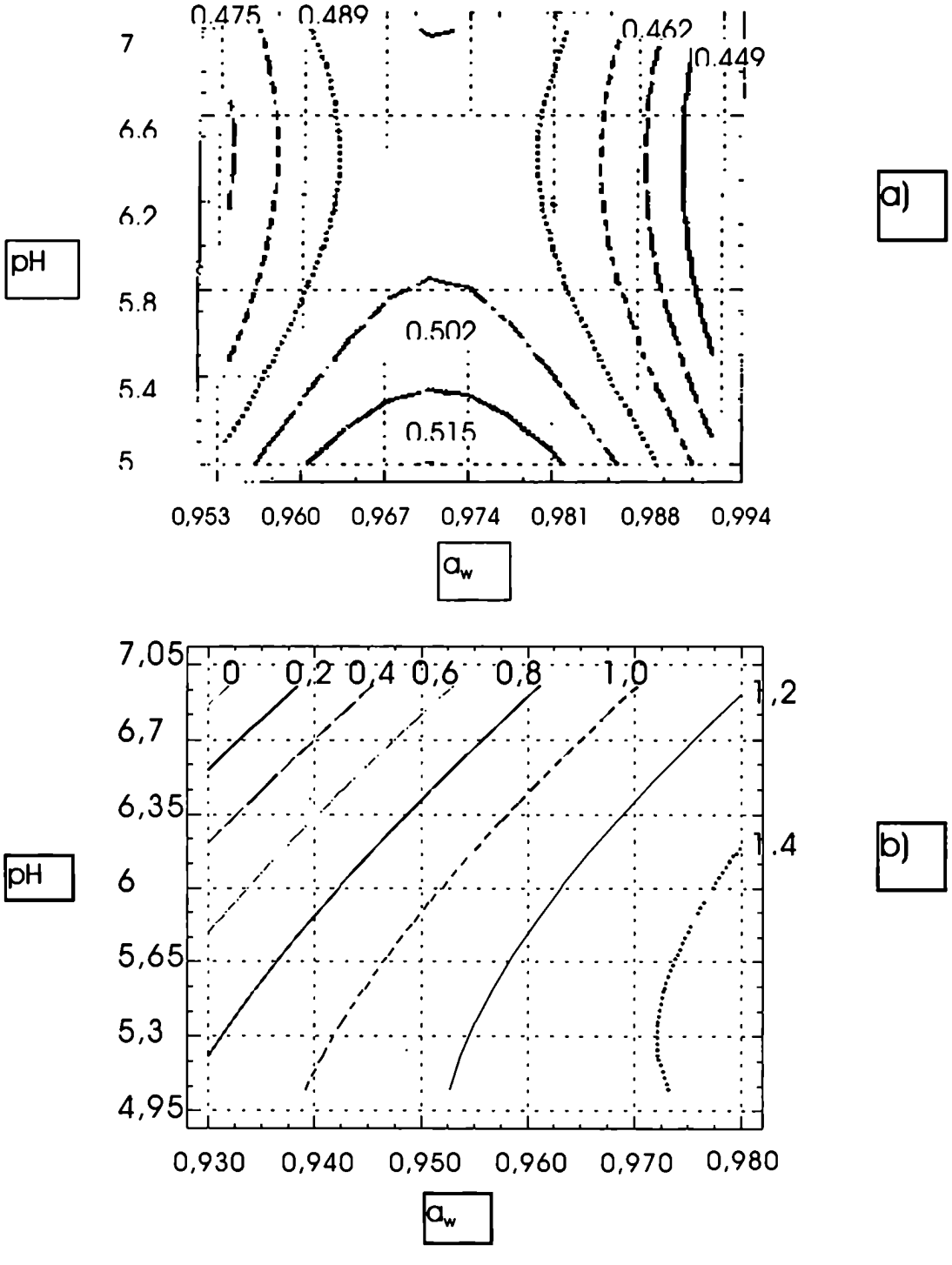



Figura 30: Superficies de isorespuesta para producción de biomasa en estado estacionario. a) g de biomasa por FEL (4 días de fermentación). b) pérdida de peso seco por FES (6 días de fermentación).

En la Figura 31 a), correspondiente a fermentaciones en sistemas sumergidos por 4 días, se aprecia el óptimo en cuanto a producción de biomasa para $a_w$ del orden de 0,975 y se comprueba que el pH no tiene influencia importante en la producción de biomasa.

En la Figura 31 b) (correspondiente a FES realizadas por 6 días), se visualizan los efectos lineales del pH (negativo) y la $a_w$ (positivo).

## *5.2. Producción de pectinasas por FES y FEL*

En las Tablas 7 y 8 se muestran los resultados obtenidos para los dos tipos de fermentación en cuanto a la producción de las tres enzimas del complejo pectinolítico.

A fin de poder comparar las actividades obtenidas por ambas tecnologías de fermentación, se refirió la actividad enzimática a una misma cantidad de sustrato inicial (5 g STi = 5 gramos de salvado de trigo inicial).

Se puede ver que la tecnología de fermentación (FES o FEL) tiene gran influencia en la cantidad y tipo de pectinasas obtenidas.

Si se observan los máximos y mínimos obtenidos para cada tipo de fermentación, se ve que la máxima producción de PL es 3 veces mayor por FES que por FEL , y la de PE, 30% mayor por FES.

Resultados similares han sido reportados por Acuña Argüelles y col (1995) para PE y por Maldonado y col (1998) para PL producidas por otras cepas de *A. niger*. Alkorta y col, (1990) también obtuvieron mayor prducción de PL por FES que por FEL usando una cepa de *Penicillium italicum*.

Respecto de la PG, la producción máxima por FEL fue casi 5 veces mayor que la obtenida por FES, lo cual es diferente de lo reportado por Acuña Argüelles y col. (1995) y Maldonado y col. (1998) para dicha enzima. Esta diferencia puede deberse a las diferentes condiciones experimentales de pH, sustrato y $a_w$ en los que se hizo la comparación entre FEL y FES; de hecho, ambos autores usaron bagaso de caña con un pH inicial de 4,5 y

una humedad de cercana al 70%, lo que corresponde a un $a_w$ muy cercana a 1.

Por otro lado, puede ocurrir que el sistema regulatorio para PE y PL promueva la producción de estas enzimas en FES respecto a la FEL y que la PG sea producida en mayor medida por FEL.

| Experimento Nº | pH | $a_w$ | Días de ferment. | PL (UE/5g STi) | PE (UE/5g STi) | PG (UE/5g STi) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 0,981 | 5 | 28,1 | 1,01 | 4,59 |
| 2 | 6 | 0,931 | 5 | 21,6 | 0,48 | 21,9 |
| 3 | 6 | 0,968 | 8 | 0,4 | 0,79 | 27,5 |
| 4 | 6 | 0,943 | 2 | 5,7 | 0,43 | 0 |
| 5 | 6 | 0,968 | 2 | 10,6 | 0,9 | 0 |
| 6 | 6 | 0,943 | 8 | 6 | 1,14 | 23,8 |
| 7 | 7 | 0,968 | 6 | 3,4 | 0,79 | 17,2 |
| 8 | 5 | 0,943 | 4 | 2,6 | 0,9 | 20,1 |
| 9 | 5 | 0,968 | 4 | 17,2 | 1,05 | 3,14 |
| 10 | 5 | 0,955 | 7 | 5,4 | 0,53 | 5,57 |
| 11 | 7 | 0,943 | 6 | 10,9 | 0,4 | 7,45 |
| 12 | 7 | 0,955 | 3 | 21,7 | 0,37 | 0 |
| 13 | 6 | 0,955 | 5 | 10,8 | 1,15 | 8,85 |
| 14 | 6 | 0,955 | 5 | 9,2 | 1,05 | 11,54 |
| 15 | 6 | 0,955 | 5 | 9,3 | 0,94 | 11,39 |

Tabla 7: Matriz experimental y producción de pectinasas por FES (los valores de los niveles de cada factor se muestran sin codificar para facilitar la interpretación)

| Experimento Nº | pH | $a_w$ | Días de ferment. | PL (UE/5g STi) | PE (UE/5g STi) | PG (UE/5g STi) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 7 | 0,974 | 2,5 | 2,89 | 0,51 | 73,2 |
| 2 | 5 | 0,974 | 2,5 | 6,8 | 0,65 | 45,8 |
| 3 | 6,5 | 0,993 | 2,5 | 9,9 | 0,58 | 78,5 |
| 4 | 5,5 | 0,954 | 2,5 | 4,3 | 0,33 | 64,4 |
| 5 | 6,5 | 0,954 | 2,5 | 3,4 | 0,84 | 114,4 |
| 6 | 5,5 | 0,993 | 2,5 | 8,5 | 0,07 | 113,1 |
| 7 | 6,5 | 0,982 | 4 | 9,6 | 0,6 | 58,2 |
| 8 | 5,5 | 0,968 | 1 | 2,5 | 0,16 | 33,4 |
| 9 | 6,5 | 0,968 | 1 | 3,5 | 0,69 | 24,8 |
| 10 | 6 | 0,989 | 1 | 3,8 | 0,1 | 130 |
| 11 | 5,5 | 0,982 | 4 | 9,9 | 0,81 | 50,7 |
| 12 | 6 | 0,961 | 4 | 10,7 | 0,73 | 44,3 |
| 13 | 6 | 0,974 | 2,5 | 6,6 | 0,21 | 113,9 |
| 14 | 6 | 0,974 | 2,5 | 7,1 | 0,21 | 121,1 |
| 15 | 6 | 0,974 | 2,5 | 6,3 | 0,18 | 111,2 |

Tabla 8: Matriz experimental y producción de pectinasas por FEL (los valores de los niveles de cada factor se muestran sin codificar para facilitar la interpretación)

El hecho de que la tecnología de fermentación influya de distinto modo en la producción de enzimas ha sido documentado por varios autores, ya que se postulan diferencias regulatorias en ambos sistemas de fermentación.

Por ejemplo, Shankaranand y col. (1992), estudiaron la producción de distintos metabolitos secundarios por bacterias y observaron que de 51 cepas estudiadas, sólo 3 producían eficientemente en ambos sistemas de fermentación, mientras que las 48 restantes, eran mucho mejores productoras en un sistema que en el otro. Antier y col. (1993 a), realizaron mutagénesis de una cepa de *Aspergillus niger* para obtener cepas hiperproductoras de

pectinasas y observaron que las hiperproductoras en FES no lo eran en FEL y viceversa.

### 5.2.1. Modelo de regresión

Mediante análisis de regresión lineal múltiple, se obtuvieron los coeficientes de regresión para cada variable dependiente, que se detallan en la Tabla 9.

| | FES | | | FEL | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Factor | Activ. PL | Activ. PE | Activ. PG | Activ. PL | Activ. PE | Activ. PG |
| Constantes | 9,77 | 1,05 | 10,59 | 6,68 | 0,200 | 115,4 |
| Lineales | | | | | | |
| pH | 2,21** | -0,19* | (-0,84) | -0,83** | 0,133** | 8,59* |
| $a_w$ | 2,43** | 0,22* | -4,74** | 2,3** | -0,163** | 18,83** |
| Tiempo (t) | -4,89** | (0,1) | 12** | 4,16** | 0,243** | -7,07* |
| Cuadráticos | | | | | | |
| $pH^2$ | (-0,49) | -0,43** | (-3,71) | -1,84** | 0,380** | -55,87** |
| $a_w^2$ | 15,08** | -0,3* | (2,63) | (0,37) | 0,213** | (-11,7) |
| $Tiempo^2$ | -10,48** | (-0,21) | (2,09) | (0,34) | 0,324** | -70,99** |
| Interacciones | | | | | | |
| pH . $a_w$ | -11,39** | (0,3) | 15,6** | 1,37* | (0) | -48,85** |
| pH . tiempo | -16,15** | 0,51* | 12,81** | (-1,24) | -0,453** | 27,38** |
| $a_w$ . tiempo | -6,06** | -0,47** | (2,16) | (-0,48) | 0,153* | -48,73** |
| $R^2$ | 0,93 | 0,89 | 0,85 | 0,89 | 0,79 | 0,84 |
| Lack of fit | ** | NS | ** | ** | ** | ** |

Tabla 9 : Coeficientes de regresión del modelo para las tres actividades pectinolíticas

En casi todos los casos los coeficientes $R^2$ fueron mayores a 0,80 (para PE obtenida por FEL fue de 0,79) lo que significa que los modelos fueron capaces de explicar más del 80% de las respuestas observadas. En casi todos los casos, el test de "lack of fit" fue significativo lo que significa que el orden de la ecuación no era secundario (el modelo no había incluido todas las funciones apropiadas de las variables independientes o el dominio experimental era demasiado grande para usar un modelo cuadrático). De todos modos, aún con un "lack of fit" significativo, el modelo puede ser usado si se tiene suficiente cantidad de datos (Box y Draper, 1987). Los altos coeficientes $R^2$ fueron considerados como evidencia de la aplicabilidad de cada modelo en el rango de estudio.

Los coeficientes con $p < 0,05$ fueron utilizados para elaborar las ecuaciones de regresión reducidas, que se muestran en la Tabla 10.

| | |
|---|---|
| FES | $PL = 9,8 + 2,2.\ pH + 2,4.\ a_w - 4.9.\ t + 15,1.\ a_w^2 - 10,5.\ t^2 - 11,4\ pH.a_w - 16,2\ pH.t - 6\ a_w.t$<br>$PE = 1,05 - 0,43\ pH^2 - 0,47\ a_w.t$<br>$PG = 10,59 - 4,74.\ a_w + 12\ .t + 15,6\ pH.\ a_w + 12,81\ pH\ .t$ |
| FEL | $PL = 6,68 - 0,83\ .pH + 2,3.\ a_w + 4,16.\ t - 1,84\ .pH^2$<br>$PE = 0,200 + 0,133.pH - 0,163\ .a_w + 0,243.\ t + 0,380.pH^2 + 0,213\ .a_w^2 + 0.324.\ t^2 - 0,453.pH.\ t$<br>$PG = 115,4 + 18,8\ .a_w - 55,87.\ pH^2 - 70,99.\ t^2 - 48,85\ .pH\ .a_w + 27,38\ pH.\ t - 48,73\ a_w.t$ |

Tabla 10 : Modelos reducidos para la producción de pectinasas por FEL y FES

**Fermentación en estado sólido**

Los coeficientes de regresión para producción de PL mostraron que $a_w$, pH y tiempo tienen efecto lineal y $a_w$ y tiempo presentan efectos cuadráticos. Se observaron interacciones entre las tres variables independientes. Los mayores

coeficientes fueron $a_w{}^2$ ($b_5$=15,1) y (pH.t) ($b_8$=16,15) lo que indica que son las variables más importantes que afectan la producción de PL en las condiciones estudiadas. El pH tiene sólo efecto lineal y su valor positivo indica que la producción de PL es mayor a mayor pH inicial. El término cuadrático y positivo de $a_w$ sugiere que la producción de PL decrece con la $a_w$ hasta llegar a un mínimo. Por el contrario, el término cuadrático negativo para tiempo de fermentación muestra la existencia de una máxima producción en función del tiempo. Tal vez, la enzima es degradada por proteasas o es simplemente inestable a las condiciones de fermentación. Delgado y col (1992) y Kim y col, (1998) han reportado que la obtención de PL presenta un máximo en el tiempo y una caída subsiguiente.

Los valores negativos de los coeficientes de interacción, sugieren efectos antagónicos entre todas las variables independientes.

Para la producción de PE, el pH tiene un efecto cuadrático negativo, lo que indica la existencia de un pH óptimo para la producción de esta enzima.

La única interacción significativa, se detectó entre $a_w$ y tiempo de fermentación y al ser negativo, mostró un efecto antagónico entre estas dos variables.

El tiempo y la $a_w$ tienen efectos lineales en la producción de PG, siendo el tiempo la variable lineal de más peso como lo muestra su mayor coeficiente. Al ser este coeficiente positivo se puede inferir que la producción de PG aumenta con el tiempo de fermentación.

Las interacciones que se detectaron fueron entre pH y $a_w$, y entre pH y tiempo. En ambos casos, los coeficientes muy altos y positivos mostraron un efecto sinérgico muy importante.

**Fermentación en estado líquido**

Para la producción de PL se detectaron efectos lineales significativos para las tres variables estudiadas, en tanto que sólo el pH mostró un efecto cuadrático negativo. No se detectaron interacciones entre las variables. El tiempo fue la variable de mayor influencia en la producción de esta enzima (mayor coeficiente) seguido por la $a_w$.

La producción de PE fue afectada (efectos lineales y cuadráticos) por las tres variables independientes. Los valores positivos de los tres coeficientes cuadráticos sugieren la existencia de una mínima producción de PE en función de pH, $a_w$ y tiempo.
La interacción negativa entre pH y tiempo muestra el antagonismo entre estas variables mientras que la interacción positiva entre $a_w$ y tiempo muestra un efecto sinérgico.

Para la actividad PG, se ve que la $a_w$ tiene un efecto positivo muy importante (mayor producción de esta enzima a altas $a_w$) mientras que pH y tiempo muestran efectos cuadráticos negativos indicando la existencia de un máximo de producción en función de cada una de estas variables. Los términos de interacción fueron significativos para los tres pares de variables (existió antagonismo entre pH y $a_w$, y entre $a_w$ y tiempo; y sinergismo entre pH y tiempo).

## *5.3. Optimización de las condiciones para la obtención de un extracto pectinolítico rico en PL*

Se generaron las superficies de contorno para cada enzima y técnica de fermentación en función del pH y $a_w$ iniciales, fijando la variable tiempo en 2, 3 o 4 días.

El procedimiento de optimización se basó en buscar las condiciones para una mínima producción de PE y una máxima producción de PL, independientemente del nivel de PG obtenido.

Para ello, las superficies de isorespuesta para cada enzima (a cada tiempo y por cada tipo de fermentación) se superpusieron (Figuras 32 a-c y 33 a-c). Las zonas sombreadas indican las condiciones de $a_w$ y pH para obtener un extracto enzimático con alta actividad PL y baja actividad PE.

Para FES, las condiciones óptimas fueron bajas $a_w$ (0,93- 0,94) y altos pH (6,5 – 7) a los tres tiempos analizados. En esas condiciones, se pudieron obtener 30 UE PL/5g STi (3 días de fermentación) o 36 UE PL/5g STi (2 días de fermentación) sin producción significativa de PE ni PG. Como para mayores tiempos de fermentación, los máximos de PL disminuyeron y los mínimos de PE aumentaron, no se analizaron las superficies de respuesta a tiempos mayores.

Para FEL, la zona sombreada se encuentra a $a_w$ mayores que 0,99 y pH cercano a 6. La producción enzimática obtenida para esas condiciones fue:

⇒ 2 días: 8 UE PL/5g STi; 0,18 UE PE/5g STi y 120 UE PG/5g STi

⇒ 3 días: 9,5 UE PL/5g STi; 0,36 UE PE/5g STi y 96 UE PG/5g STi

⇒ 4 días: 11,5 UE PL/5g STi; 0,7 UE PE/5g STi y 20-45 UE PG/5g STi

Esto indica que para el proceso realizado por FEL se podría obtener un extracto con alta actividad PL (aunque no la mayor) y baja actividad PE (aunque no la menor) a los 3 días de fermentación. Concomitantemente esos extractos tendrían una alta actividad PG, lo que ayudaría a despolimerizar la molécula de pectina.

Comparando las isorespuestas para biomasa (Figura 31) y producción enzimática (Figuras 32 y 33), se puede apreciar que para ambas tecnologías de fermentación, las condiciones para obtener mayor producción de PL no coinciden con las que redundan en mayor producción de biomasa.

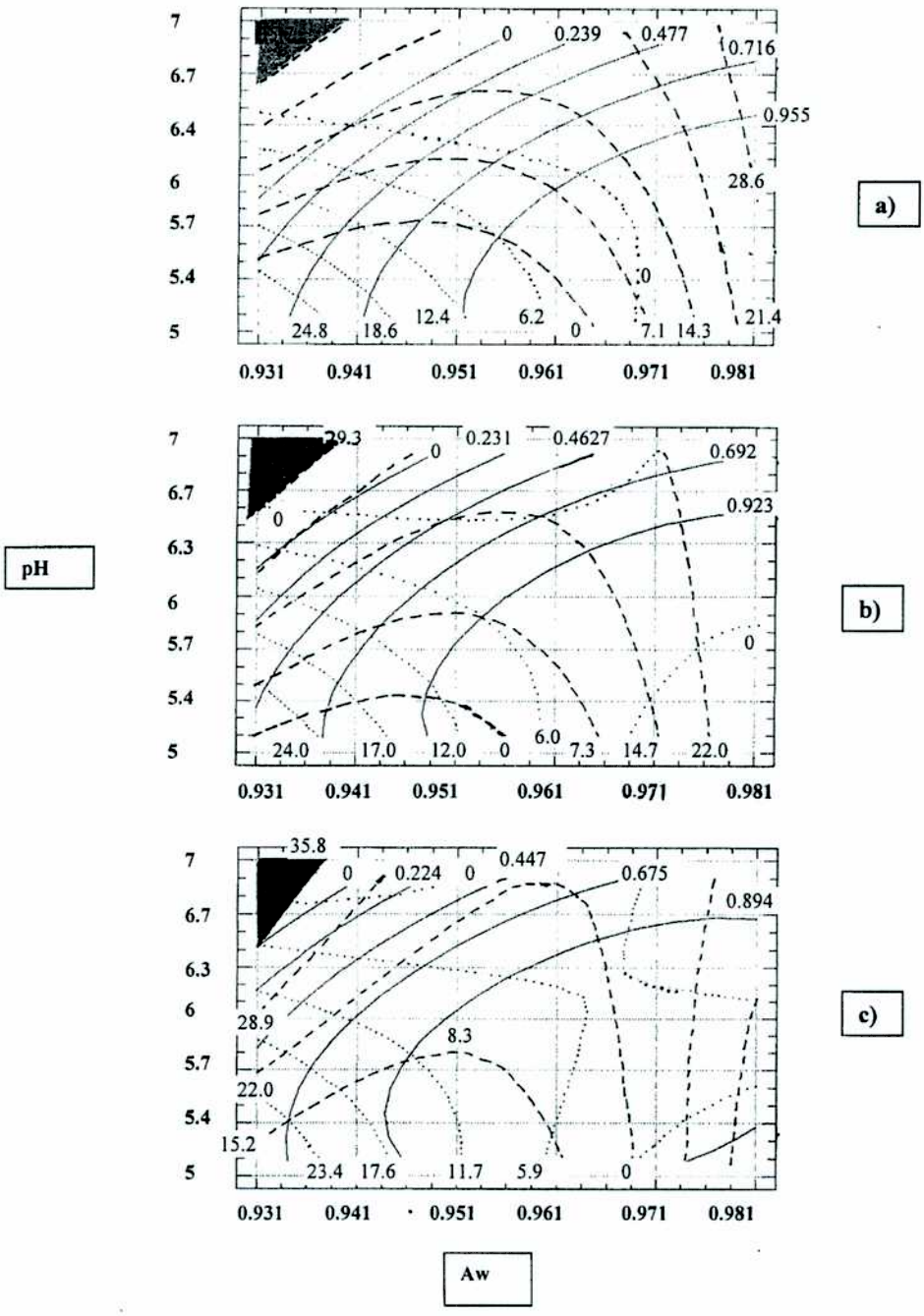



Figura 32: Superficies de isorespuesta para producción de pectinasas por FES. a) 2 días; b) 3 días, c) 4 días. ____: PE; - - - : PL; .....:PG.

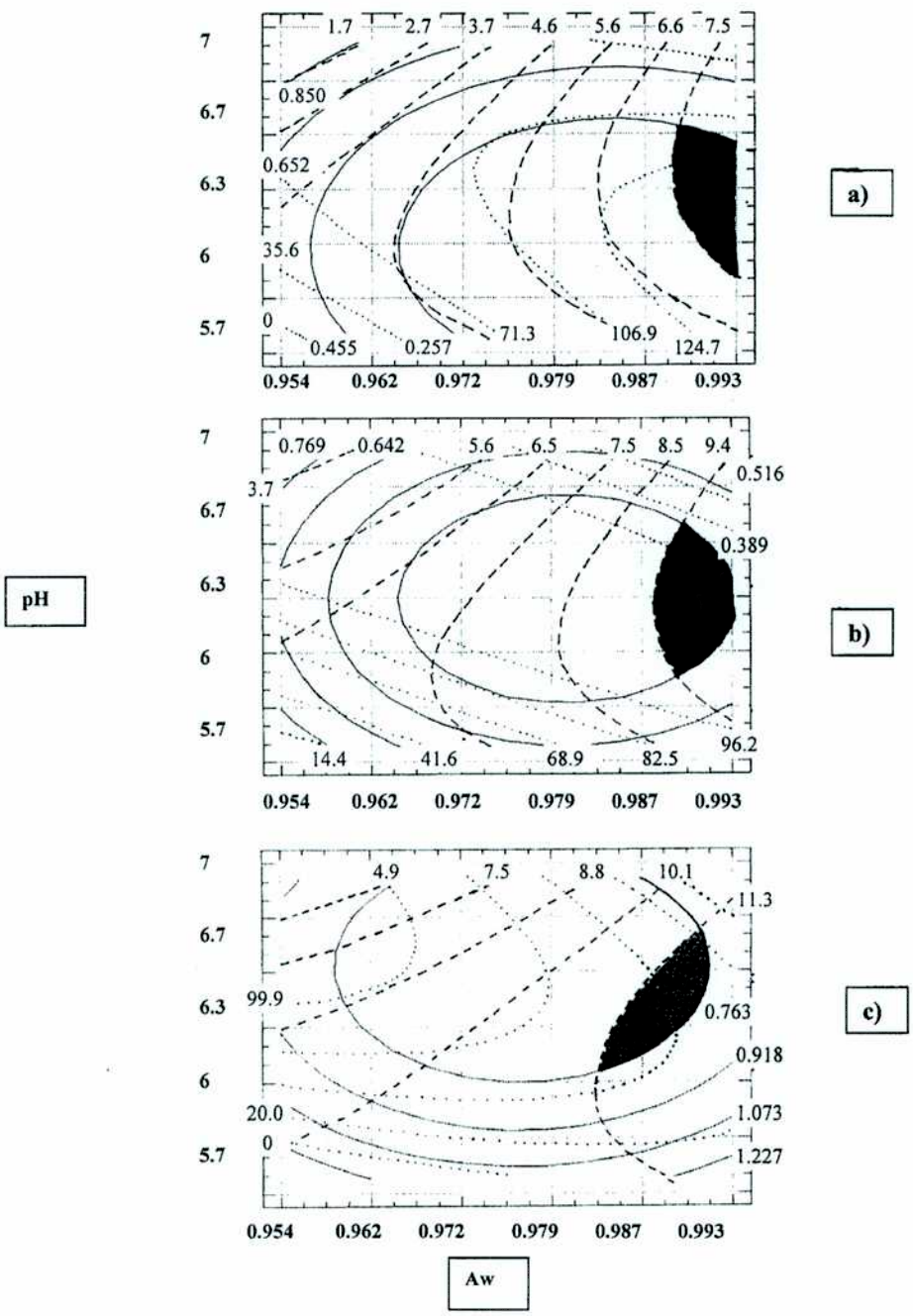



Figura 33: Superficies de isorespuesta para producción de pectinasas por FEL. a) 2 días; b) 3 días, c) 4 días._____: PE; - - - : PL; .....:PG.

## 5.4. Validación de los modelos de regresión

Se realizaron varias fermentaciones en distintas condiciones escogidas dentro del dominio experimental (tanto FES como FEL).

Utilizando electroforesis en geles de pectina- poliacrilamida se testeó la composición de pectinasas obtenidas, respecto de las composiciones predichas por los modelos.

La Figura 34 b) muestra las actividades pectinolíticas obtenidas en los extractos enzimáticos de las distintas fermentaciones (calles 1 y 2: FEL; calles 3, 4, 5: FES).

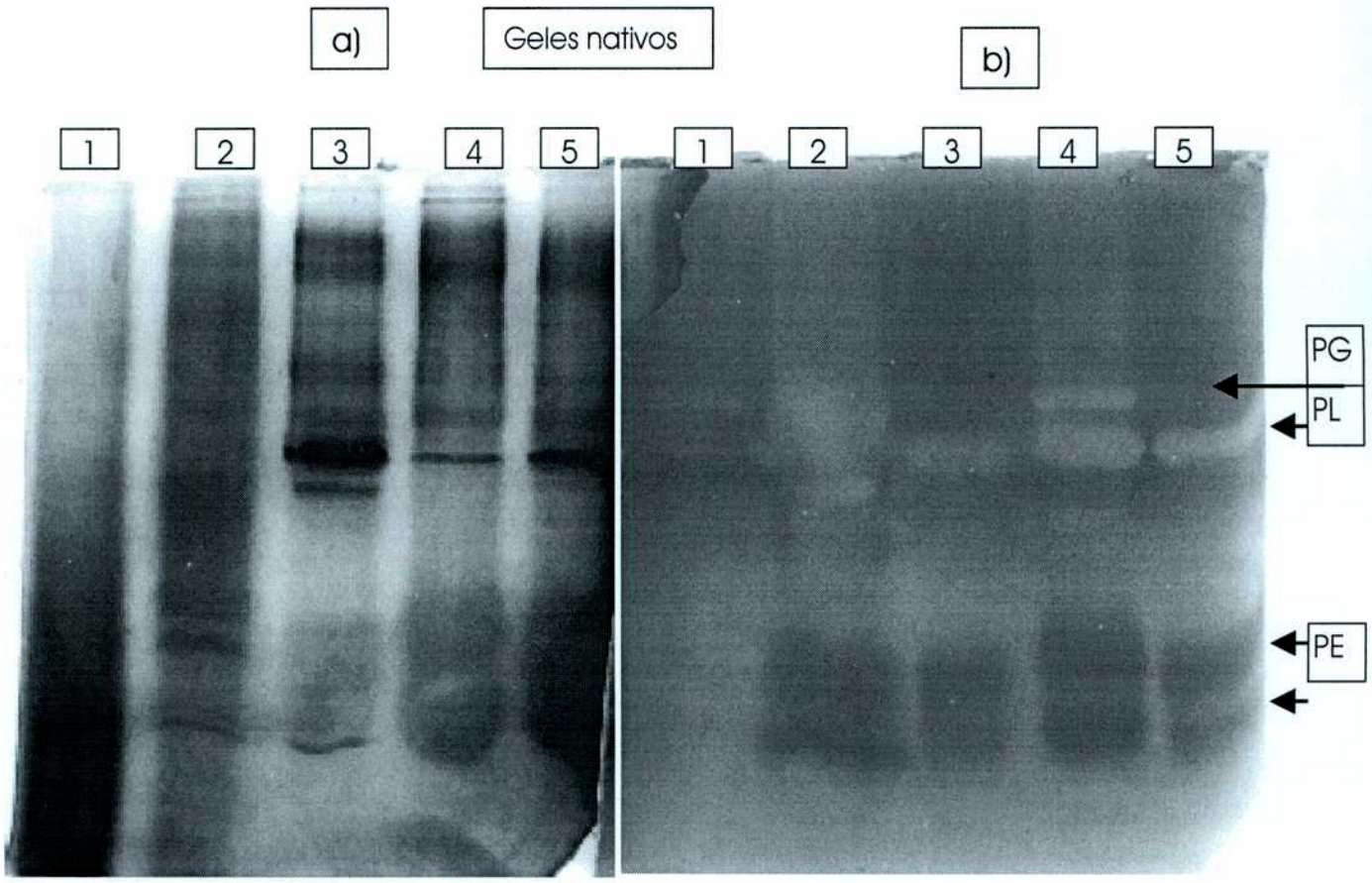



Figura 34: PAGE Nativos para distintas condiciones de fermentación. a) Tinción para proteínas; b) Tinción para actividad pectinolítica. Calle 1:FEL: $a_w$ 0,993; pH 5,8; 3 días.Calle 2: FEL: $a_w$ 0,958, pH 7; 2 días.Calle 3: FES: $a_w$ 0,981, pH 6,95,3 días.Calle 4: FES: $a_w$ 0, 941, pH 4,8, 3 días.Calle 5: FES: $a_w$ 0,972; pH 5; 3 días

La técnica de detección de la actividad pectinolítica se basa en la capacidad de la PG y la PL de degradar la pectina del gel y de la capacidad del rojo de rutenio de, subsecuentemente, precipitar y teñir la pectina no degradada (Sterling 1970). De este modo, la acción de PL y PG, se visualiza como una zona blanca en un fondo rosado (PL se encuentra debajo de PG).

La actividad de PE se visualiza como zonas de tinción más intensa que el fondo de pectina aún metilada. En ambos tipos de fermentaciones, se detectaron dos isoformas de PE (Calles 2 – 5).

La calle 1 corresponde a una fermentación en medio líquido llevada a cabo por 3 días a $a_w$ inicial 0,993 y pH 5,8. Se observó la existencia de actividad PL y PG y la ausencia de PE tal como se esperaba del modelo de regresión (Figura 34 b).

La calle 2, que corresponde a una FEL realizada por 2 días a $a_w$ 0,958 y pH 7, muestra la presencia de actividades PE y PG y no se detecta actividad PL, coherentemente con la predicción del modelo (Figura 34 a).

Las calles 3-5 corresponden a FES realizadas por 3 días a diferentes $a_w$ y pH iniciales. A $a_w$ 0,981 y pH 6,95 (calle 3) o a $a_w$ 0,972 y pH 5 (calle 5) se verificaron en el gel las composiciones enzimáticas predichas (Figura 34 b), es decir, sólo se detectó actividad de PL y PE.

La calle 4 no fue considerada ya que el pH inicial de la fermentación (4,8) cayó fuera del dominio experimental.

Se concluye que el modelo obtenido a partir del diseño experimental utilizado, permite una muy buena predicción de las actividades pectinolíticas obtenidas en las diferentes condiciones de fermentación.

## *5.5. Patrones electroforéticos de proteínas en FES y FEL*

En la Figura 34 a) se muestran los distintos patrones electroforéticos obtenidos según las condiciones y tipo de fermentación.

En las calles 1 y 2, correspondientes a extractos obtenidos por procesos de FEL, se observaron muchas más bandas de proteínas que en los extractos obtenidos a partir de fermentaciones en estado sólido (calles 3 a 5). Acuña Argüelles y col (1995) y Minjares Carranco y col (1997) también observaron la producción de mayor variedad de proteínas por FEL que por FES para *Aspergillus niger*.

Las pectinasas no fueron las proteínas mayoritariamente secretadas por el hongo cuando era crecido por FEL, en cambio, en los procesos de FES, las pectinasas representaron un porcentaje mucho mayor de las proteínas extracelulares. Particularmente, para el proceso de FES de $a_w$ 0,981 y pH 6,95 (calle 3), la banda proteica correspondiente a PL representó el 65% de las proteínas totales (cálculo densitométrico). Existen varios reportes en los que se describe la obtención de diferentes patrones electroforéticos a partir de la misma cepa según la técnica de fermentación utilizada, como se discutió en la sección 4.

De los resultados descriptos en la presente sección se puede concluir que:

⇒ La técnica de FES resultó más adecuada que la de FEL para obtener PL a partir de la cepa seleccionada de *Aspergillus niger*. La producción de PG, en cambio, fue altamente favorecida por los procesos de FEL. Sin embargo, en lo que hace a las proteínas extracelulares obtenidas, los procesos de FES redundarían en la obtención de pectinasas como proteínas extracelulares mayoritarias. Esto es importante desde el punto de vista de la simplificación de los procesos de purificación del producto final. La diferente respuesta de cada enzima puede deberse a diferencias en la

regulación de su síntesis (por ejemplo distinta sensibilidad a la represión catabólica, al pH o a la $a_w$).

⇒ El pH, $a_w$ y tiempo de fermentación, mostraron ser variables claves para cada tipo de fermentación (FES o FEL), y el control de los valores iniciales de las mismas, permitió obtener extractos pectinolíticos con la composición deseada. EL diseño experimental basado en una red de Doehlert, probó ser una excelente herramienta para lograr este propósito. En particular, si la FES se desarrolla en condiciones iniciales de $a_w$ y pH 0,981 y 6,5-7 respectivamente, se puede obtener un extracto enzimático que contiene PL mayoritariamente, en una concentración de alrededor de 0,25 g/l (calculado a partir de la Figura 32 a teniendo en cuenta que en cada calle se sembraron 15 μg de proteínas en 20 μl de la dilución apropiada del extracto enzimático y que el 65% de éstas es PL). Esta concentracion está en el rango de proteínas heterólogas producidas por sistemas conteniendo cDNA de enzimas subclonadas en vectores de expresión y secreción (Cheng y col, 1991; Ebisu y col,1993). Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que optimizando las condiciones de FES, se puede obtener como proteína mayoritaria α-amilasa de *Aspergillus oryzae* (Terebiznik, 1998) y proteasa ácida de *Aspergillus niger* (Sánchez, 1999) lo cual prueba la buena performance de la FES para la obtención de proteínas de interés biotecnológico.

# Capítulo 2: Estabilidad de la pectinliasa deshidratada al almacenamiento

# 1. ESTUDIO DE LAS TRANSICIONES TÉRMICAS DEL EXTRACTO PECTINOLÍTICO.

Una vez encontradas las condiciones de fermentación en medio sólido necesarias para obtener un extracto que contuviera mayoritariamente PL (65% del total de proteínas del extracto) se estudió la estabilidad de dicha enzima en el extracto concentrado, semipurificado por ultrafiltración y liofilizado . Estos estudios son útiles para predecir la vida útil de la enzima en diferentes condiciones de almacenamiento.

La ultrafiltración es una técnica de purificación para proteínas que asegura una buena recuperación de actividad en el caso de enzimas debido a las condiciones operacionales (fundamentalmente, la baja temperatura) (Szczodrak Wiater, 1998). Por otro lado, al remover los solutos de bajo peso molecular, es posible aumentar la temperatura de transición vítrea del sistema con el consecuente aumento de su estabilidad. Terebiznik y col (1998 b), observaron que un extracto ultrafiltrado de *Aspergillus oryzae* presentó una mayor termoresistencia de sus enzimas α-amilasa y α-glucosidasa que el extracto sin ultrafiltrar. Por otro lado, la estabilidad de los extractos ultrafiltrados era aumentada con el agregado de 1-5% de trealosa, mientras que los extractos crudos sólo presentaban aumento de estabilidad con el agregado de más de 15% de trealosa.

El extracto rico en PL obtenido por FES, se ultrafiltró, por lo tanto, usando un tamaño de poro de 10 kDa. En estas condiciones, el 78% de los sólidos del extracto crudo fueron eliminados, no encontrándose proteínas en el percolado. El 22% de los sólidos retenidos en el ultrafiltrado (peso molecular mayor que 10 kDa) contenía, a su vez un 40 % de proteínas, de las cuales, el 65% correspondía a la PL. Finalmente, el extracto ultrafiltrado se liofilizó.

Se caracterizaron las transiciones térmicas del extracto enzimático deshidratado con distintos niveles de humedad/$a_w$. La temperatura de transición vítrea (Tg), la temperatura aparente del inicio de la

desnaturalización (Ti), la temperatura del pico endotérmico correspondiente a la desnaturalización (Tp) y el ΔH asociado, se evaluaron de los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido a una velocidad de calentamiento (β) de 10 K/min (Figura 1).

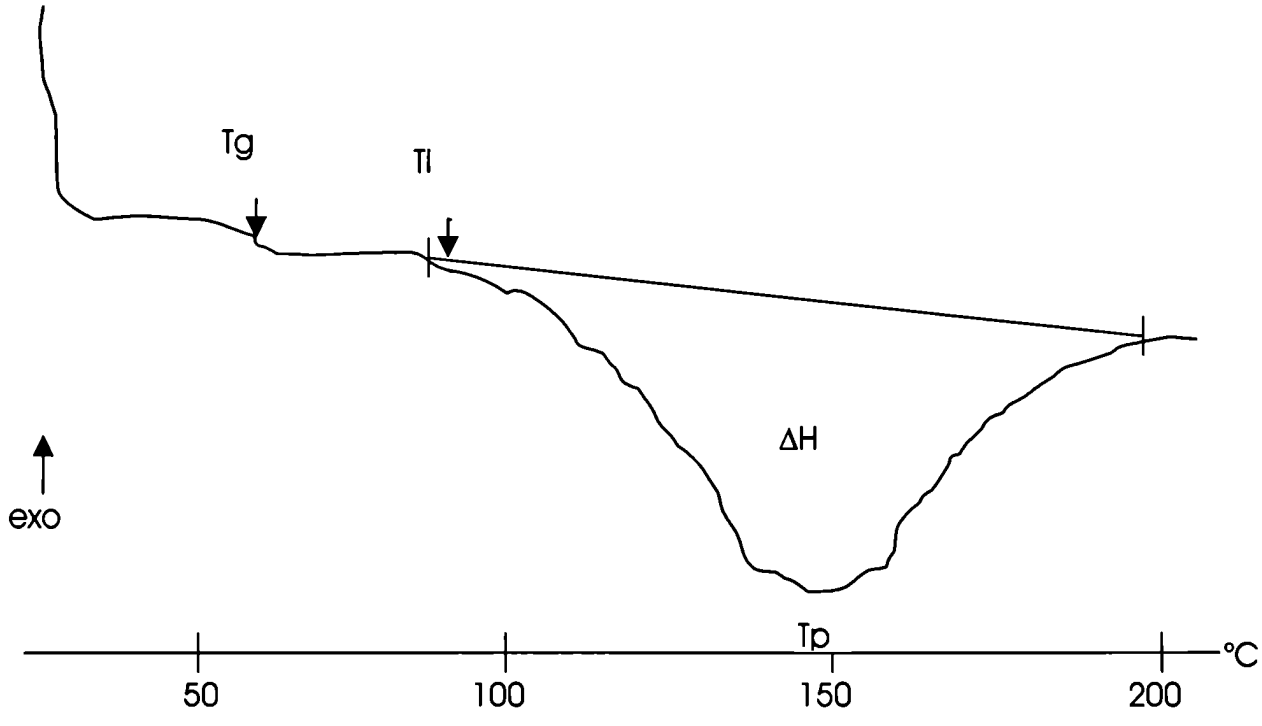



Figura 1: Ejemplo de termograma obtenido para un extracto pectinolítico deshidratado con 0,8% de humedad (base hum.).

Dado que la PL es la proteína mayoritaria del extracto (65% de las proteínas totales), las transiciones observadas en los termogramas estarían vinculadas principalmente a la enzima de interés.

## *1.1. Isoterma de sorción del extracto pectinolítico deshidratado*

En la Figura 2 se muestra la isoterma de adsorción del extracto liofilizado realizada a 25°C. Se puede observar que hay una zona de la isoterma en la que un mínimo cambio de humedad conlleva un gran cambio en la $a_w$ (entre $a_w$ 0,33 y 0,65).

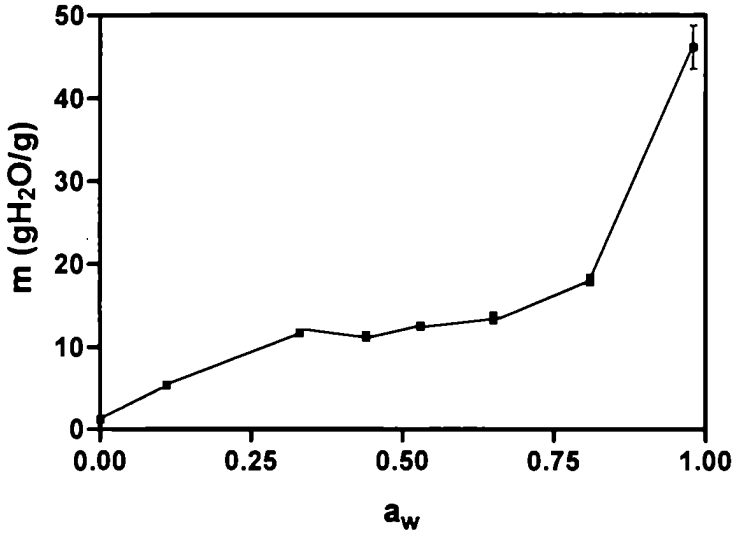



Figura 2: Isoterma de adsorción del extracto pectinolítico (25°C)

A $a_w$ del orden de 0,98, se observa que el extracto deja de tener un aspecto sólido, tomando una apariencia de jarabe debido al fenómeno de disolución de solutos.

## *1.2. Efecto de la humedad y $a_w$ en las transiciónes térmicas del extracto deshidratado*

### 1.2.1. Temperatura de desnaturalización

En la Figura 3 se aprecia la influencia de la humedad en la Tp de las proteínas del extracto en estudio y en la Figura 4 se observa cómo Tp es influenciada por la $a_w$.

Se puede apreciar cómo el aumento del contenido de agua o $a_w$ del sistema torna más termosensibles a las proteínas produciendo una disminución de Tp.
Si se compara el efecto de humedad (Figura 3) con el de $a_w$ (Figura 4) sobre Tp, se ve que en el primer caso, la disminución de Tp sigue una función de decaimiento exponencial, mientras que en el segundo caso es proporcional al aumento del contenido de agua.
Esto se debe principalmente a que en la Figura 3 se incluyeron tres puntos con humedades superiores a 40% donde el extracto asume un aspecto líquido.
En el caso de la disminución de Tp con el aumento de la $a_w$, la respuesta lineal es descripta adecuadamente por la ecuación:

$$Tp = 135,3 - 54,5.a_w \qquad R^2 = 0,939$$

Extrapolando a partir de esta ecuación se estimaría la Tp para $a_w$ ="0" en 135°C.
La respuesta de Td vs. humedad (m), en cambio, sigue un decaimiento exponencial descripto por la ecuación:

$$Tp = 83,8.e^{-0,073.m} + 73,4 \qquad R^2 = 0,968$$

Donde 73,4°C es la Tp asintótica para altas humedades. La constante 0,073 describe como los cambios de humedad afectan la Tp (Sessa y col, 1992). A partir de esta ecuación, se puede estimar la Tp para humedad "cero" en aproximadamente 157°C.

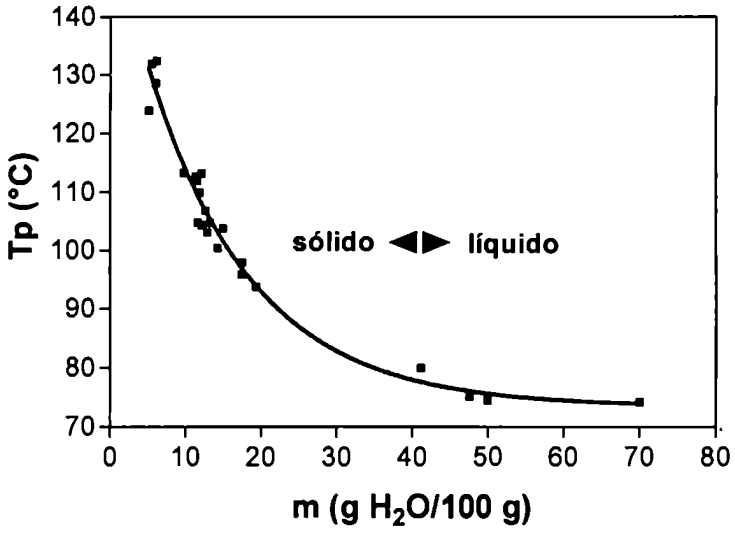



Figura 3: Efecto de la humedad en Tp. (β: 10 K/min)

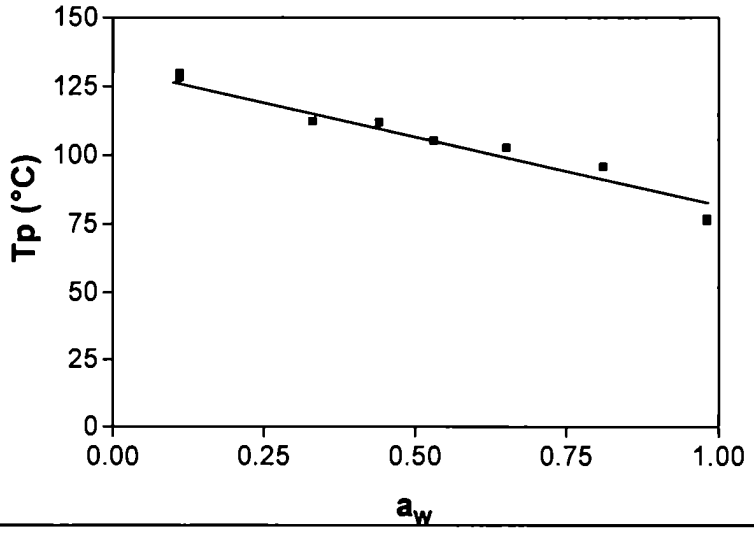



Figura 4: Efecto de la $a_w$ en Tp. (β: 10 K/min)

La Tp disminuyó desde 130°C a $a_w$ 0,11 o 5% de humedad hasta 75°C a $a_w$ 0,98 o humedades mayores que 40% siendo más brusca la disminución mientras el extracto se encontró en forma sólida. Cuando la humedad es tal que el extracto tiene la consistencia de un jarabe ($a_w \geq 0,98$ o humedad ≥40 %) o sea que se encuentra en estado líquido, el aumento de la cantidad de agua no cambió significativamente la Tp (Figura 3). Esto sugiere que el estado

físico del sistema (sólido o líquido) tiene una profunda influencia en la desnaturalización.

En estado sólido, debido al efecto plastificante del agua, al aumentar la humedad, aumenta la movilidad de las moléculas, con lo cual se necesita menos energía para que la proteína se despliegue y desnaturalice y por eso la temperatura de desnaturalización disminuye (Mohazev, 1993; Bell,1997; Hancock y Zografi, 1997). La plastificación sería máxima al llegar a una humedad crítica (40% en nuestro caso) y similar a la de la enzima en solución, por lo cual subsiguientes aumentos en el contenido de agua no afectarían la Tp. Estos resultados son coincidentes con los observados por otros autores en proteínas deshidratadas (Fujita y col; 1981; Wright, 1982; Hähn-Hägerdal y Martens, 1976; Sessa, 1992; Bell y col, 1995 a y b).

Para enzimas en medio líquido, las temperaturas de desnaturalización rondan entre 60 y 75°C, coincidentemente con lo observado en nuestro caso. Sessa, (1992), encontró que una suspensión de proteínas de soja al 20% p/v, presentó una Tp de 75°C. Bombara y col, (1994) describieron una Tp de 75°C para proteasa neutra de *Aspergillus oryzae* en solución 30% p/v. Terebiznik y col. (1997) observaron una Tp de 69,9°C para α-amilasa de *Aspergillus oryzae*.

Para enzimas deshidratadas los valores de Tp son mucho más variados, dependiendo de la proteína, la humedad y los aditivos empleados. Hähn Hägerdal y Martens (1976), encontraron una disminución de Tp de mioglobina de 120 a 77°C entre 1 y 80% de humedad. Sessa (1992) describió una disminución de Tp desde 200 a 80°C para proteínas de soja entre "0" y 80% de humedad. Bell y col (1995) describieron una Tp de entre 150 y 70°C para somatotropina bovina según el contenido de agua. Bell y Hageman (1996) estudiaron el efecto de distintos aditivos (incluida agua) en la Tp de β-lactoglobulina, ovoalbúmina y ribonucleasa, obteniendo valores de Tp entre 170 y 79°C según el sistema estudiado. Öeste Tryantafillow y col (1996) describieron un sistema de α-quimiotripsina cuya Tp para $a_w$ 0,20 variaba entre 80 y 95° según contuviera o no sorbitol.

### 1.2.2. Temperatura de transición vítrea

En las Figuras 5 y 6 se grafica la temperatura de transición vítrea (Tg) en función de la humedad y $a_w$ respectivamente.

Se observa una tendencia similar a la observada con Tp en cuanto a una disminución de Tg a mayores contenidos de agua.

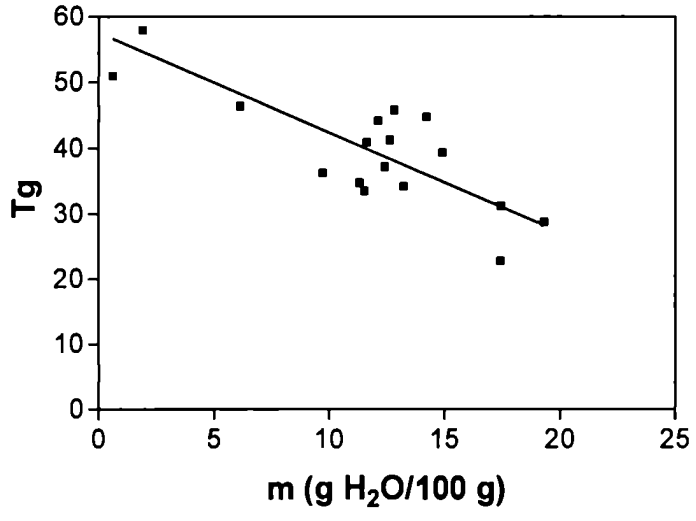



Figura 5: Efecto de la humedad en la Tg del sistema

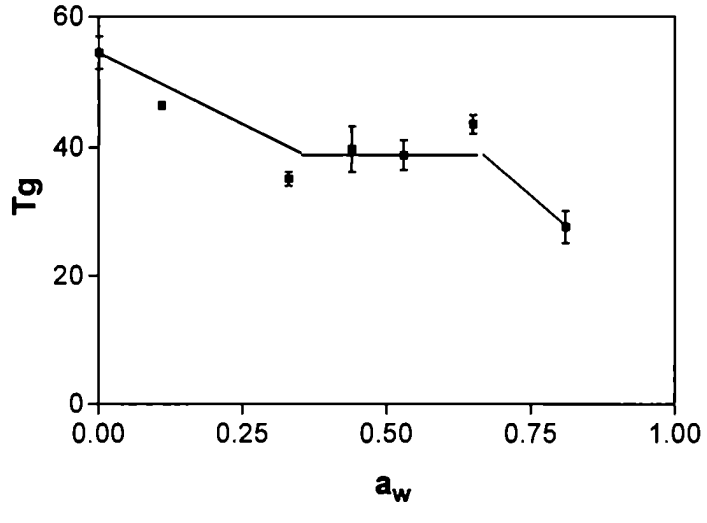



Figura 6: Efecto de la actividad de agua en la Tg del sistema

La disminución de Tg con la humedad debido al efecto plastificante del agua es un fenómeno bien conocido y documentado en distintos sistemas (Roos, 1998) y descripto también para diferentes proteínas como globulina

11S (Sochava y Smirnova, 1993); gluten (Slade, 1984; Hoseney y col, 1986; Kalichevsky y col., 1992); glutenina (Cocero y Kokini, 1991; Kalichevsky y col., 1992); gliadina (Kalichevsky y col., 1992; de Graad y col, 1993; Kokini y col., 1994); zeína (Kokini y col., 1994; Modeka y Kokini, 1996) y fracciones proteicas de soja 11S y 7S (Morales Díaz y Kokini, 1998).

Tg mostró una dependencia lineal con la humedad (m), siendo la correlación:

$$Tg = 57,5 - 1,52.m \qquad R^2 = 0,71$$

La baja correlación observada se debe a que la determinación de Tg es más difícil y conlleva mayor error debido a los pequeños cambios de capacidad calorífica (cp) registrados en los termogramas.

En la Figura 6, se incluyó un punto de $a_w$ "0" correspondiente al extracto liofilizado y almacenado en un desecador con sílica. Los valores de humedad correspondientes a estos extractos fueron menores que 1% en base húmeda, por lo cual hablar de extractos cuya $a_w$ sea realmente cero resulta imposible. De todos modos, estos puntos fueron incluídos en el gráfico y los valores de Tg medidos fueron de alrededor de 55°C.

Por otra parte, en la zona central de la Figura 6 se observa que la Tg casi no varía con $a_w$ debido a que es la zona de la isoterma en la que al variar el $a_w$ la humedad varía muy poco, y por lo tanto no hay variaciones en la plastificación del sistema. Esto se refleja en la nube de puntos obtenidos en la Figura 5 en el rango de humedad entre 10 y 15%.

Las Tg observadas para el extracto seco (aproximadamente 57°C) fueron menores a las reportadas para proteínas deshidratadas (entre 145 y 260°C) (Bell y col, 1995 a; Duddu y Dal Monte, 1997; Matveev, 1997) pero esto puede deberse a que en los casos de bibliografía se trataba de proteínas puras de alto peso molecular (mayor que 50 kDa), y en nuestro caso, el extracto de trabajo se compone de un 40% de proteínas de menor peso molecular (según las electroforesis realizadas) y el 60% restante son probablemente dextrinas derivadas del almidón parcialmente degradado durante la

fermentación. También puede haber un resto de sólidos de peso molecular menor que 10000Da, ya que el proceso de ultrafiltración no es 100% eficiente.

### 1.2.3. Entalpía de desnaturalización

En las Figuras 7 y 8 se muestran las entalpías de desnaturalización (ΔH) en función de la humedad y $a_w$ respectivamente.

En la Figura 7 se incluyen los datos de humedad 70% y se observa una disminución de entalpía en función de la humedad que se produce abruptamente en relación al cambio de estado sólido a líquido.

En el caso de la Figura 8 se observa la misma tendencia que en la Figura 7. A las $a_w$ en las que el sistema se encuentra en estado sólido, el ΔH de desnaturalización se mantiene aproximadamente constante en 65 J/g de proteína y a un $a_w$ de 0,98, donde el sistema presenta un aspecto de jarabe, el ΔH de desnaturalización baja abruptamente a alrededor de 17 J/g de proteína.

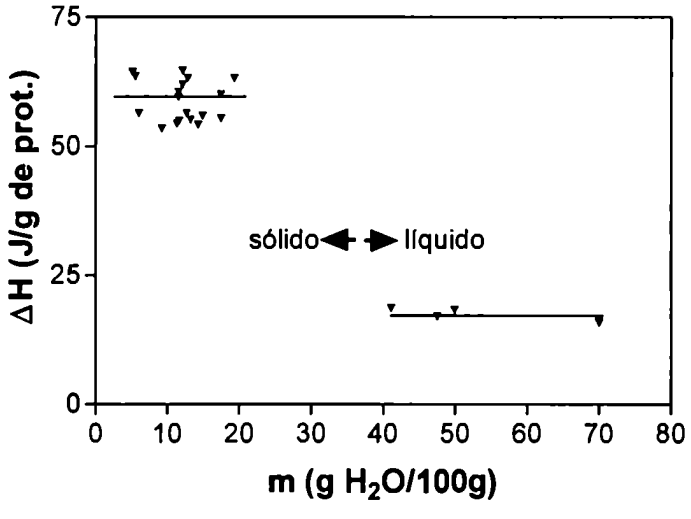



Figura 7: Efecto de la humedad en la entalpía de desnaturalización

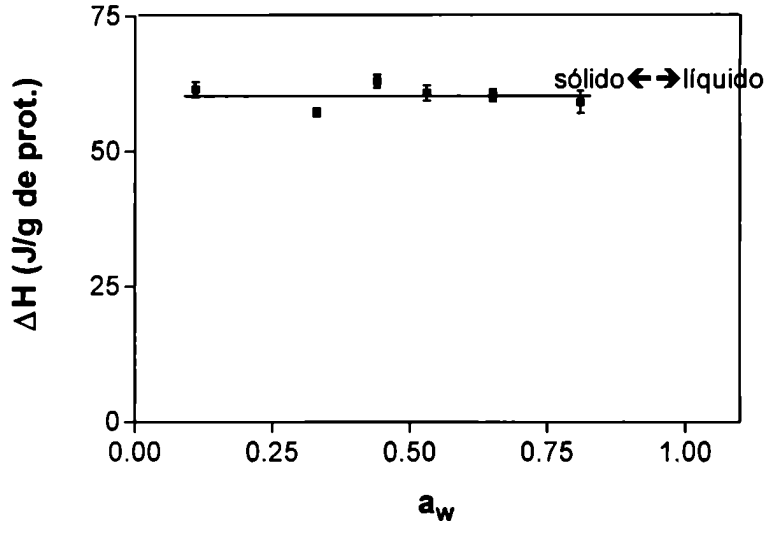



Figura 6: Efecto de la $a_w$ en la entalpía de desnaturalización

Estos valores son similares a los reportados en literatura para la desnaturalización de enzimas en solución, pero mayores que los reportados para enzimas deshidratadas. Sessa y col, (1992) encontraron para proteínas de soja valores de ΔH entre 12 y 26 J/g. Bell y col, 1995 a) y b) encontraron para somatotrofina bovina liofilizada valores entre 4 y 12 J/g según la humedad. Öste-Triantafillow y col, (1996) describieron valores entre 4 y 25 J/g para α quimiotripsina según el método de equilibración usado y la humedad del sistema. Terebiznik y col (1997) reportaron un ΔH de 11 J/g para una solución al 30% p/v de α-amilasa de *Aspergillus oryzae*.

En la literatura se reportan diferentes efectos de la humedad en el ΔH de desnaturalización de proteínas. Sessa (1992) observó que el ΔH de desnaturalización en proteínas de soja disminuye o no varía con el aumento de humedad (y de estado físico sólido- líquido). Bell (1995a) describió una disminución de ΔH de 12 a 4 J/g de proteína al aumentar la humedad de somatotrofina bovina liofilizada. En cambio, Hähn-Hägerdal (1976) y Öste Triantafillow y col (1996) describieron el aumento de la entalpía con el aumento del contenido de agua para mioglobina (de 4 a 25 J/g), y para quimotripsina.

Bell (1995 a) postuló que el descenso del ΔH con el aumento de humedad puede deberse a la ocurrencia de agregación hidrofóbica (proceso

exotérmico), que ocurriría simultáneamente con la desnaturalización, contribuyendo a la observación de una endoterma menor. También es posible que en el sistema líquido, la desnaturalización ocurra simultáneamente con otro u otros procesos y que éstos no ocurran en el sistema deshidratado (o viceversa).

El hecho de que los valores de $\Delta H$ observados para el extracto pectinolítico deshidratado sean más altos que los habitualmente observados, podría deberse a la ausencia de agregación hidrofóbica simultánea a la desnaturalización, por lo cual la endoterma observada es mayor.

En la Figura 8, se muestran algunos ejemplos de termogramas obtenidos a partir de muestras equilibradas a distintas $a_w$. Se puede observar que para $a_w$ entre 0,11 y 0,81 (líneas a-f), los termogramas evidencian la menor estabilidad del sistema (menores Tg y Tp) a mayores contenidos de agua. Para contenidos de agua mayores, en los que la enzima se encuentra solubilizada (líneas g y h), no hay un cambio apreciable en la Tp con el aumento del contenido de agua, pero se aprecia la aparición de otra endoterma más pequeña, sugiriendo que las proteínas del sistema presentan un menor grado de homogeneidad en medio líquido.

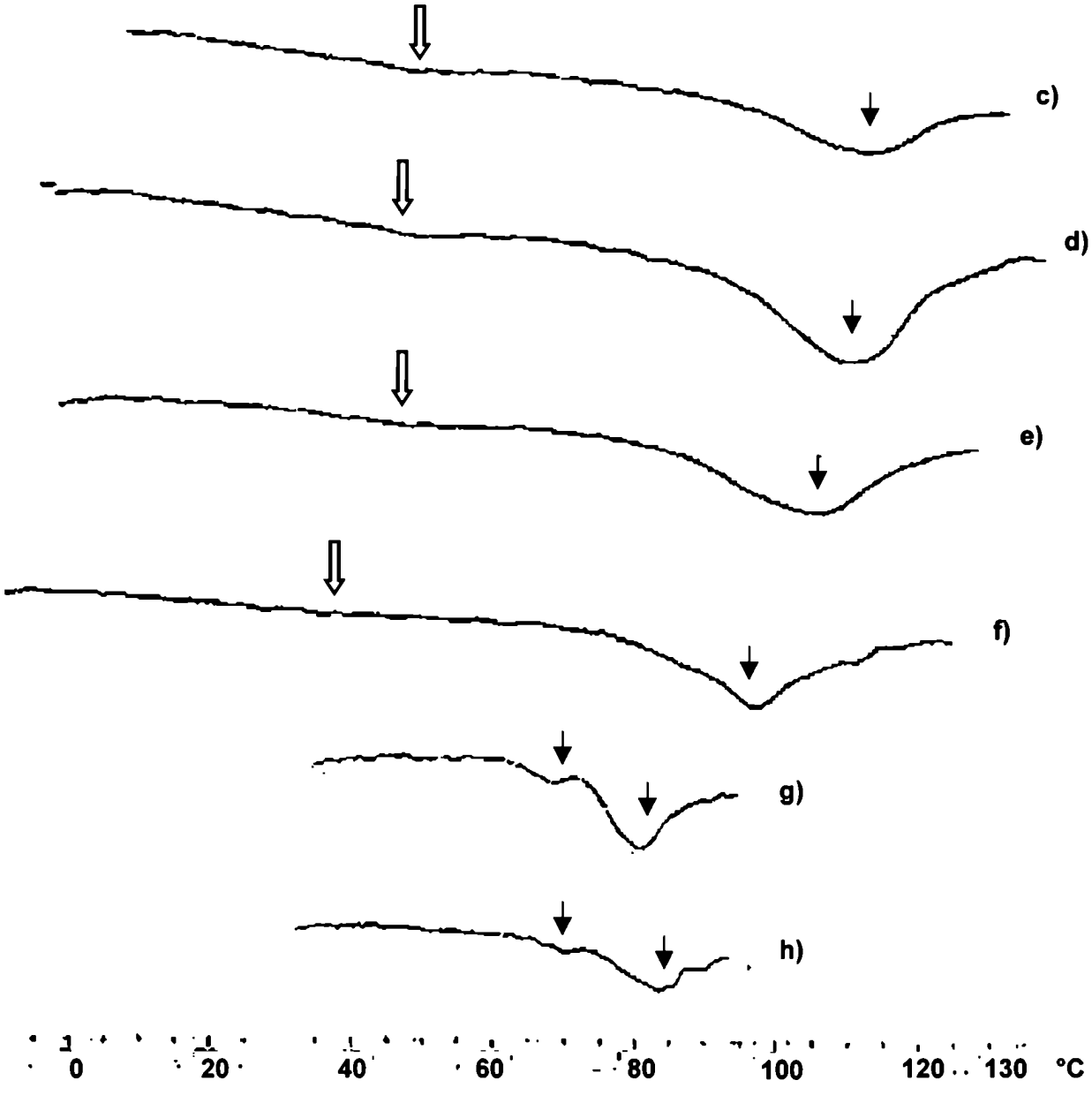



Figura 8: Termogramas del extracto pectinolítico en diferentes condiciones de almacenamiento. a) $a_w$ 0,11; b) $a_w$ 0,33; c) $a_w$ 0,44; d) $a_w$ 0,53; e) $a_w$ 0,65; f) $a_w$ 0,81 g) $a_w$ 0,98; h) extracto disuelto en agua destilada (30% p/p). Las flechas blancas señalan la Tg y las negras, la Tp.

## *1.3. Cinética de desnaturalización y pérdida de actividad de PL deshidratada*

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite evaluar la cinética de procesos como fusión, desnaturalización, cristalización, etc. (Añón y Jovanovich, 2000). Se utilizó el método dinámico de Osawa (1970) para determinar la energía de activación (Ea) del proceso de desnaturalización de PL deshidratada y el factor preexponencial (z), lo cual permite el cálculo de las constantes de velocidad de desnaturalización (k) para diferentes temperaturas.

Dado que se sabe que la pérdida de actividad biológica de proteínas no está siempre asociada con la desnaturalización (Mohazev, 1993; Solá Pena y col, 1997), se estudió la cinética de pérdida de actividad de PL en estado vítreo y gomoso, determinándose la Ea asociada a este proceso , para compararla con la obtenida para la desnaturalización. Si el principal mecanismo de la pérdida de actividad enzimática fuese la desnaturalización, se esperaría obtener una Ea muy similar para ambos procesos.

De acuerdo al método de Osawa (1970), se realizó el calentamiento del extracto deshidratado con 8,5% de humedad (base húmeda) entre 0 y 145°C a diferentes velocidades (β). Se determinó la temperatura del pico de la endoterma de desnaturalización (Tp).

En la Figura 10 se muestra Tp en función de β, siendo cada punto el promedio de tres mediciones.

Dado el diferente retardo térmico que se produce a distintas velocidades de calentamiento, se esperaría que Tp decrezca a medida que β disminuye. En la Figura 10, se observa que esto sólo ocurrió al pasar de 5 a 2,5 k/min. Este comportamiento, aparentemente atípico, también fue reportado por Bell y col. (1995 a) para somatotrofina bovina deshidratada.

La temperatura de desnaturalización (Td) se evalúa a $\beta=0$ (Añón y Jovanovich, 2000). Si se extrapola en forma lineal (línea punteada) a $\beta=0$, Td resulta 113,1°C, mientras que en forma gráfica (línea llena), resulta 110,5°C.

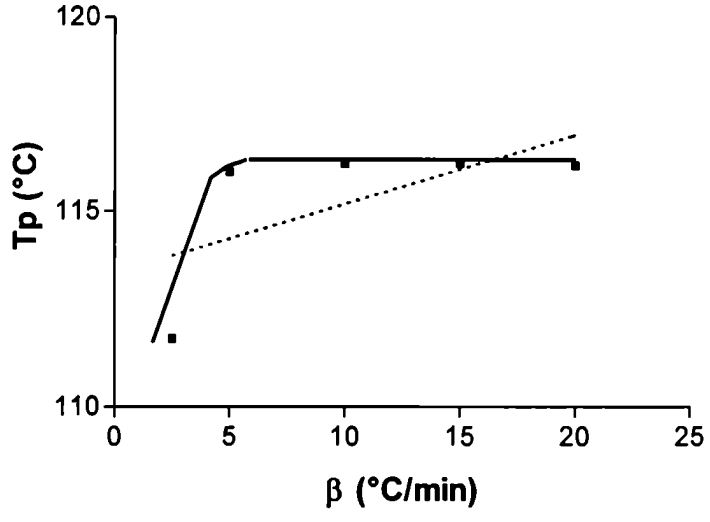



Figura 10: Temperatura del pico de desnaturalización vs. velocidad de calentamiento para el extracto deshidratado (HR 8,5%)

Aplicando el método dinámico de Osawa (Figura 11) se calcularon la Energía de activación (Ea) y el factor preexponencial (z) que caracterizan la desnaturalización proteica del extracto deshidratado.

La regresión lineal dió el siguiente resultado:

$$Ln(\beta/Tp^2)=139,7-58050.1/Tp \qquad R^2= 0,795$$

A partir de esta ecuación se calcularon:

- Ea: 116,1+/- 12,1 kcal/mol

  z: (2,72 . +/- 0,365).$10^{65}$. $min^{-1}$

De Cordt y col (1994) estimaron la Ea de desnaturalización de α-amilasa deshidratada entre 75 y 125 kcal/mol según se estabilizara o no con distintos polioles. Vrábel y col. (1997), reportaron una Ea de desnaturalización de 120 Kcal/mol para invertasa de levadura deshidratada, mientras que Bell y col.

(1995 a) obtuvieron una Ea de 57 kcal/mol y un factor preexponencial (z) de $1,51.10^{33}$ para somatotropina bovina liofilizada.

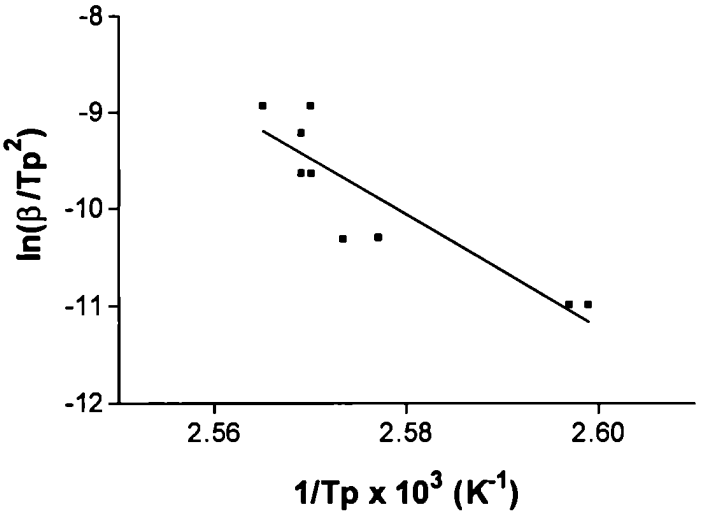



Figura 11: Cálculo de Ea y z para la desnaturalización proteica del extracto enzimático deshidratado utilizando el método dinámico de Osawa

La Figura 12 muestra el termograma del extracto ultrafiltrado y liofilizado (humedad 8,5% en base húmeda) y las condiciones de temperatura en las que se estudió la pérdida de actividad PL .

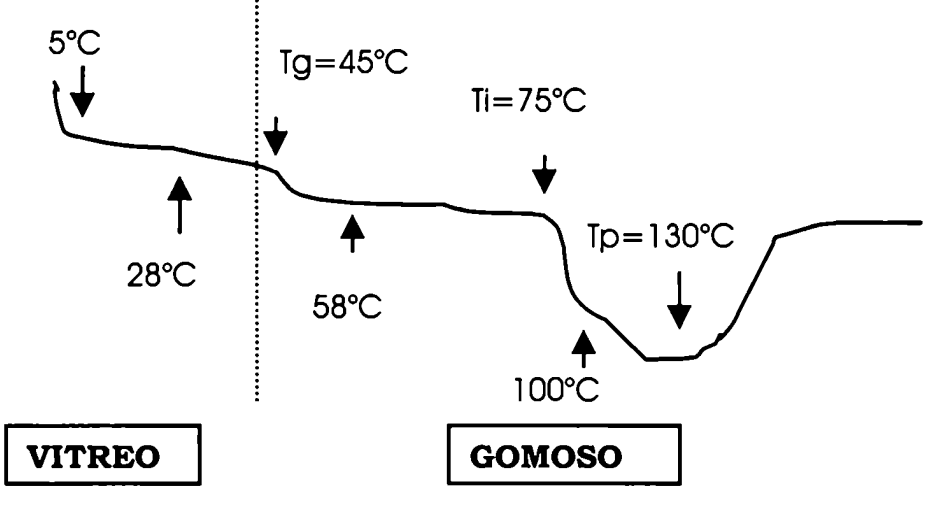



Figura 12: Termograma del extracto rico en PL (8,5% humedad b. h.) . Las flechas indican las temperaturas de estudio de la cinética de inactivación de PL.

En la Figura 13 a) se puede apreciar que a temperaturas iguales o menores que Tg (45, 28 y 5°C), el proceso de inactivación de PL es mucho más lento (del orden de días) que a temperaturas mayores que Tg (sistema en condiciones gomosas) donde se observa inactivación al cabo de minutos (Figura 13b). En estado vítreo se evidencia además un tiempo lag en la pérdida de actividad de PL, de aproximadamente 7 días.

Es notorio que a temperaturas por debajo del inicio de la desnaturalización (58°C) se observa una importante pérdida de actividad. Esto reflejaría que la desnaturalización no sería el único mecanismo por el cual la PL se inactiva, sino que probablemente ocurren otros fenómenos como agregación hidrofóbica o formación de enlaces covalentes (Izutsu y col, 1991; Mohazev, 1993) que modifican o hacen inaccesible al sitio activo de la enzima. De hecho, algunas de las reacciones que llevan a la inactivación enzimática (agregación hidrofóbica, cross linking, racemización, oxidación, etc), pueden ocurrir con mayor probabilidad en sistemas deshidratados debido a la proximidad de los reactantes. Algunas de estas reacciones, pueden ocurrir tanto en estado vítreo como gomoso (Liapis, 1996; Constantino y col., 1994).

En el caso de 58°C, esa inactivación es mucho más rápida debido a la mayor movilidad del sistema por estar en estado gomoso.

Los resultados muestran que el almacenamiento del extracto enzimático en estado vítreo (T-Tg<0) no garantiza la retención de actividad de PL sino que sólo lo retarda. Almacenando el extracto enzimático a 5°C, donde el sistema está cerca de 40°C por debajo de Tg, la vida media de la enzima es de aproximadamente 32 días, lo cual es indicativo de su termolabilidad.

La falta de vinculación entre estabilidad y estado vítreo ya ha sido descripto para α-amilasa deshidratada (Terebiznik y col, 1998 a) que retuvo mayor actividad en matrices de trehalosa y lactosa a 15 y 30°C por debajo de Tg, que en matrices de PVP o rafinosa a 30 o 60°C por debajo de Tg. Rossi y col., (1997) también observaron pérdida de actividad de la enzima EcoRI aún en condiciones vítreas y Schebor y col (1996) y Mazzobre y col. (1997 a) también describieron inactivación de invertasa y lactasa almacenadas a T<Tg. Garett Rees y col (1996), describen para la L-fenilalanina-amonia-liasa liofilizada y

equilibrada a $a_w$ 0,11, una pérdida del 20% de actividad a 30°C en una semana de almacenamiento. Esta pérdida es más rápida a $a_w$ más altas. Asumiendo una cinética de pérdida de actividad de orden 1 ($A/Ao=e^{-kt}$), se calcularon las constantes de velocidad específica de pérdida de actividad (Gráfico interno de las Figuras 13 a y b y Tabla 1).

| T-Tg | -40°C | -17°C | 0°C | +13°C | +30°C | +55°C | +85°C |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T | 5°C | 28°C | 45°C | 58°C | 75°C | 100°C | 130°C |
| K ($min^{-1}$) | (1,51+/-0,31). $10^{-5}$ | (3,74+/-0,46).$10^{-5}$ | (5,70+/-0,52).$10^{-5}$ | (1,67+/-0,35).$10^{-3}$ | (1,68+/-0,07).$10^{-2}$ | 0,155 +/-0,021 | -0,27 +/-0,029 |
| $R^2$ | 0,891 | 0,957 | 0,975 | 0,954 | 0,97 | 0,933 | 0,944 |
| $t_{1/2}$ | 31,9 días | 12,9 días | 8,4 días | 6,9 horas | 41,3 min. | 4,5 min. | 2,6 min. |

Tabla 1: Constantes de velocidad de pérdida de actividad PL y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) a distintas temperaturas.

El gráfico de Arrhenius (Figura 14), muestra claramente que la pérdida de actividad de PL en estado vítreo y en estado gomoso tiene Ea diferentes, reflejando la importancia de la transición vítrea en la pérdida de actividad de las enzimas (Terebiznik y col, 1997). De acuerdo a la ecuación de Arrhenius, existe una relación lineal entre ln(k) y 1/T. Si a una determinada temperatura ocurre un cambio en el mecanismo de reacción o en el estado físico del sistema, puede aparecer un quiebre en la recta (Labuza, 1985). En el presente caso, el quiebre se produjo a la temperatura de transición vítrea, lo que indica la importancia del estado físico del sistema en la cinética de inactivación de PL.

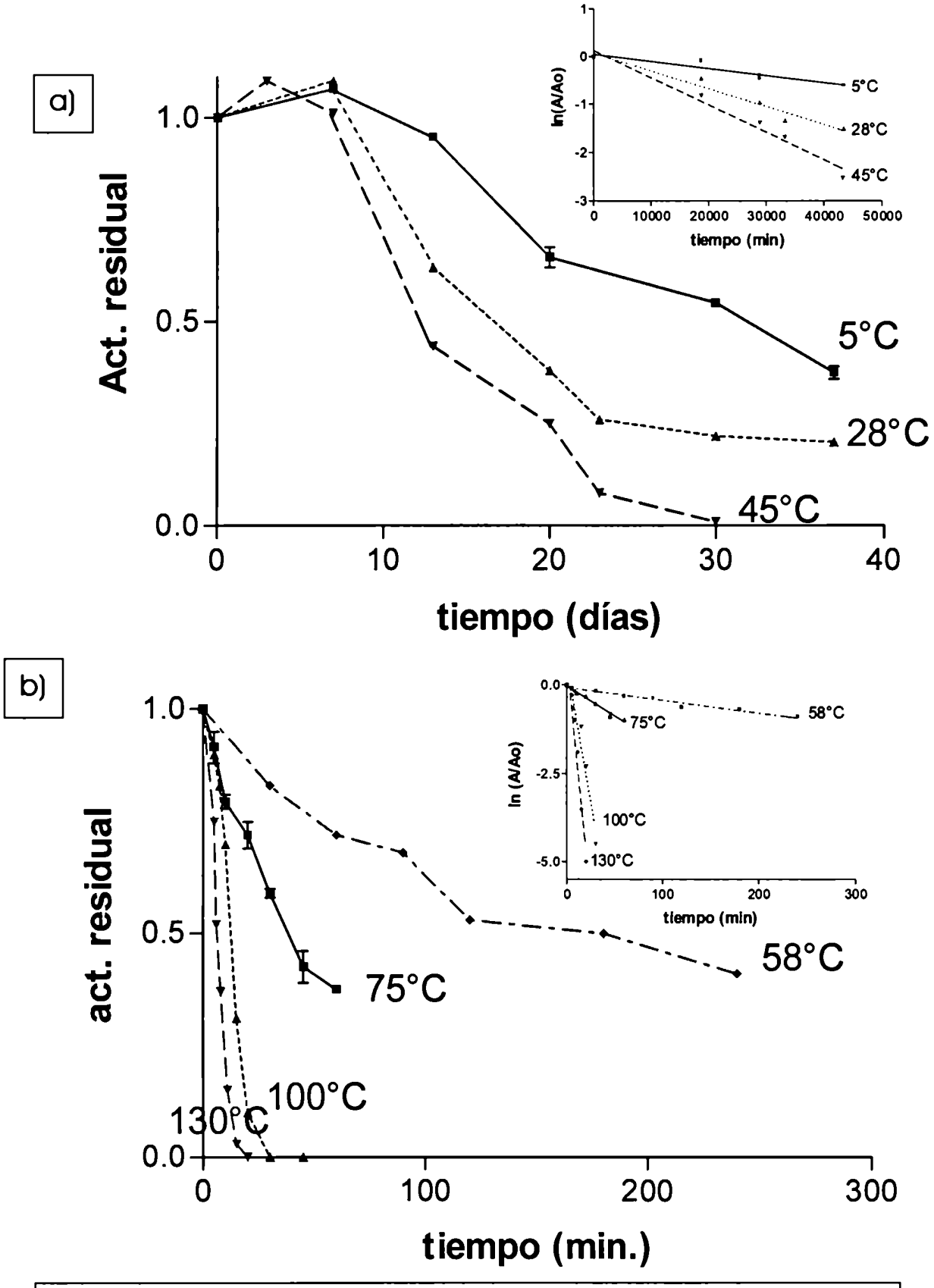



Figura 13: Cinética de inactivación de PL. Inserto: Linealización de acuerdo a una cinética de orden 1.a) Estado vítreo; b) Estado gomoso

La baja Ea obtenida para las condiciones en que el sistema se encuentra vítreo (5 kcal/mol), refleja un entorno con movilidad molecular limitada. Las Ea de las reacciones en medios con limitaciones difusionales está entre 0 y 8 Kcal/mol (Labuza, 1972). La mayor Ea en estado gomoso (19 kcal/mol) refleja un entorno con mayor movilidad asociado al estado gomoso.

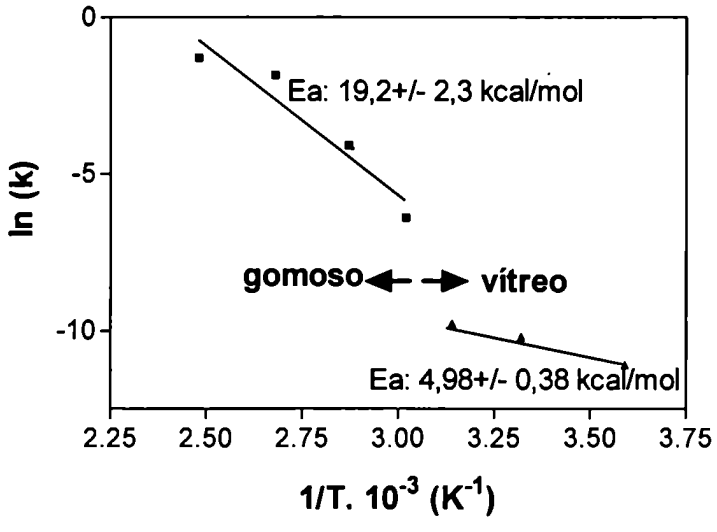



Figura 14: Gráfico de Arrhenius para la inactivación de PL deshidratada

Los valores de Ea obtenidos son similares a los obtenidos en bibliografía para enzimas deshidratadas. Saraiva y col (1996) estudiaron la inactivación de α-amilasa bacteriana deshidratada, encontrando una Ea entre 26 y 37 kcal/mol, según la humedad del sistema. Terebiznik y col, (1997) describieron una Ea de inactivación de 10 kcal/mol en estado vítreo y 32 kcal/mol en estado gomoso para α-amilasa fúngica deshidratada.

Otra evidencia de la influencia de la transición vítrea en la pérdida de actividad PL, se aprecia en la Figura 15, donde se puede ver el salto producido en los valores de "k" entre (T-Tg)<0 (extracto en estado vítreo) y (T-Tg)>0 (extracto en estado gomoso).

Si se comparan las Ea de desnaturalización y de pérdida de actividad PL (a temperaturas entre 75 y 130°C) obtenidas para la enzima en el estado

deshidratado, se puede notar que son muy diferentes (116,1 y 19,2 Kcal/mol respectivamente). Esto estaría indicando que la desnaturalización no sería el mecanismo responsable de la pérdida de actividad PL.

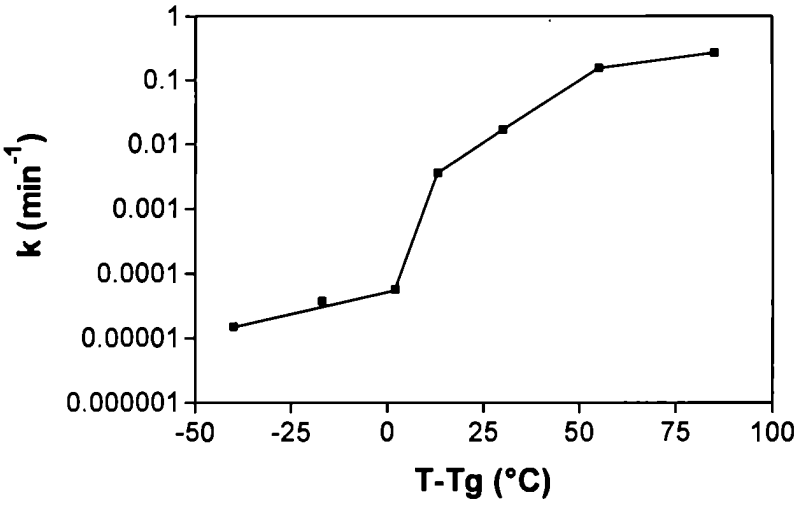



Figura 15: Efecto la transición vítrea en la constante específica de pérdida de actividad PL (T-Tg=0: Temperatura de transición vítrea)

Por otro lado, las constantes de velocidad (k) y tiempos de vida media para la desnaturalización proteica, calculados a partir de Ea y z obtenidos por el método de Osawa, muestran que:

- A 75°C, mientras que la desnaturalización es prácticamente nula ($t_{1/2}$= 4927 días), la enzima PL pierde el 50% de la actividad en 41 minutos aproximadamente (Tabla 1).
- A 100°C, asimismo, la velocidad de desnaturalización es aproximadamente dos órdenes menor que la de inactivación. De hecho, en 4,5 minutos se pierde el 50% de la actividad enzimática (Tabla 1) aunque sólo se desnaturaliza un 3% de las proteínas. Para las temperaturas mencionadas, la inactivación se produciría por mecanismos diferentes a la desnaturalización (deamidación, racemización, oxidación, etc de algún aminoácido del sitio activo) cuya ocurrencia sería previa a la desnaturalización.

Estos resultados indican que en estas condiciones (75 – 100°C), la pérdida de actividad enzimática en el sistema deshidratado ocurre independientemente

de la desnaturalización. En sistemas deshidratados, aún en estado vítreo, pueden ocurrir movimientos rotacionales de grupos reactivos implicados en la actividad enzimática, por lo cual podrían ocurrir reacciones que los afectaran con la consecuente pérdida de actividad (Sperling, 1986).

- A 130°C, sin embargo, se observa que la desnaturalización presenta una velocidad cuatro órdenes mayor que la inactivación. Este fenómeno sólo podría explicarse si la falta de movilidad en medio deshidratado impidiera el completo desplegamiento de la proteína, conservando la estructura del sitio activo de la misma aún cuando parte de la proteína se encontrara desnaturalizada. Otra posible explicación sería que la PL fuera una de las últimas proteínas del extracto en desnaturalizarse, por lo cual la pérdida de actividad sería más lenta que la desnaturalización global de las proteínas del extracto. Por otra parte, el hecho de que la Ea de desnaturalización es mucho mayor que la de inactivación, refleja la mayor dependencia de este proceso con la temperatura y el cruce de las rectas de Arrhenius (Figura 16) que se produce a los 105°C.

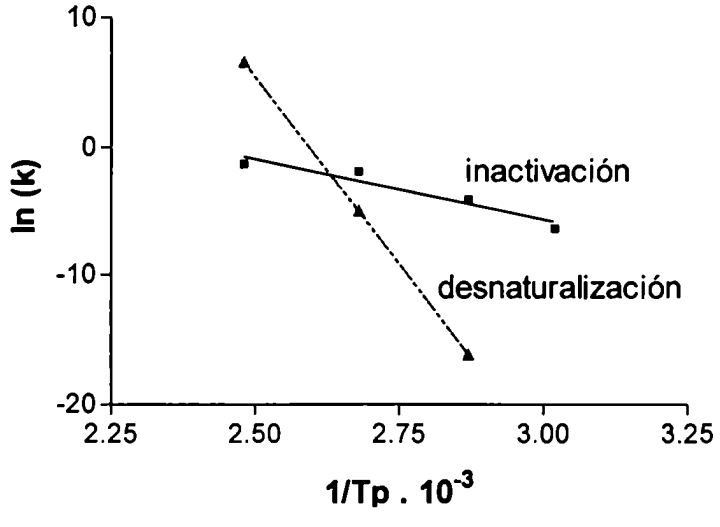



Figura 16: Gráficos de Arrhenius para inactivación y desnaturalización de PL deshidratada.

Para comprobar este fenómeno atípico de desnaturalización mayor que la pérdida de actividad a altas temperaturas, se trató un extracto ultrafiltrado con un 9% de humedad (b.h.) a 130 °C y se midieron la pérdida de actividad y el ΔH de la endoterma de desnaturalización con respecto a un control no tratado (Figura 17).

Mientras que se observó una pérdida de actividad PL de un 21%, la reducción del ΔH de la endoterma de desnaturalización fue de 81,4%, indicando que pese a que un 81,4% de las proteínas del extracto se encontraba desnaturalizada, aún se conservaba un 79% de la actividad PL.

Esto corrobora ulteriormente, la falta de relación entre desnaturalización y pérdida de actividad enzimática a altas temperaturas en el sistema deshidratado

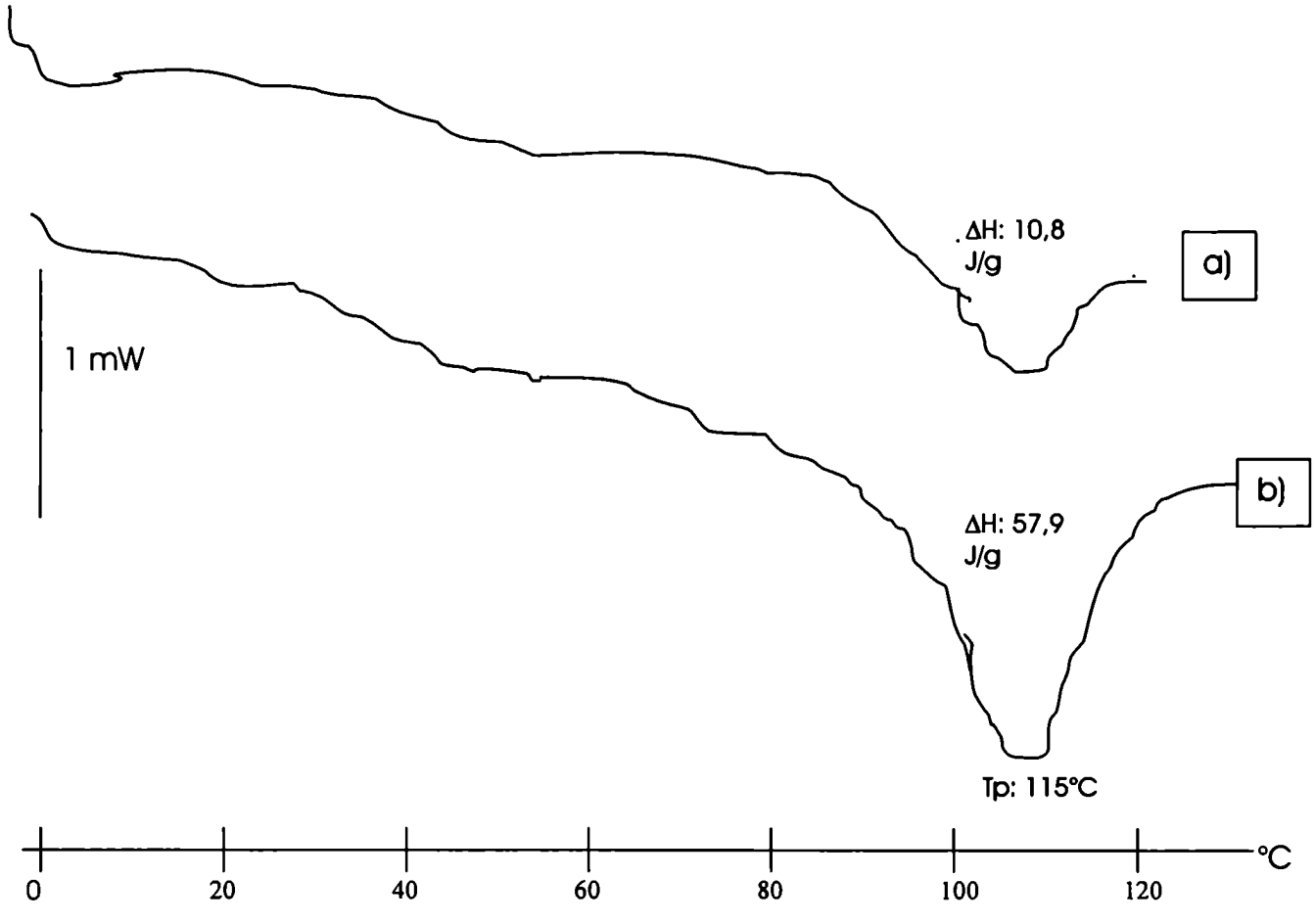



Figura 17: Termogramas de extractos pectinolíticos ultrafiltrados (8,5% de humedad (b.h.) sin tratamiento térmico (línea a), tratado a 130°C (línea b)

Probablemente el pasaje de enzima nativa a enzima inactiva no sea una reacción de un único paso sino una serie de reacciones mediadas por la proximidad de grupos funcionales reactivos en sistemas deshidratados y la Ea observada estaría reflejando el paso más lento. En un sistema deshidratado, una proteína tiene menor movilidad que en una solución, con lo cual el desplegado necesario para la desnaturalización se ve dificultado.

El siguiente esquema (Figura 18), muestra un modelo que podría explicar los resultado encontrados:

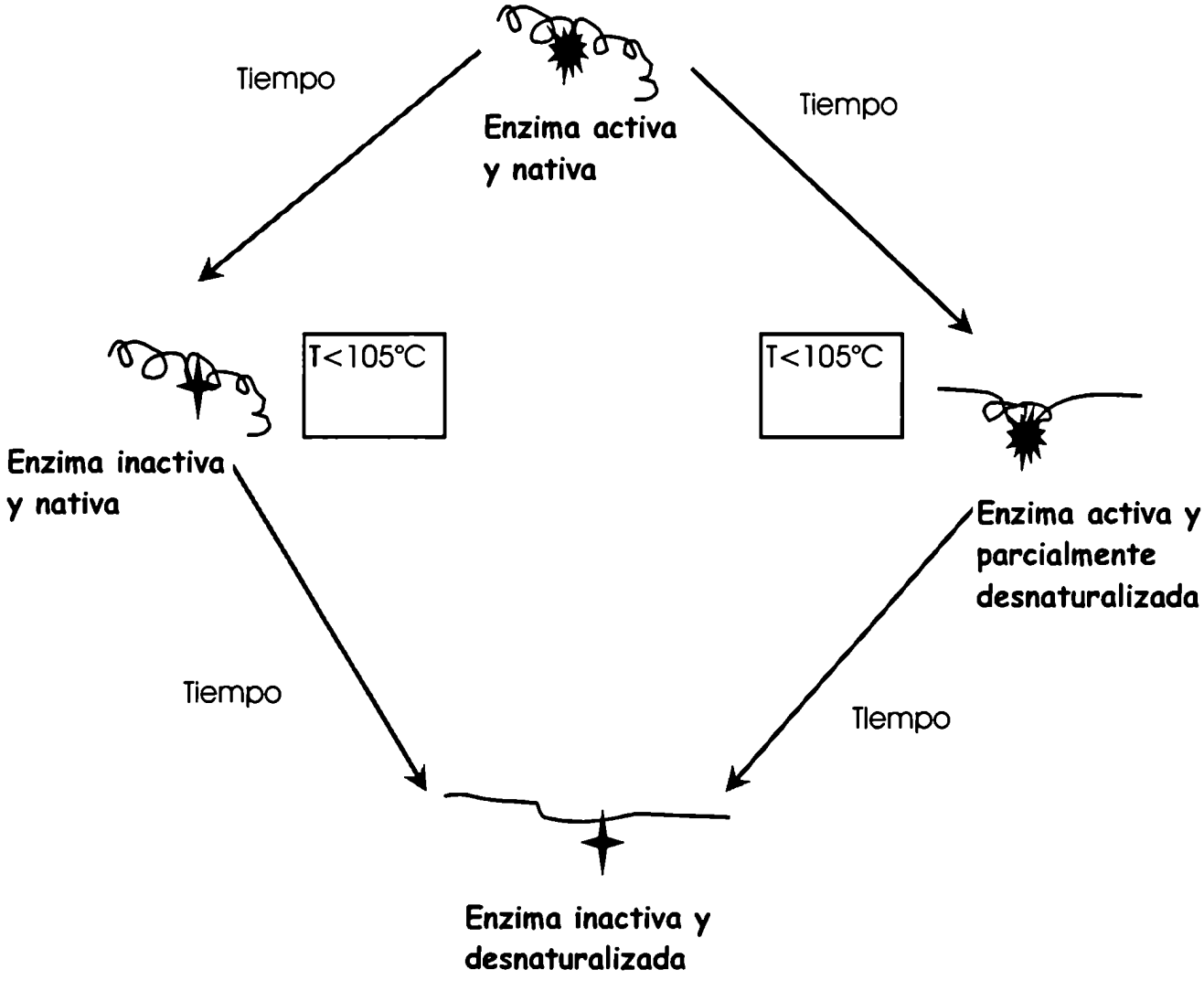



Figura 18: Modelo propuesto para inactivación y desnaturalización de PL en sistema deshidratado.

Según el modelo propuesto, existirían dos reacciones independientes: la desnaturalización (que involucraría el desplegado de la proteína, el cual en medio deshidratado difícilmente es total) y la inactivación por la ocurrencia de alguna reacción química (deamidación, cross linking, racemización, etc.) que involucraría algún residuo del grupo activo.

A temperaturas menores que 105°C (temperatura a la que se cruzan las rectas de Arrhenius para desnaturalización e inactivación), la reacción química ocurriría más rápidamente que el desplegado de la proteína por lo que se observaría pérdida de actividad sin desnaturalización.

A temperaturas mayores que 105°C, el desplegado sería más rápido que la reacción química que lleva a la inactivación enzimática, por lo cual, se apreciaría mantenimiento de la actividad enzimática aún existiendo pérdida de la estructura terciaria de la proteína.

## *1.4. Cinética de desnaturalización y pérdida de actividad de PL en solución*

En forma similar a lo descripto para el extracto enzimático deshidratado, y con el objeto de determinar en forma comparativa la cinética de desnaturalización y pérdida de actividad PL en solución, se sometió al extracto solubilizado en agua destilada (30% p/v) a calentamiento a diferentes velocidades (β). Los resultados se observan en las Figuras 19 y 20.

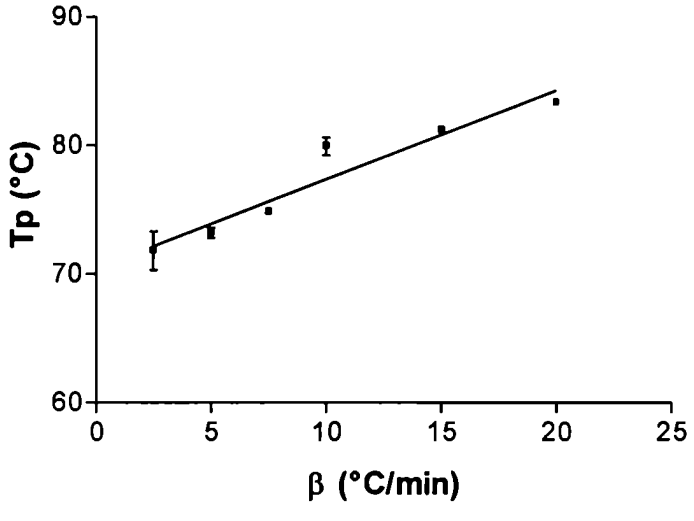



Figura 19: Temperatura de pico de desnaturalización vs. velocidad de calentamiento para el extracto en estado líquido (30% p/v)

En este caso, se obtuvo la siquiente regresión lineal que relacionó la temperatura de pico con β:

$$Tp = 70,42 + 0,6927.\ \beta \qquad R^2 = 0,901$$

Por lo tanto, la temperatura de desnaturalización obtenida de la extrapolación a β=0 fue de 70,4°C.

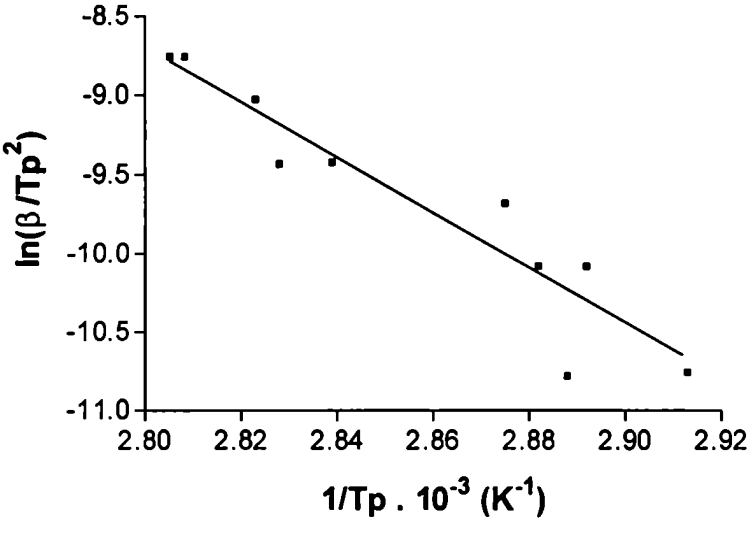



Figura 20: Cálculo de Ea y z para el extracto enzimático en solución, utilizando el método dinámico de Osawa

La regresión lineal de la aplicación del método dinámico de Osawa a los resultados obtenidos, dio el siguiente resultado:

$$Ln(\beta/Tp^2) = 40,25 - 17420.\ 1/Tp \qquad R^2: 0,886$$

A partir de esta ecuación, se calcularon los parámetros cinéticos de desnaturalización (Ea y z), los cuales fueron muy diferentes a los obtenidos para la enzima deshidratada:

Ea= 34,8 +/- 4,1 Kcal/mol.

z= (5,28+/- 0,42) $.10^{21}$ $min^{-1}$.

Bombara y col (1994), utilizando el método dinámico de Osawa, reportaron una Ea de desnaturalización de 73,1 Kcal/mol y un factor preexponencial (z) de $2{,}28.10^{46} min^{-1}$ para proteasa de *Aspergillus oryzae* en solución.

Los diferentes valores de Ea obtenidos para la desnaturalización en estado sólido (116,1 Kcal/mol) o en solución (34,8 Kcal/mol), reflejarían diferencias entre la desnaturalización en el sistema deshidratado y en solución. En medio deshidratado, la desnaturalización sería más difícil por la mayor rigidez del sistema, y podría estar precedida u ocurrir simultáneamente con eventos de polimerización, agregación hidrofóbica o entrecruzamiento (Bell y col., 1995 b) o modificación química de grupos funcionales (Lencki, 1994), especialmente por las altas temperaturas requeridas en relación a la enzima en solución. Por esta razón, la Ea para desnaturalización de proteínas deshidratadas sería mucho mayor que para proteínas en solución.

Se estudió la cinética de pérdida de actividad de PL en medio líquido en las siguientes condiciones:

a) Temperatura menor al inicio de la desnaturalización: 55°C,
b) Inicio de la endoterma de desnaturalización: 60°,
c) 65°C
d) 68°C (temperaturas mayores fueron imposibles de analizar debido a la rapidez de la inactivación de la enzima).

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 2 y en las Figuras 21 (cinética de desnaturalización) y 22 (Gráfico de Arrhenius).

| | 55°C | 60°C | 65°C | 68°C |
|---|---|---|---|---|
| K ($min^{-1}$) | -0,096 +/- 0,0107 | -0,177 +/- 0,0120 | -0,625 +/- 0,0334 | -0,707 +/- 0,0955 |
| $R^2$ | 0,910 | 0,956 | 0,983 | 0,932 |
| $t_{1/2}$ (min) | 7,22 | 3,9 | 1,1 | 1,0 |

Tabla 2: Constantes de velocidad específica de pérdida de actividad PL en medio líquido y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) a distintas temperaturas

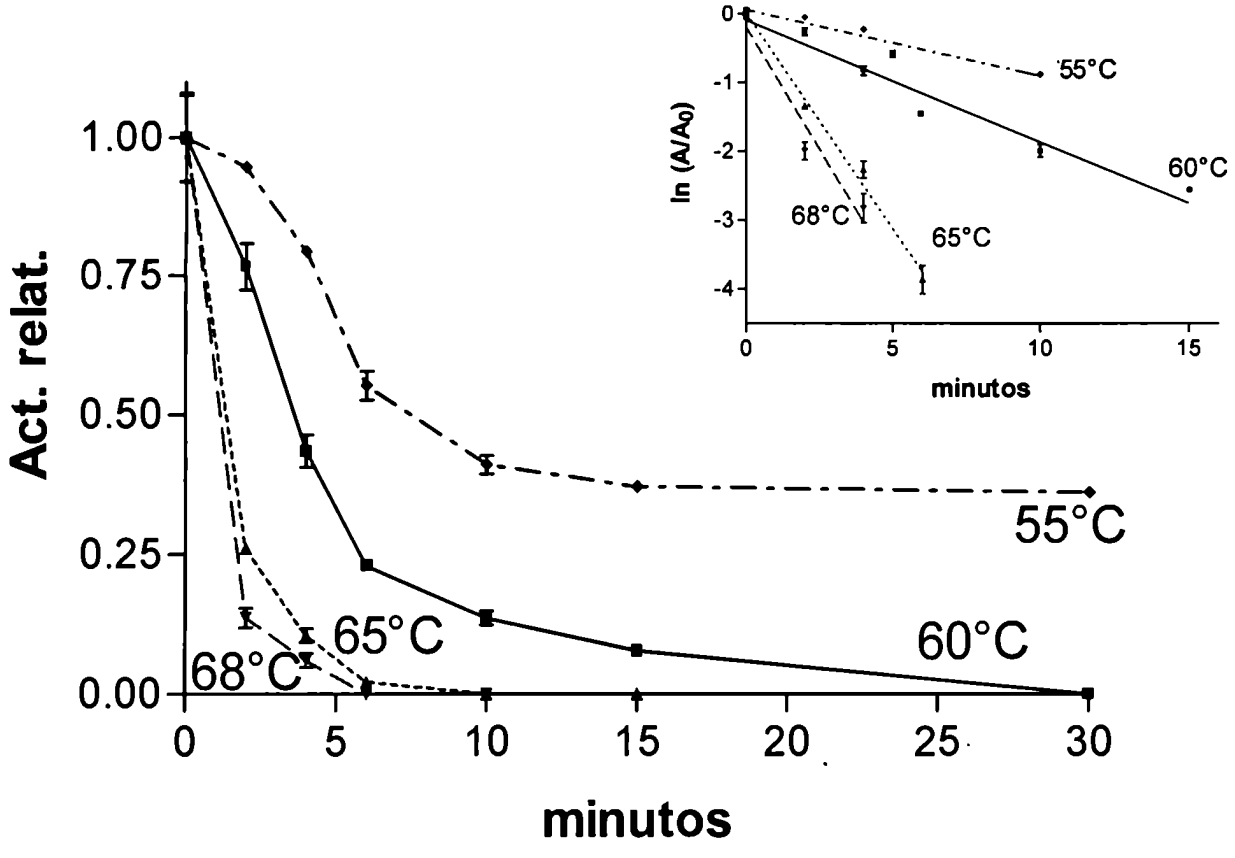



Figura 21: Cinética de pérdida de actividad PL en solución. Inserto: Linealización de acuerdo a una cinética de orden 1

La Ea calculada para la pérdida de actividad de la enzima (37,1 kcal/mol) resulta similar a la obtenida para la desnaturalización proteica (34,8 Kcal/mol) lo cual indicaría "a priori" que ambos procesos están vincuados en medio líquido.

Esto resulta coherente con el hecho de que en medio líquido la proteína tiene suficiente movilidad como para desplegarse y sus grupos reactivos se encuentran alejados entre sí por la dilución, con lo que otros mecanismos de inactivación que impliquen modificaciones químicas de grupos funcionales, resultan más improbables.

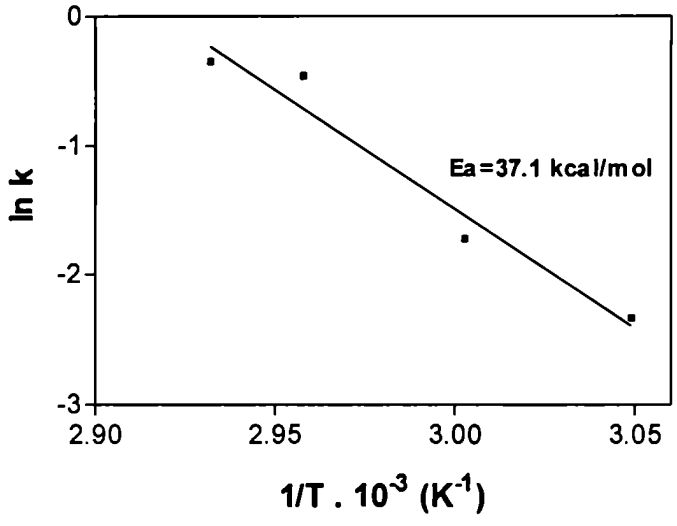



Figura 22 : Gráfico de Arrhenius para para la pérdida de actividad PL en medio líquido

También las constantes específicas de velocidad (k) y tiempos de vida media de desnaturalización calculados a partir del método de Osawa (Tabla 3), presentan valores del mismo orden que los correspondientes a la inactivación de PL, indicando una mayor relación entre la desnaturalización y la pérdida de actividad de la enzima en solución.

El hecho de que las velocidades específicas de desnaturalización (k), sean aproximadamente la mitad que las de inactivación podría deberse a que la desnaturalización parcial de la enzima podría producir una pérdida de actividad total de la misma. De hecho, Solá Penna y Ferreira Pereira (1997) reportaron la pérdida de actividad sin desnaturalización completa para pirofosfatasa de levadura y glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa en solución.

| Temperatura | 55°C | 60°C | 65°C | 68°C |
|---|---|---|---|---|
| K ($min^{-1}$) | 0,0454 | 0,101 | 0,2187 | 0,3441 |
| $t_{1/2}$ (min) | 15 | 6,9 | 3,2 | 2,0 |

Tabla 3: Constantes de velocidad específica de desnaturalización de las proteínas del extracto rico en PL en solución y tiempos de vida media calculados a partir de Ea y z obtenidos por el método de Osawa.

Si se comparan las Ea para pérdida de actividad PL en el sistema deshidratado (19 o 5 kcal/mol, según el sistema esté gomoso o vítreo) y la correspondiente Ea en solución (37 kcal/mol), se puede apreciar que en el primer caso es mucho menor que en el segundo. Esto sería una evidencia ulterior de que la inactivación de PL ocurre por distintos mecanismos en medio sólido y en solución. Terebiznik y col (1997), en cambio, observaron que para α-amilasa de *Aspergillus oryzae,* las Ea de pérdida de actividad en el sistema deshidratado y en solución eran semejantes (aproximadamente 50 kcal/mol), postulando que en ambos sistemas, el mecanismo de pérdida de actividad era el mismo.

Las diferencias observadas entre ambas enzimas, indicarían que el estado físico del sistema es de gran importancia en el mecanismo de inactivación de PL y no así en el de α-amilasa. Esto podría deberse a diferencias estructurales entre ambas enzimas, las que redundarían en diferentes maneras de inactivarse. Por ejemplo, la PL podría tener un aminoácido en el sitio activo suceptible de ser modificado en medio deshidratado, mientras que en solución debería desplegarse para perder actividad. En cambio, la α-amilasa debería desplegarse para perder su actividad tanto en el sistema líquido como deshidratado.

## 2. EFECTO DEL pH EN LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO DESHIDRATADO.

En la Figura 23, se puede apreciar el efecto de distintos buffers y del pH en la estabilidad térmica de PL.

Se ve que el efecto estabilizante viene dado más por el tipo de buffer per se que por la variación de pH.

Esto podría deberse a la interacción, eloctrostática o estérica, entre la enzima y los aniones del buffer (ya que el catión en todos los buffers es $Na^+$). También se debe descartar la diferencia por fuerza iónica, ya que en todos los se trabajó con buffers 40mM. Existen reportes en los que se describe el

efecto diferencial de distintos buffers en la estabilidad de sistemas líquidos o deshidratados (Öeste-Triantafillou y col, 1996; Bell, 1997).

Comparando con el extracto al que no se le agregaron buffers (pH 5,6), los buffers citrato y fosfato estabilizaron a la enzima de la inactivación. En cambio el buffer acetato no mostró ningún cambio en la resistencia térmica de la enzima respecto del sistema sin agregado de buffer, como así tampoco diferencias significativas entre los distintos pH ($p < 0,05$).

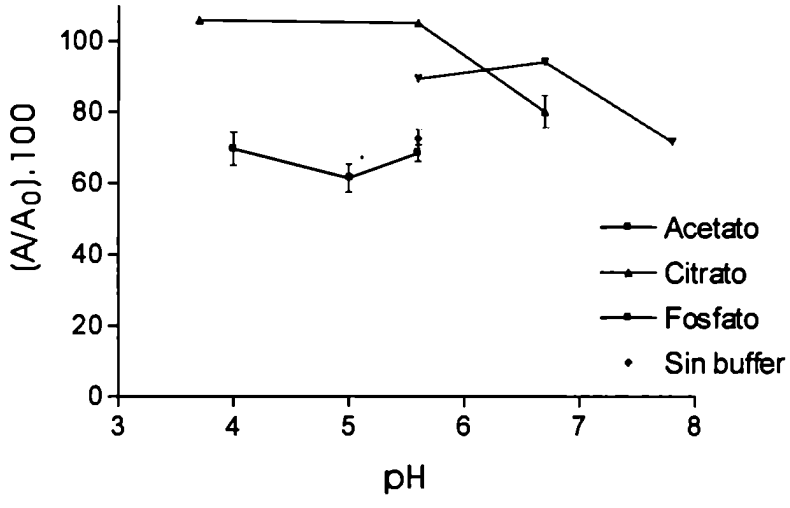



Figura 23: Efecto del pH y el buffer en la resistencia térmica de PL a un tratamiento de 10 minutos a 100°C

El efecto del agregado de buffers sobre el sistema también se visualizó en el aspecto de los extractos luego de liofilizarlos. Los buffers acetato y citrato produjeron un sistema colapsado, en tanto que con el agregado de buffer fosfato el colapso fue menor y dependió del pH (a mayor pH, menor colapso). Esto se debe probablemente a que un anión hidrocarbonado, al asemejarse a un azúcar, plastifica el medio bajando la Tg por lo cual se produce el colapso (Liapis, 1996). Como se ve en la Figura 23, el colapso no tiene relación alguna con la estabilidad térmica de la enzima.

## 3. EFECTO DEL AGREGADO DE ADITIVOS EN LA ESTABILIDAD DE PL DESHIDRATADA

Existe amplia bibliografía respecto del efecto protector que los azúcares poseen sobre proteínas deshidratadas (Thimaseff, 1993; Constantino y col., 1994; Mohazev, 1993; Buttler y Falker, 1996; Liapis, 1996; Bell y Hagerman, 1996; Solá Pena y Ferreira Pereira, 1997; Devi y Rao, 1998), pero pese a ello, no existe ningún acuerdo ni generalización respecto a cuáles son los mejores azúcares para estabilizar proteínas, ya que esto depende de cada sistema particular.

Un azúcar muy utilizado por su efecto altamente protector es la trealosa (Roser, 1991; Leslie y col, 1994; O' Brien, 1996; Schebor y col, 1996; Mazzobre y col, 1997; Terebiznik y col, 1997). La trealosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa (1-∝-D-glucopiranosil ∝-1,1- ∝-D-glicopiranósido) que presenta forma cristalina dihidratada. La fusión de sus cristales ocurre entre 91 y 97°C con una entalpía de 127 J/g y la Tg de la trealosa amorfa deshidratada es de 107°C (Roos, 1993). Este azúcar ha demostrado proteger en condiciones de baja humedad y alta temperatura, no sólo la viabilidad de organismos unicelulares como levaduras y bacterias (Roser y col, 1991; Hottiger y col, 1994; Leslie y col, 1994), sino también sistemas de proteínas deshidratadas (Schebor y col, 1996; Mazzobre y col, 1997; Terebiznik y col, 1997, 1998 a y b) contra la inactivación térmica y el pardeamiento no enzimático.

Un poliol muy poco utilizado pero aparentemente muy efectivo como protector de proteínas en sistemas de baja humedad es el lactitol, un azúcar alcohol que se obtiene de la hidrogenación catalítica de la lactosa. Sus cristales dihidrato tienen una solubilidad similar a la de la sacarosa y son muy estables aún en condiciones de pH extremos. Este azúcar no toma parte en la reacción de Maillard ni es degradado enzimáticamente (Blankers, 1995). Los cristales de lactitol funden a temperaturas entre 90 y 105°C (Heikilae y Nurmi, 1990). Todas estas características hacen al lactitol interesante como aditivo para proteger proteínas en sistemas de baja humedad. De hecho,

varios autores han reportado la eficacia de este poliol como crioprotector o termoestabilizador de proteínas. Sych y col (1991 a, b, 1992) estudiaron el efecto crioprotector del lactitol en proteínas de surimi hallándo que era igual o superior a la mezcla de sacarosa-sorbitol, utilizada comercialmente. Gibson y col (1992) estudiaron el efecto de varios azúcares en la estabilidad térmica de 8 enzimas diferentes, encontrando al lactitol y a la combinación lactitol-DEAE dextrano como los protectores más eficientes. Matsumoto y col (1992), estudiaron el efecto de ocho azúcares y polioles como protectores durante la liofolización de miofibrillas de carpa, destacándo al lactitol y la maltotetraosa como los más eficientes.

Otros azúcares como la sacarosa, rafinosa, lactosa, etc., han sido ampliamente investigados con resultados muy diversos en cuanto a poder protector dependiendo de la enzima estudiada (Hanckock y col, 1997 y Solá Pena y Ferreira Pereira, 1997).

En general, los azúcares estabilizarían proteínas en sistemas deshidratados por formar puentes de hidrógeno entre los $OH^-$ y los grupos hidrofílicos de la proteína (Arntfield y col, 1985; de Cordt y col, 1994; Gregory, 1996) rigidizando el sistema o aumentarían la Tg del sistema (Gregory, 1996; Liapis, 1996; Bell, 1997).

Por otro lado, si la inactivación enzimática involucrase la formación de puentes disulfuro (entrecruzamiento o agregación hidrofóbica), el uso de agentes reductores, estabilizaría la enzima.

Por lo expuesto arriba, se probaron varios aditivos como estabilizantes de la PL en el sistema ultrafiltrado y liofilizado (humedad: 8%), en condiciones desnaturalizantes (130°C) o no (58°C). Los estabilizantes ensayados fueron:

Lactitol 5 y 15%,

Trealosa 5 y 15%,

β-mercapto etanol 4 y 8 mM,

Bisulfito de sodio 0,5 y 1,5% p/p seco.

Los resultados en cuanto a retención de actividad luego de los tratamientos a 58 y 130°C, se muestran en la Figura 24.

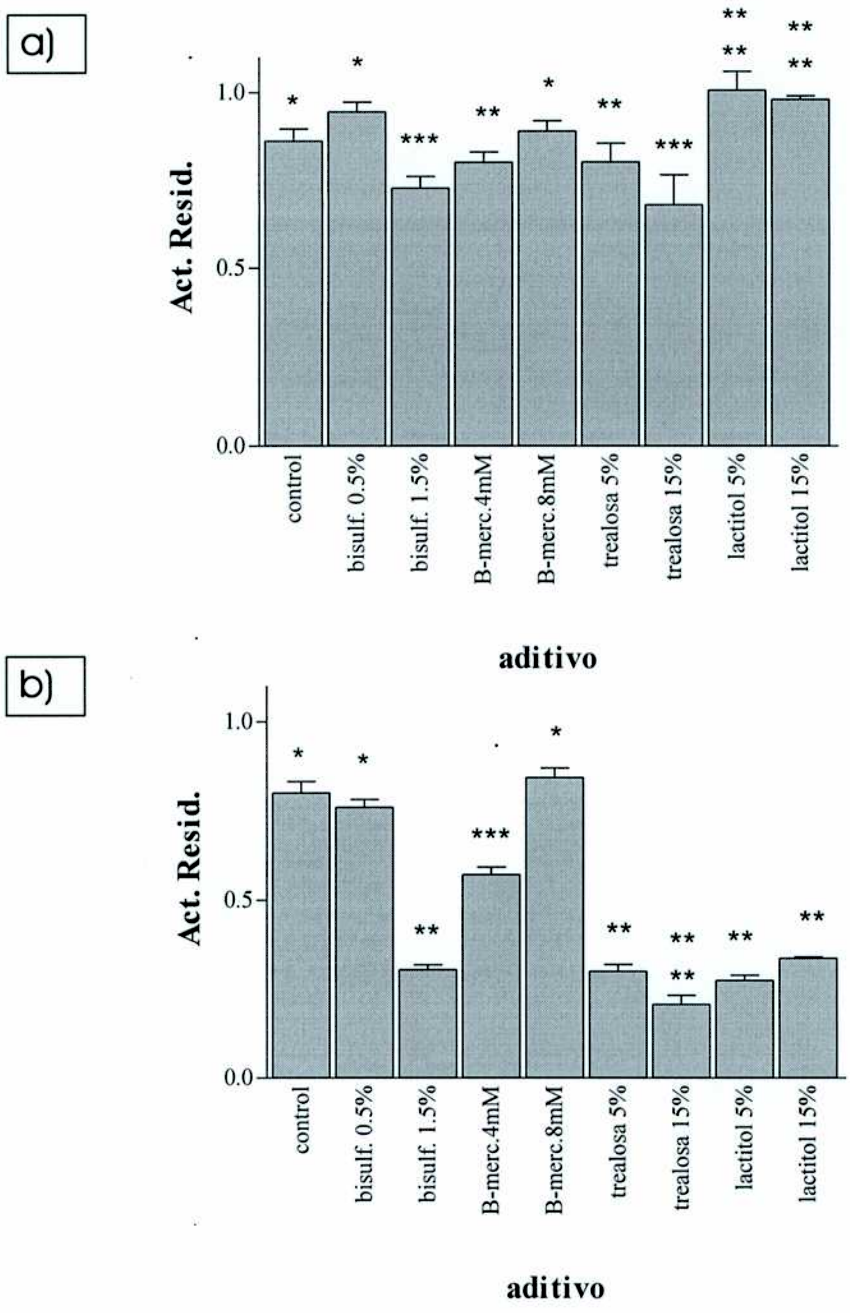



Figura 24: Pérdida de actividad PL en matrices con distintos aditivos. a) Condiciones no desnaturalizantes (11,5 horas a 58°C). b) Condiciones desnaturalizantes (24 minutos a 130°C). Igual cantidad de símbolos sobre las barras indica grupos estadísticamente iguales

Se puede observar, que el bisulfito de sodio en baja concentración, no tiene ningún efecto estabilizante a ninguna de las dos temperaturas respecto del

control, pero en concentraciones mayores, desestabiliza la enzima. Probablemente esté reduciendo algún puente disulfuro imprescindible para la actividad enzimática.

El β-mercapto etanol tampoco aumentó la estabilidad del extracto a ninguna de las dos temperaturas estudiadas, sino que presentó un efecto levemente desestabilizador en bajas concentraciones o ningún efecto a altas concentraciones.

Respecto al efecto estabilizador de los polioles ensayados, se comprobó que a temperaturas no desnaturalizantes, la trealosa desestabilizó levemente la enzima respecto al control, mientras que el lactitol lo estabilizó, pese a que la Tg en los sistemas con trealosa (55°C) era mayor que en los que tenían lactitol (35°C). Esto estaría indicando un efecto de interacción más específico entre la enzima y el lactitol que entre la enzima y la trealosa. Matsumoto y col (1992) observaron mayor protección por lactitol en proteínas miofibrilares de carpa, postulando que los azúcares con más grupos hidroxilos protegerían las proteínas con más eficiencia por tener mayor posibilidad de interactuar con éstas. De hecho el lactitol tiene más $OH^-$ que la trealosa, lo cual podría ser una razón del mayor poder protector de este azúcar. A temperaturas altas, ambos azúcares disminuyeron la estabilidad de la PL, lo cual es lógico, ya que se trabajó a temperaturas suficientemente altas como para que tanto la trealosa como el lactitol cristalizaran y sus cristales fundieran, con lo cual la enzima quedaba excluida de la matriz. Para ambos azúcares se observó un importante colapso. Terebiznik y col. (1998 b) estudiaron el efecto protector de la trealosa en α-amilasa fúngica dehidratada, observando que cuando el extracto se había ultrafiltrado, la protección por 1% de trealosa era mayor que si utilizaban un 15% de este azúcar. Estos autores trabajaron a temperaturas menores que las de fusión de cristales de trealosa, por lo cual no observaron pérdidas de actividad enzimática importantes debidas a este proceso.

Se analizó el efecto de los distintos aditivos en la Tg y Td del sistema. Los resultados se muestran en la Tabla 4:

| Aditivo | Tg (°C) | Tp (°C) |
|---|---|---|
| Ninguno | 45,8 | 125,8 |
| Bisulfito de sodio 0,5% | 42,7 | 125,2 |
| Bisulfito de sodio 1,5% | 44,2 | 117,9 |
| β mercapto etanol 4 mM | 45,1 | 118,0 |
| β mercapto etanol 8 mM | 45 | 116,5 |
| Lactitol 5% | 37,1 | ND |
| Lactitol 15% | 32,9 | ND |
| Trealosa 5% | 57,6 | ND |
| Trealosa 15% | 55,0 | ND |

Tabla 4: Efecto de distintos aditivos en las temperaturas de transición vítrea del sistema deshidratado y de desnaturalización de las proteínas. ND: no determinable. Los resultados son el promedio de duplicados

Como puede apreciarse, los agentes reductores no modificaron en forma significativa los parámetros estudiados (Tg y Tp), por lo que el efecto observado, se debe al aditivo en sí y no al cambio de las propiedades del sistema.

En cambio, el lactitol, disminuyó la Tg del sistema, por lo cual era esperable que la estabilidad enzimática a 58 °C fuera menor que la del control si la Tg fuera determinante de la estabilidad. Sin embargo, se observó lo contrario tal como se explica más arriba. La Td no se pudo determinar, ya que al tratarse de una matriz que proporcionalmente tenía mucho más lactitol que proteína, se perdió resolución en el DSC.

Respecto de la trehalosa, ésta, pese a aumentar la Tg del sistema, no mejoró la estabilidad de la PL, como fue descripto anteriormente. Respecto de la Td, no pudo ser determinada por las mismas razones enunciadas para el lactitol.

Los resultados encontrados para trealosa no coinciden con mucha evidencia experimental acumulada con otras enzimas deshidratadas en matrices de trealosa, donde este azúcar demostró excelentes propiedades estabilizantes

(Roser, 1991; Leslie y col, 1994; O' Brien, 1996; Schebor y col, 1996; Mazzobre y col, 1997; Terebiznik y col, 1997). Sin embargo no hay muchos resultados en la literatura sobre sistemas enzimáticos ultrafiltrados, donde se han removido sólidos de bajo peso moleular. Terebiznik y col (1998), trabajando con un extracto ultrafiltado rico en α-amilasa de *Aspergillus oryzae*, observaron que bastaba con un 1-5% de trealosa para estabilizar el extracto ultrafiltrado en contraposición con el 15-20% necesario para estabilizar en igual medida al extracto crudo.

Los resultados obtenidos serían una evidencia de que el conocimiento de la Tg de un sistema no es suficiente para explicar la estabilidad de un sistema deshidratado y que las interacciones entre las moléculas que lo componen sería un factor importante a tener en cuenta para predecirla.

El lactitol parecería ser un estabilizante adecuado en condiciones de almacenamiento a temperaturas extremas (50-58°C). Sin embargo se requeriría efectuar estudios más detallados para verificar el grado de protección brindado por este azúcar.

# *Conclusiones Generales*

La cepa seleccionada *Aspergillus niger* 148 demostró ser buena productora del complejo pectinolítico (PG, PL, PE) tanto por fermentación en estado líquido como en estado sólido, utilizando como sustrato salvado de trigo suplementado con pectina.

La FEL estimuló la producción de PG, mientras que en FES se obtuvo mayor producción de PE y PL.

En ambos sistemas de fermentación, las variables del proceso estudiadas (tiempo, pH, $a_w$ y glucosa) afectaron en forma diferencial a las tres enzimas del complejo, revelando diferencias en los mecanismos regulatorios para cada una de ellas. También la tecnología de fermentación afectó la respuesta de cada enzima a las variables del proceso. Esto sugiere que seleccionando las condiciones de fermentación apropiadas es posible obtener complejos pectinolíticos de composición definida de acuerdo a su aplicación.
Para este fin, la metodología de las superficies de respuesta, en base a un diseño experimental utilizando una red de Doehlert, resultó sumamente eficaz.

Para lograr un extracto pectinolítico con alta actividad PL y baja actividad PE, de acuerdo al objetivo propuesto, la FES en condiciones de $a_w$ reducida (0,93- 0,94), altos pH (6,5- 7) y tiempos cortos (2- 4 días), resultó ser la más adecuada. En este sistema se obtuvieron entre 30 y 36 UE PL/5 g STi.

Dado que en FES las pectinasas representaron un porcentaje mayor de las proteínas extracelulares producidas por el hongo, la utilización de este tipo de sistemas presentaría una ulterior ventaja con respecto a un sistema de FEL en cuanto a los procesos de purificación eventuales del extracto enzimático.

Una desventaja de la FES es la producción de conidios, que pueden ser perjudiciales para la manipulación del sistema. Sin embargo, las condiciones

que demostraron ser óptimas para la obtención de extractos de alta PL y baja PE, también fueron las óptimas para obtener una baja conidiación.

La estabilidad de un extracto rico en PL, obtenido por FES y purificado por ultrafiltración, aumentó enormemente al ser deshidratado.
La transición vítrea del extracto deshidratado tuvo una profunda influencia en la estabilidad de PL. La velocidad de pérdida de actividad de esta enzima aumentó en forma abrupta por encima de Tg, demostrando la gran influencia del estado físico en el deterioro de PL.

Los estudios comparativos de pérdida de actividad PL y desnaturalización demostraron que los mecanismos involucrados en la pérdida de actividad de la enzima son diferentes en el sistema líquido y en el deshidratado.
En el sistema líquido, el proceso de desnaturalización y el de pérdida de actividad están vinculados, lo cual coincide con el comportamiento de inactivación típico de enzimas en medio líquido.
En contraposición, en el sistema deshidratado ambos procesos mostraron una clara desvinculación. El comportamiento en el sistema deshidratado dependió fuertemente de la temperatura de tratamiento térmico, ya que ésta influenció en forma diferente la velocidad de desnaturalización y la pérdida de actividad (esto se reflejó en los valores de Ea correspondientes a ambos procesos). A temperaturas por debajo del pico de desnaturalización ($T<115°C$), el proceso de pérdida de actividad es mucho más rápido que el de desnaturalización, encontrándose que aún cuando la enzima no se ha desnaturalizado, ha perdido su actividad. Por encima de la temperatura del pico de desnaturalización, en cambio, se observó una retención de la actividad de la enzima aún cuando ésta estuviera desnaturalizada.

Estos resultados sugieren la necesidad de profundizar los estudios de pérdida de estabilidad enzimática en sistemas deshidratados, donde los mecanismos involucrados aún no están comprendidos.

# Bibliografía

Acuña-Arguelles, M. E. ; Gutiérez-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.

Acuña-Argüelles, M. E.; Gutiérrez-Rojas, M.; Viniegra-González, G. ; Favela- Torres, E. (1995), "Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillius niger* in submerged and solid-state fermentation". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 43: 808-814.

Aguilar, C.; Huitrón, C. (1987), "Stimulation of the production of extra cellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition". *Enzyme and Microbial Technology,* 9: 690-696.

Ahern, T. J. y Klibanov, A. M. (1988), "Analysis of processes causing thermal inactivation of enzymes". *Methods Biochem. Anal.* 33: 27-91.

Aidoo, K. E.; Hendry, R. ; Wood, B. J. B. (1981), "Estimation of fungal growth in solid state fermentation system". *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology,* 12: 6-9.

Alaña, A.; Alkorta, I.; Domínguez, J. B.; Llama, M. J. ; Serra, J. L. (1990) "Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain". *Applied and Enviromental Microbiology,* 56: 3755-3759.

Alazard, D. and Raimbault, M. (1981), "Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation". *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology,* 12: 113-117.

Albersheim, P. and Killias, U. (1962), "Studies relating to the purification and properties of Pectin transeliminase". *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 97: 107-115.

Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J. ; Serra, J. L. (1996), "Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon". *Enzyme and Microbial Technology,* 18: 141-146.

Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J. ; Serra, J. L. (1998), "Industrial applications of pectic enzymes: a review". *Process Biochemistry,* 33: 21-28.

Antier, P. H.; Minjares, A.; Roussos, S. ; Viniegra González, G. (1993), "New approach for selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation". *Biotechnology Advances,* 11: 429-440.

Antier, P. H.; Minjares, A.; Roussos, S.; Raimbault, M. ; Viniegra González, G. (1993), "Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp". *Enzyme and Microbial Technology,* 15: 254-260.

Añón, M. C. y Jovanovich, G. (2000). En: *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Eds. A. M. R. Pilosof y G. B. Bartholomai, EUDEBA, B.A. Capítulo 5: Calorimetría diferencial de barrido, pp.97-127.

Archer, D. B. y Peberdy, J. F. (1997) "The molecular biology of secreted enzyme production by fungi". *Critical Reviews in Biotechnology,* 17: 273-306.

Arntfield, S. D.; Murray, E. D.; Ismond, M. (1998)"The influence of processing parameters on food protein functionality III. Effect of moisture content on the thermal stability of fababean protein". *Can. Inst. Food Sci. Technol J.*, 18 (3): 226-232.

Arroyo, M.; Sánchez-Montero, J. M. ; Sinisterra, J. V. (1999), "Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on differents suppor-ts: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media". *Enzyme and Microbial Technology,* 24: 3-12.

Augur, C.; Viniegra González, G. (1998) "Production of enzymes by solid substrate fermentation: relation substrate/enzyme and induction/catabolic repression". En: Proceedings of the International training course on SSF. FMS 97. Curitiba, 6-10 Oct. 1997. Raimbault, M.; Soccol, C.; Chuzel, G. Eds. Francia, Montpellier. pp 1-20.

Auria, R.; Morales, M.; Villegas, E. ; Revah, S. (1993), "Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors". *Biotechnology and Bioengineering,* 41 :1007-1013.

Balakrishnan, K.; y Pandey, A. (1996), "Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation". *Journal of Scientific and Industrial Research,* 55: 365-372.

Banga, J.R. y Singh, R.P., (1994), "Optimization of air drying of foods", *Journal of Food Engineering*, 23: 189-211.

Baracat-Pereira, M. C.; Valentim, C.; Muchovej, J. J.; Silva, D. O. (1979), "Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibres". *Biotechnology Letters,* 25: 7-35.

Baracat-Pereira, M. C. ; Coelho, J. L. C. ; Silva, D. O. (1994), "Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers". *Letters in Applied Microbiology*, 18: 127-129.

Bassit, N.; Coohet, N. ; Lebeault, J. M. (1993), "Influence of $a_w$ on *Streptococcus diacetylatis* metabolism". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 40: 399-401.

Battaglino, R. A.; Huergo, M.; Pilosof, A. M. R. ; Bartholomai, G. B. (1991), "Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35: 292- 296.

Baxter, C. J.; Magan, N.; Lane, B. ; Wildman, H. G. (1998), "Influence of water activity and temeperature on in vitro growth of surface cultures of a *Phoma* sp. and production of the pharmaceutical metabolities, squalestatins S1 and S2". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 49: 328-332.

Beever, R. y Laracy, E. (1986), "Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*". *Journal of Bacteriology,* 168:1358-1365.

Bell, N. L. (1997), "Peptide stability in solids and solutions". *Biotechnology Progress,* 13: 342-346.

Bell, N. L.; Hagerman, M. J. ; Bauer, J. M. (1995 a), "Impact of moisture on thermally induced denaturation and decomposition of lyophilized bovine somatotropin". *Biopolymers,* 35: 201-209.

Bell, N. L.; Hagerman, M. J.;Muraoka, L: (1995 b). "Thermally induced denaturation of lyiophilized bovine somatotropin and lyzozyme as impacted by moisture and excipients". J. Pharm. Science, 84 (6):707-712.

Bell, N. L. y Hageman, M. J. (1996), "Glass transtion explanation for the effect of polyhydroxy compounds on protein denaturation in dehydrated solids". *Journal of Food Science*, 61: 372-378.

Beuchat, L. (1983), "Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds". *Journal of Food Protection,* 46: 135-141.

Bigelis, R. y Lasure, L. (1987), "Food and beverage mycology" Ed. Larry Beuchat. Avi Book. Pub. van *Nostrand Reinhold*; N.Y. 473-516.

Blais, P.; Rogers, P. A. ; Charest, P. M. (1992), "Kinetic of the production of polygalacturonase and pectin lyase by two closely related formae specials of fusarium oxysporum". *Experimental Mycology*, 16: 1-7.

Blankers I. (1995), "Properties and applications of lactitol". *Food Technology*, (january): 67-68.

Bombara, N.; Pilosof, A. M. R. ; Añon, M. C. (1994), "Thermal stability of a neutral protease of *Aspergillus oryzae*". *Journal of Food Biochemistry*, 18: 31-41.

Box, G. E. P. y Drapper, N. (1987), *"Empirical model-building and response surfaces"*. (Wiley, ed.), N Y, USA.

Box, G. E. P. y Hunter, J. S. (1957), "Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces". *Ann. Math. Stat.*, 28: 195-241.

Box, G. E. P.; Hunter, W. ; Hunter, J. S. (1978), "Statistics for experimenters". John Wiley & Sons, Inc., NY.

Bradford, M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". *Analytical Biochemistry,* 72: 248-254.

Braverman, J. B. S. (1980), "Sustancias pécticas, gomas vegetales". En: *Introducción a la bioquímica de los alimentos.* (Ed.) El Manual Moderno, SA, México, 146-164.

Brumano, M. H. N.; Coelho, J. L. C.; Araújo, E. F. and Silva, D. O. (1993), "Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9: 225-228.

Buera, M. P.; Levi, G. ; Karel, M. (1992), "Glass transition in poly(vinyl)pyrrolidone: Effect of molecular weight and diluents". *Biotechnology Progress*, 8: 144-148.

Butler, S. L. y Falke, J. J. (1996), "Effect of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: A disulfide trapping study". *Biochemistry*, 35: 10595-10600.

Cahagnier, B.; Lesage, L; Richardmolard, D. (1993). "Mold growth and conidiation in cereal grains as affected by water activity and temperature".*Lett. In Appl. Microbiol.* 17(1): 7-13.

Capeland, R. A. (1994). "Protein folding stability". En: Metods of protein analysis. Chapman & Hall, NY, pp 199-219.

Cardona, S.; Schebor, C.; Buera, M.; Karel, M. ; Chirife, J. (1997), "Thermal stability of invertase in reduced moisture amorphous matrices in relation to glassy stage and role of trehalose crystallization". *Journal of Food Science*, 62: 105-112.

Carpenter, J.F. y Crowe, J.H., (1988), "Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation", *Cryobiology*, 25: 459-470.

Carpenter, J. F.; Prestrelski, S. J. ; Arakawa, T. (1993), "Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303: 456-464.

Carrizales, V. (1987), "Producción de enzimas extra celulares en cultivo en medio sólido". In: *Biotecnología de enzimas*. Huitron, C. (Ed.), U. A. M. Mexico, 71-85 .

Carrizales, V. y Jaffe, W. (1986), "Solid state fermentation: An appropiate biotechnology for developing countries". *Interciencia*, 11: 1-5.

Cavalitto, S. F.; Arcas, J. A. ; Hours, R. A. (1996), "Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities". *Biotechnology Letters,* 18: 251-256.

Charlang, G. y Horowitz, N. H. (1974), "Membrane permeability and the loss of germination factor from *Neurospora crassa* at low water activities". *Journal of Bacteriology, 117: 261-264.*

Cheetham, P. S. J. (1985), "Principios de enzimología industrial". En: *Manual de biotecnología de los enzimas*. A. Wiseman Acribia (ed.).

Chen, C. S. y Wu, M. C., (1998), "Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices". *Journal of Food Science*, 63: 747-750.

Cheng, C. y Udaka, S. (1991), "Efficient production of Taka-amylase by *Trichoderma viride". Agric. Biol. Chem*. 55 :1817-1822.

Chirife, J. y Buera, M. P. (1996), "Water activity, water glass dynamics, and the control of microbiological growth in foods". *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 36: 465-513.

Clausen, C. A. y Green, F. (1996), "Characterization of polygalacturonase from the brown-rot fungus *Postia placenta*". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 45: 750-754.

Clay, R. P.; Bergmann, C. W. y Fuller, M. S. (1997), "Isolation and characterization of and endopolygalacturonase from *Cochliobolus sativus* and a cytological study of fungal penetration of barley". *Phytopathology,* 87: 1148-1153.

Cliffe, K. (1989), En: Biotecnología para Ingenieros. Limusa, Noriega Editores. Capítulo 4.

Cocero, A. M. y Kokini, J. L. (1991) "The study of the glass transition of glutenin using small amplitude oscillatory rheological measurements and differential scanning calorimetry". *J Reol.* 35 (2): 257-269.

Cochran, W. G. y Cox, G. M. (1976), *Diseños experimentales,* 2da. Edición, Ed. Trillas, México.

Colaço, C.; Sen, S.; Thangavelu, M.; Pinder, S. ; Roser, B. (1992), "Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology". *Biotechnology,* 10: 1007-1011.

Constantino, H.; Langer, R.; Klibanov, A. (1994). " Solid phase aggregation of proteins under pharmaceutically relevant conditions." *J. Pharm. Scl* . 83(12): 1662-1669.

Corry, J. E. (1987), "Relationships of water activity to fungal growth". In: *Food and Beverage Mycology.* L. R. Beuchat (Ed.), Avi Book, Pub. by van Nostrand Reinhold, NY.

Cotty, P.; Cleveland, T.; Brown, R. ; Mellon, J. (1990), "Variation in polygalacturonase production among *Aspergillus flavus* isolates". *Applied and Enviromental Microbiology,* 56: 3885-3887.

Coughlan, M. P. y Moloney, A. P. (1988), "Isolation of 1,4-β-D- glucan 4-glucanohydrolase of *Talaroyces emersonii*". *Methods in Enzymology,* 160: 363-368.

Cuori, S.; de Farías, A. X. (1995). "Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes". *Revista de Microbiología.* 26(4): 314-317.

Creuly, C.; Larroche, Ch. ; Gros, J.-B. (1992), "Bioconversion of fatty acids into methyl ketones by spores of *Penicillium roquefortii* in a water-organic solvent, two-phase system". *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 669-678.

Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Carpenter J. F. ; Aurell Wistrom, C. (1987), "Stabilization of dry phospholipid biolayes and proteins by sugars". *Biochemical Journal*, 242: 1-10.

Crowe, J.H., Carpenter, J.F. y Crowe, L.M., (1998), "The role of vitrificaton in anhydrobiosis", *Annu. Rev. Physiol.*, 60: 73-103.

Cruisckshank, R. y Wade, G. (1982), "Detection of pectic enzymes in pectin-acrilamide gels". *Analytical Biochemistry,* 107: 177-181.

Davies, L. L. y Baudoin, A. B. A. M. (1987), "Effect of osmotic potential on synthesis and secretion of polygalacturonase and cellulase by *Geotrichum candidum*". *Canadian Journal of Microbiology,* 3: 138-141.

De Graaf, E. M.; Madeka, H.; Kokini, J.L. (2993). "Determination of the effect of moisture on gliadin glass transition using mechanical spectrometry and differential sacanning calorimetry". *Biotechnol. Progr.* 9:210-213.

De Cordt, S.; Avila, I.; Hendrickx, M. and Tobback, P. (1994), "DSC and protein- based time-temperature integrators: case study of α-amylase stabilized by polyols and/or sugars". *Biotechnology and Bioengineering,* 44: 859-865.

Delgado, L.; Trejo, B.; Huitrón, C. ; Aguilar, G. (1992), "Pectin lyase from *Aspergillus niger* sp. CH-Y-1043". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 39: 515-519.

Desfarges, Ch.; Larroche, C.; Gros, J. (1987)."Spore production of *Penicillium roquefortl* by solid state fermentation: stoihiometry, growth and sporulation behaviour" *Biotech. Bloeng.* 29:1050-1058.

Devi, Anjana, N. y Rao, Appu, A. G. (1996), "Fractionation, purification and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*". *Enzyme and Microbial Technology,* 18: 59-65.

Devi, Anjana N. y Rao, Appu A. G. (1998), "Effect of additives on kinetic thermal stability of polygalacturonase II from *Aspergillus carbonarius*: Mechanism of stabilization by sucrose". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 46: 3540-3545.

Doehlert, D. H. (1970), "Uniform shell designs". *Appl. Statistics.*, 19: 231-239.

Doelle, H. W.; Mitchell, D. A. ; Roltz, C. E. (1992), "Solid substrate cultivation". *Elsevier Science Publisher Ltd.*; London & NY.

Domínguez, J. M.; Acebal, C.; Jimenez, J.; De La Mata, I.; Macarron, R. ; Castillon, M. P. (1992), "Mechanisms of thermoinactivation of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* QM 9414". *Biochemical Journal*, 287: 583-588.

Domínguez, H.; Núñez, M. J. ; Lema, J. M. (1994), "Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review". *Food Chemistry,* 49: 271-286.

Dorta, B.; Ertola, J.; Arcas, J. (1996)."Characterization of growth and sporulation of Metharizium anisoplae in solid substrate fermentation". *Enz. Microb. Technol.* 19:434-439.

Duddu, S. y Dal Monte, P. (1997), "Effect of glass transition temperature on the stability of lyophilized formulations containing a chimeric therapeutic monoclonal antibody". *Pharmaceutical Research,* 14: 591-595.

Dumoulin, E. y Bimbenet, J.J., (1998), "The properties of water in foods". *ISOPOW* 6, Ed. David S. Reid, Blackie Academic and Profess., N.Y.

Ebisu, S.; Mori, M.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Yamagata, H.; Tsukagoshi, N. ; Udaka, S. (1993), "Production of fungal protein. Taka-amylase, by protein producing *Bacillus brevis* HPD31". *J. Indust. Microbiol.* 11: 83-88.

Favela-Torres, E.; Cordova-López, J.; García-Rivero, M. ; Gutiérrez-Rojas, M. (1998), "Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations". *Process Biochemistry,* 33: 103-107.

Fayyaz, A.; Asbi, B. A; Ghazali, H.; Man, Y. B. C. ; Jinap, S. (1994), "Purification and molecular properties of papaya pectinesterase". *Food Chemistry,* 49: 373-378.

Fox, T. G. y Flory, P. J. (1950), "Second order transition and related properties of polystyrene. I. Influence of molecular weight". *Journal of Applied Physics,* 21: 581-591.

Franks, F. (1993), "Solid aqueous solutions". *Pure and Applied Chemistry,* 65: 2527-2537.

Friedrich, J.; Cimerman, A. ; Perdith, A. (1987), "Mixed culture of *Aspergillus awamori* and *Trichoderma reesei* for bioconversion of apple distillery waste". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 26: 299-303.

Friedrich, J.; Cimerman, A. ; Steiner, W. (1990), "Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of inoculum size and poassium hexacyanoferrate II-trihydrate". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 33: 377-381.

Friedrich, J.; Cimerman, A.; Steiner, W. (1994), "Concomitant synthesis of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes and citric acid on sucrose". *Enzyme and Microbial Technology,* 16: 703-707.

Frish, H. L. ; Stern, S. A. (1983), "Diffusion of small molecules in polymers". *CRC Critical Review in Solid State and Materials Science,* 11: 123-187.

Fujita, Y. and Noda, Y. (1981), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 18: 12-17.

Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M. ; Kalantzi, O. (1997), "Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 47: 425-429.

Garett Rees, D; Hugh Jones, D. (1996)."Stability of L-phenylalanine ammonia-lyase inaqueous solution and as the solid state in air and organic solvents". *Enz. Microb. Tecnol.* 19:282-288.

Gaucedo, J. M. (1992), "Carbon catabolite repression in yeast". *European Journal of Biochemistry*, 206: 297-313.

Ganthavorn, C.; Nagel, C. W. ; Powers, J. R. (1991), "Thermal inactivation of Asparagus Lipoxygenase and Peroxidase". *Journal of Food Science*, 56: 47-49, 79.

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." *Biotechnol. Bioeng.* 31:457-463.

Ghildyal, N. P.; Lonsane, B. K.; Sreekantiah, K. R. ; Murthy, V. S. (1985), "Economics of submerged and solid state fermentation for the production of amyloglucosidase". *Journal of Food Science and Technology*, 22: 171-176.

Ghildyal, N. P.; Ramakrishna, S. V.; Nirmala Devi, P.; Losane, B. K. , Ashtana, H. N. (1985), "Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation". *Journal of Food Science and Technology,* 18: 244-257.

Gibson, T. D.; Higgins, I. J. ; Woodward, J. R. (1992), "Stabilization of analytical enzymes using a novel polymer-carbohydrate system and the production of a stabilized, single reagent for alcohol analysis". *Analyst*, 117: 1293-1297.

Gonçalves, A. M.; Schacht, E.; Matthijs, G.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. ; Gil, M. H. (1999), "Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports". *Enzyme and Microbial Technology*, 24: 60-66.

Graber, M.; Combes, D. (1989). "Effect of polyols on . fungal α-amylase thermostability". *Enz. Microb. Technol.* 11: 673-677.

Grajek, W. (1994), "Sporogenesis of the enthomopathogenic fungus *Verticillum lecanii* in solid state culture". *Folia Microbiology*, 39: 29-32.

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

Gregory, R. B. (1996), "Protein hydration and glass transitions". *ISOPOW,* 6: 57-138.

Guerra, G.; Uribe, S.; Pardo, J. P. (1995), "Reactivity of the $H^+$-ATPase from *Kluyveromyces lactis* to sulfhydryl reagents". *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 321: 101-107.

Gupta, M. (1991), "Thermostabilization of proteins". *Biotech. Appl. Biochem.* 14: 1-11.

Hahn-Hägerdal, B. (1986), "Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes". *Enzyme and Microbial Technology,* 8: 322-327.

Hahn-Hägerdal, B. y Martens, H. (1976), "Influence of water content on the stability of myoglobin to heat treatment". *Journal of Food Science,* 41: 933-937.

Hancock, B. y Zografi, G. (1997), "Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems". *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 86: 1-12.

Hang, Y. D. y Woodams, E. E. (1987), "Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in solid state fermentation systems". *Biotechnology Letters,* 9: 183-186.

Hang, Y. D. y Woodams, E. E. (1994), "Production of fungal polygalacturonase from apple pomace". *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie,* 27: 194-196.

Hart, H. E.; Parish, M. E.; Burns, J. K. ; Wicker, L. (1991), "Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*". *Journal of Food Science,* 56: 480-483.

Heikkilae, H. O. ; Nurmi, J. V. (1990), "A crystalline lactitol monohydrate and process for the preparation thereof, use thereof, and sweetening agent". *PCT International Patent Application*.

Hesseltine, C. W. (1987), "Solid State Fermentation - An Overview". *International Biodeterioration*, 23: 79-89.

Hilton, M. (1999). In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2nd Ed. Demain and Davies (Eds.) ASM Press. Washington D. C. Capítulo 4.

Hoseney, R.C; Zeleznak, K; Lai, C. S. (1986)"Wheat gluten: a glassy polymer". *Cereal Chem.* 63: 285-286.

Hours, R. A. ; Sakai, T. (1994), "Protopectinase production in solid state culture of *Aspergillus awamori*". *Biotechnology Letters,* 16: 721-726.

Hottiger, T. De Virgilio; Hall, C.; Boller, M. N. ; Wiemken, T. A. (1994), "The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *In vitro*". *European Journal of Biochemistry*, 219: 187-193.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Domínguez, H. ; Robert-Baudouy, J. (1992), "Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937". *Journal of Bacteriology,* 174: 7807-7818.

Ismail, A.-M. S. (1996), "Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains". *Process Biochemistry,* 31: 645-650.

Iyer, S. ; Caplan, A. (1998), "Products of proline catabolism can induce osmoticalliy regulated genes in rice". *Plant Physiology*, 116: 203-211.

Izutsu, K.; Yoshioka, S. ; Takeda, Y. (1991), "The effects of additives on the stability of freeze dried β-galactosidase stored at elevated temperature". *International Journal of Pharmaceutics*, 71: 137-146.

Izutsu, K.; Yoshioka, S. ; Terao, T. (1994), "Stabilizing effect of amphiphilic excipients on the freeze-thawing and freeze drying of lactate dehydrogenase". *Biotechnology and Bioengineering*, 43: 1102-1107.

Janecek, S. (1993)."Strategies for obtaining stables enzymes". *Process Biochem.* 28: 435-445.

Kalichevsky, M. T.; Jaroszkiewicz, E. M.; Blanshard, J. M. (1992). "Glass transition of gluten. 1. Gluten and gluten-sugar mixtures". *Int. J. Biol. Macromol.* 14: 257-266.

Karmas, R. (1994), "The effect of glass transition on non-enzymatic browning in dehydrated food systems". University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, U.S.A.

Karmas, R.; Buera, M. P. ; Karel, M. (1992), "Effect of glass transition on rates of non-enzymatic browning in food systems". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 873-879.

Kester, H. ; Visser, J. (1990), "Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*". *Biotech. Appl. Biochem.* 12: 150-160.

Kim, J-C.; Kim, H-Y. ; Choi, Y-J. (1998), "Production and characterization of acid-stable pectin lyase from *Bacillus* sp. PN 33". *Journal of Microbiology and Biotechnology,* 8: 353-360.

Kokini, J. L.; Cocero, A. M.;Madeka, H.; De Graaf, E. (1994). "Order-disorder transitions and complexing reactions in cereal proteins and their effect on rheology". En: Advances in structured and heterogeneous continua. D.A. Siringer y Y. G. Yanovsky (Eds.) Allerton Press. pp 215-234.

Labuza, T. P. (1972) "Nutrient losses during drying and storage of dehydrated fodds". *Crit. Rev. Food Technol.* 3: 217-220.

Labuza, T. P. (1985). "An integrated approach to food chemistry: illustrative cases". En: Food chemisty (2da. Ed.). Fennema O. R. (Ed.), NY. Marcel Dekker, pp 924-929.

Labuza, T. P. (1986), "Interpretation of sorption data in relation to the state of constituent water". En: Water Relations of Food; R. B. Dack-Worth (Ed.); London; pp. 155.

Lacey, J. (1986), "Water availability and fungal reproduction: Patterns of spore production, liberation and dispersal". In: Fungi, Water and Plants. Ayres, P. G. and Boddy, L. (Eds), *British Mycological Society Symposium,* Cambridge, Univ. Press; p. 77.

Laemmli, U. K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4". *Nature*, 227: 680-685.

Larroche, C. (1996), "Microbial growth and sporulation behaviour in solid state fermentation". *Journal of Scientific and Industrial Research,* 55: 408-423.

Lehninger, A. (1983) Bioquímica, 2da. Edición. Worth Publishers, Ediciones Omega, Barcelona, pp 285-309.

Le Mager, M. (1987), "Mechanisms and influence of water binding on water activity". En: Water Activity: Theory and Applications to Food; (Ed.) Rockland-Beuchat; California; pp.1.

Le Meste, M.; Voilley, A. ; Colas, B. (1991), "Influence of water on the mobility of small molecules dispersed in a polymeric system". En: Water relationships in Foods. Levine, H. and Slade, L. (Eds.), pp. 123-138. Plennum Press, New York.

Lencki, R. W. (1994), "Protein inactivation and its influence on industrial bioseparation". *Process Food Research International*, 27: 203-206.

Lesage, L.; Genot, C.; Record, E.; Pouliquen, Ch. ; Molard, D. R. (1993), "Fatty acid composition and molecular order of phospholipids from *Eurotium chevalieri* in response to changes in water activity". *Journal of General Microbiology,* 139: 1653-1661.

Leslie, S. B.; Teter, S. A.; Crowe, M. L. ; Crowe, J. H. (1994), "Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yest cells". *Biochemica et Biophysica Acta*, 1192: 7-13.

Levine, H. ; Slade, L. (1992), "Another view of trehalose for drying and stabilizing biological materials". *BioPharm*, 5: 36-40.

Liapis, A. I.; Pikal, M. J. ; Bruttini, R. (1996), "Research and development needs and opportunities in freeze drying". *Drying Technology*, 14: 1265-1300.

Lis, H. ; Shanon, N. (1993), "Protein glycosylation: structural and functional aspects". *European Journal of Biochemistry*, 218: 1-27.

Loera, O.; Aguirre, J.; Viniegra González, G. (1999). "Pectinase production by a diploid construct from two Aspergillus niger overproducing mutants". *Enz. Microb. Technol.* 25: 103-108.

Lonsane, B. K. ; Ghildyal, N. P. (1992(a)), "Exoenzymes". In: Solid Substrate Cultivation. Doelle, H. W.; Mitchell, D. A. and Rolz, C. E. (eds), *Elsevier Science Publishers*, Chapter 11, pp.191-209.

Lonsane, B. K. and Ramesh, M. V. (1992), "Production of bacterial thermostable enzyme by solid state fermentation: A potential tool for achieving economy in enzyme production". *Advances in Applied Microbiology*, 15: 1-48.

Lonsane, B. K.; Saucedo-Castaneda, G.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra-Gonzalez, G.; Ghildyal, N. P.; Ramakrishna, M. ; Krishnaiah, M. M. (1992 (b)), "Scale up strategies for solid state fermentation systems process". *Biochemistry*, 27: 259-273.

Lozano, P.; Combes, D. ; Iborra, J. L. (1994), "Effects of polyols on α-chymotrypsin thermostability: a mechanistic analysis of the enzyme stabilization". *Journal of Biotechnology*, 35: 9-18.

Luard, E. (1982), "Acumulation of intracellular solutes by two filamentous fungi in response to growth at low steady state osmotic potencial". *Journal of General Microbiology,* 128: 2563-2574.

Luard, E. (1982), "Growth an accumulation of solutes by *Phytophora cinnamoni* and other lower fungi in response to changes in external osmotic potencial". *Journal of General Microbiology,* 128: 2583-2590.

Luyben, K.Ch.A.M., Liou, J.K. ; Bruin, S., (1982), "Enzyme degradation during drying", *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 533-552.

Mac Kenzie, 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.

Madeka, K. y Kokini, J. L. (1996). "Effect of glass transition and aggregation on rheological properties of zein: development of a preliminary state diagram." *Cereal Chem.* 73(4): 433-438.

Mahmood, A. U.; Greenman, J. ; Scragg, A. H. (1998), "Orange and potato peel extracts: Analysis anduse as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture". *Enzyme and Microbial Technology,* 22: 130-137.

Maldonado, M. C.; Navarro, A. ;Callieri, D. A. S. (1986), "Production of pectinases by *Aspergillus* sp. using differently pretreated lemon peel as the carbon source". *Biotechnology Letters*, 8: 501-504.

Maldonado, M. C. ; Callieri, D. A. S. (1989), "Influence of enviromental conditios on the production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger*". *MIRCEN Journal*, 5: 327-333.

Maldonado, M. C.; Strasser de Saad, A. M. ; Callieri, D. A. S. (1989 a), "Catabolite represion of the synthesis of inductible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp". *Current Microbiology*, 18: 303-306.

Maldonado, M. C.; Strasser de Saad, A. M. ; Callieri, D. A. S. (1989 b), "Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp". *Sciences Des Aliments,* 9: 101-110.

Maldonado, M. C.; Strasser de Saad, A. M. and Callieri, D. A. S. (1993), "Methanol utilization by strain of *Aspergillus niger*: Influence on the synthesis and activity of pectinases". *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 9: 202-204.

Maldonado, M. C. ; Strasser de Saad, A. M. (1998), "Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid systems". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 20: 34-38.

Manning, M. C.; Patel, K. and Borchardt, R. T. (1989), "Stability of protein pharmaceuticals". *Pharmaceutical Research,* 6: 903-918.

Matsumoto, I.; Nakaguki, T.; Ito, Y.; Arai, K. (1992). "Preventive effect of various sugars against denaturation of carp miofibrillar protein caused by freeze drying". Nippon Suisan Gakaishi. 58(10): 1913-1918.

Matveev, Y.; Grinberg, V.; Sochava, I. ; Tolstoguzov, V. (1997), "Glass transition temperature of proteins. Calculation based on the additive contribution method and experimental data". *Food Hydrocolloids,* 11: 125-133.

Mayans, O.; Scott, M.; Connerton, I.; Gravensen, T.; Benen, J.; Visser, J.; Pickersgill, R. ; Jenkins, J. (1997), "Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substance-binding clefts of pectin and pectate lyases". *Structure,* 5: 677-689.

Mazzobre, M. F.; Buera, M. P. ; Chirife, J. (1997), "Protective role of trehalose on thermal stability of lactose in relation to its glass and crystal foaming properties and effect of delaying crystalization". *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie,* 30: 324-339.

Meerdink, G. y Van't Riet, K., (1995), "Prediction of product quality during spray drying", *Food and Bioproducts-Processing,* 73: 165-170.

Mikhailova, R. V.; Sapunova, L. I. ; Lobanok, A. G. (1992), "Regulation of biosynthesis of pectin hydrolases in *Aspergillus alliaceus*". *Applied Biochemistry and Microbiology*, 28: 190-195.

Mikhailova, R. V.; Sapunova, L. I. ; Lobanok, A. G. (1994), "Biosynthesis of pectin lyases in *Penicillium adametzii, P. citrinum* and *P. janthinellum*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 457-461.

Mildenhall, J. P.; Prior, B. A. ; Trollope, L. A. (1981), "Water relations of *Erwinia crysantemi*: growth and extracellular pectin lyase production". *Journal of General Microbiology*, 127: 27-34.

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

Mitchell, D. A. (1992) En: Solid Substrate Cultivation. Doelle, H. W.; Mitchell, D. A. and Rolz, C. E. (Eds.), *Elsevier Science Publishers*, Capítulos 1, 3 y 6.

Mitchell, D. A.; Doelle, H. W. ; Greenfield, P. F. (1988), "Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid state fermentation". *Applied and Microbiology Biotechnology*, 28: 598-602.

Mohr, K.H. y Loehn, M., (1992), "Quality retention during drying of biological products. II. Kinetic studies on the thermal inactivation of beta-glucanase", Nahrung, 36: 76-83.

Morales Díaz, A.; Kokini, J. L. (1998)."Understanding phase transitions and chemical complexing reactions in the 7S and 11S soy protein fractions". En: Phase/State transitions in Food. Rao, M. A. Y Hartel, R. W. (Eds.). Ed. Marcel Dekker, NY. pp 273-312.

Mozhaev, V. V. (1993), "Mechanism-based strategies for protein thermostabilization". *TIBTECH*, 11: 88-95.

Mozhaev, V. V.; Berezin, I. V. ; Martinek, K. (1988), "Structure-stability relationship in proteins: Fundamental task and strategy for the development of the stabilized enzyme catalysts for biotechnology". *CRC Critical Reviews In Biochemistry,* 23: 235-282.

Mozhaev, V. V.; Poltevsky, K.; Slepnev, V.; Bedun, G. ; Levashov, A. (1991), *FEBS Letters,* 292: 159-161.

Mudgett, R. E. (1986), "Solid-state fermentation. In: Manual of industrial microbiology and biotechnology". Demain, A. L. and Solomon, H. A. (Eds.), American Society for Microbiology. Washingtong DC., pp. 66-83.

Naidu, G. S. N. ; Panda, T. (1999), "Performance of pectolytic enzymes during hydrolisis of pectic substances under assay conditions: a statistical approach". *Enzyme and Microbial Technology,* 25: 116-124.

Navarro del Cañizo, A.; Hours, R.; Miranda, M. ; Cascone, O. (1994), "Fractionation of fungal pectic enzymes by immobilized metal ion affinity chromatography". *Journal of Science of Food and Agriculture,* 64: 527-531.

Neidelman, S. L. (1990), "Enzyme reactions under stress conditions". *Critical Reviews in Biotechnology,* 9: 273-286.

Nelson, N. A. (1945), "Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose". *Journal of Biological Chemistry,* 153: 315-380.

Nicolini, L.; Volpe, C.; Pezzotti, A. ; Carilli, A. (1993), "Changes in in-vitro digestibility of oranges peels and distillery grape stalks solid-state fermentation by higher fungi". *Bioresource Technology,* 45: 17-20.

Nishio, N.; Tai, K. ; Nagai, S. (1979), "Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation". *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology,* 8: 263-270.

Noel, T. R.; Parker, R.; Ring, S. G. ; Tatham, A. S. (1995), "The glass-transition behaviour of wheat gluten proteins". *Int. J. Biol. Macromol.*, 17: 81-85.

Novo's Handbook of Practical Biotechnology (1986) ed.Col.Boyeé, Denmark.

O´Brien, J. (1996), "Stability of trehalose, sucrose and glucose to non-enzymatic browning in model systems". *Journal of Food Science*, 61: 679-682.

Öeste-Trianatafyllou, A.; Wehtje, E.; Adlecreutz, P. ; Mattiasson, B. (1996), "Calorimetric studies on solid α-chymotrypsin preparations in air and organic solvents". *Biochimica et Biophysica Acta,* 1295: 110-118.

Okasaki, N.; Sugama, S.; Tanaka, T. (1980). " Mathematical model of surface culture of koji mold". *J. Ferment. Technol.* 58: 471-476.

Osawa, T. (1970), "Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis". *Thermal. Anal*, 2: 301-324.

Pandey, A. (1992), "Recent process developments in solid-state fermentation". *Process Biochemistry*, 109 -117.

Papamichael, N. ; Hustadet, H. (1989), ",Spray drying of enzymes using additives to aid retention of activity". *Dechema Biotechnology conferences*, 1127-1131.

Paredes-López, O.; Gwyneth, I. H. (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: 159-187.

Parkin, K. L. (1993), "Enviromental effects on enzyme activity". En: Enzymes in Food Processing. Nagodawithana, T. and Reed, G. (Eds.), San Diego, California: Academic Press, Inc. Capítulo 3, pp. 39-69.

Pashova, S.; Slokoska, L.; Krumova, E.; Angelova M. (1999). "Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger* 26". *Enz. Microb. Technol*. 24: 535-540.

Penaloza, W.; Molina, M. R.; Brenes, R. G. ; Bressani, R. (1985), "Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp". *Applied and Environmental Microbiology,* 49: 388-393.

Prior, B.; Du Preez, J. C. ; Rein, P. W. (1992), "Environmental Parameters". En: Solid Substrate Cultivation. Doelle, H. W., Mitchell, D. A. and Rolz, C. E. (Eds.), Elsevier Science Publishers, Chapter 5.

Raimbault, M. y Alazard, D. (1980), "Culture method to study fungal growth in solid fermentation". *European Journal Applied Microbiology and Biotechnology,* 9: 199-209.

Raimbault, M. "General and microbiological aspects of solid substrate fermentation". En: Proceedings of the international training course on Solid substrate fermentation. FMS, Curitiba, 6-10 Oct. 1997. Raimbault, M.; Soccol, C.; Chuzel, G. (Eds.) Francia, Montpellier, 1998. pp 1-20.

Ramakrishna, N.; Lacy, J. ; Smith, J. (1993), "Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain". *Micological Research,* 97: 1393-1402.

Randall, G. C.; Randall, P. N. ; Karel, G. (1994), "Variable heat stability for multiple forms of pectin methylesterase from citrus tissue culture cells". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 42: 903-908.

Reignault, P.; Mercier, M.; Bompeix, G. ; Boccara, M. (1994), "Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*: physiological, biochemical and immunochemical studies". *Microbiology,* 140: 3249-3255.

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

Rillo, L.; Castaldo, D.; Giovane, A.; Servillo, L.; Balestrieri, C. : Quagliuolo, L. (1992), "Purification and properties of pectin methylesterase from mandarin orange fruit". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 40: 591-593.

Rombouts, F. M. ; Pilnik, W. (1980), "Pectic enzymes V, economic microbiology". In: Microbiol enzymes and bioconversion. Pilnik, W. (Ed..), Academic Press, London, UK, pp. 227-282.

Rooss, Y. H. (1993) "Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates". *Carbohydrate Research,* 238: 39-48.

Roos, Y. H. (1998), "Rol of water in phase transition phenomena in foods". En: Phase/State transitions in Foods. Rao, M. and Hartel. R. (Eds.), Marcel Decker Inc. NY-Basel- Hong Kong.

Roos, Y. H. ; Karel, M. (1991(a)) "Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars". *Biotechnology Progress,* 7: 49-53.

Roos, Y. H. ; Karel, M. (1991(b)), "Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models". *Journal of Food Science,* 56: 38-44.

Roos, Y. H. ; Karel, M. (1992), "Crystallization of amorphous lactose". *Journal of Food Science,* 57: 775-777.

Roos, Y.; Karel, M. ; Kokini, J. L. (1996), "Glass transitions in low moisture and frozen foods: effects of shelf life and quality". *Food Technology,* 50: 95-108.

Roser, B. J. (1991), "Trehalose drying: a novel replacement for freeze-drying". *Biopharmacy,* 5: 44-53.

Rossi, S., Buera, M.P., Moreno, S. ; Chirife, J., (1997), "Stabilization of the restriction enzime EcoRI dried with trehalose and other selected glass-forming solutes", *Biotechnol. Prog.*, 13: 609-616.

Rouhana, A. and Manheim, C. (1994), "Optimization of enzymatic peeling of grapefruit". *Lebensmittel -Wissenschaft und. –Technologie,* 27: 103-107.

Roussos, S.; Aquiahualt, M. A.; Brizuela, M. A.; Olmos, A.; Rodriguez, W. ; Viniegra, G. (1989), "Production, conservation and viability of filamentous fungi inoculum for solid substrate fermentation". *Micología Neotropical Aplicada,* 2: 3-17.

Roussos, S.; Olmos, A.; Raimbault, M.; Saucedo-Castañeda, G. ; Lonsane, B. (1991), "Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*". *Biotechnology Techniques,* 5: 415-420.

Sadykov, R.A., Pobedimsky, D.G. ; Bakhtiyarov, F.R., (1997), "Drying of bioactive products: Inactivation kinetics", *Drying Technology*, 15: 2401-2420.

Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J. ; Vandamme, E. J. (1993), "Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties and applications". *Advances In Applied Microbiology,* 39: 213-294.

Sánchez, V. (1999)."Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos". Tesis de doctorado, FCEyN, UBA.

Saraiva, J.; Olivera, J. C.; Hendrickx, M.; Oliveira, F. ;Tobback, P. (1996), "Analysis of the Inactivation kinetics of freeze dried α-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* at different moisture content". *Lebensmittel -Wissenschaft und-Technologie,* 29: 260-266.

Sarrette, M.; Nout, M. J. R.; Gervais, P. ; Rombouts, F. M. (1992), "Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 37: 420-425.

Sato, K. ; Sudo, S. (1999). In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2nd Ed. Demain and Davies (Eds.) ASM Press. Washington DC., Chapter 5.

Scott, W. J. (1953), "Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30° C". *Australian Journal of Biological Sciences, 6: 549-564.*

Schebor, C.; Buera, M. ;Chirife J. (1996), "Glassy state in relation to the thermal inactivation of the enzyme invertase in amorphous dried matrices of trehalose, maltodextrin and PVP." . *Journal of Food Engineering*, 30: 269-282.

Schevchik, V.E; Kester, H. C., Benen, J. A.; Visser, J. Robert Baudouy, J.; Hugovieux-Cotte-Pattat, N. (1999)."Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanteml* 3937". *J. Bacteriol.* 181(5): 1652-1653.

Schmidt, O.; Angermann, H.; Frommhold-Treu, I. ; Hoppe K. (1995), "Experimental and theoretical investigations of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 424-430.

Schwan, R. F.; Cooper, R. M. ; Wheals, A. E. (1997), "Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts". *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 234-244.

Serra, J. L.; Alkorta, I.; Llama, M. J. : Alaña, A. (1992), "Aplicación industrial de las enzimas pécticas. Producción, purificación, Inmovilización y algunas de las propiedades de la pectina liasa de *Penicillium italicum*". *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 11: 127-134.

Sessa, D. (1992), "Hydration effect on the thermal stability of proteins in cracked soybeans and deffated soy flour". *Lebensmittel -Wissenschaft und- Technologie,* 25: 365-370.

Seymour, T. A.; Preston, J. F.; Wicker, L.; Lindsay, J. A. ; Marshall, M. R. (1991), "Purification properties of pectinesterases of Marsh white grapefruit pulp". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 39: 1080-1085.

Shah, N. K.; Ramamurthy, V. ; Korthari, R. M. (1991), "Comparative profiles of fungal α-amylase production by submerged and surface fermentation". *Biotechnology Letters,* 13: 361-364.

Shah, J. A.; Tilburn, J.; Adlard, W. M. ; Arst, Jr. H. N. (1991), "pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*". *FEMS Microbiology Letters*, 77: 209-211.

Shankaranand, V. S.; Ramesh, M. V. and Losane, B. K. (1992), "Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in biosynthesis of methabolites by some bacterial and fungal cultures". *Process Biochemistry*, 27: 33-36.

Shevchik, V. E; Robert-Baudouy, J. ; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997), "Pectate lyase peel from *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family". *Journal of Bacteriology*, 179: 7321-7330.

Siessere, V. ; Said, S. (1989), "Pectic enzymes production in solid state fermentation using citrus pulp pellets by *Tallaromyces flavus, Tubercularia vulgaris* and *Penicillium charlessi*". *Biotechnology Letters*, 11: 343-344.

Silman, R.; Bothast, R. ; Schisler, D. (1993), "Production of Colletotrichum truncatum for use as a mycoherbicide. Effects of culture, drying and storage on recovery and efficacy". *Biotechnology Advances*, 11: 561-575.

Simatos, D.; Blond, G. and Perez, J. (1995), "Basic physical aspects of glass transition". In: Food Preservation by Moisture Control. Barvosa-Cánovas G. V. and Welti-Chanes J. (Eds.), pp. 3-31. Technomic, Lancaster, PA.

Slade, L. ;Levine, H. (1988), "Structural stability of intermediate moisture foods-a new understanding". In: Food Structure-Its creation and evaluation. Blanshard, J. M. V. and Mitchell J. R. (Eds.), pp. 115-147. Butterworths, London.

Slade, L. ; Levine, H. (1991), "Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety". *CRC Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 30: 115-360.

Smits, J. P.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Van Sonsbeeck, H. M. ; Knol, W. (1996), "Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: Substrate

composition changes, C-balance, enzyme production, growth, and kinetics". *Applied Microbiology and Biotechnology,* 46: 489-496.

Smits, J. P.; Rinzema, A.; Tramper, J.; van Sonsbeeck, H. M.; Hage, J. C.; Kaynak, A. and Knol, W. (1998), "The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation". *Enzyme and Microbial Technology,* 22: 50-57.

Snir, R.; Koehler, P. E.; Sims, K. A. ; Wicker, L. (1996), "Total and thermostoble pectinesterases in citrus juices". *Journal of Food Science,* 61: 379-382.

Soccol, C. R. (1998). " "Citric acid and gluoamylase production from cassava by-products in solid state fermentation".En: Proceedings of the international training course on solid state fermentation, FMS, Curitiba, 6-10 Oct. 1997. Raimbault, M.; Soccol, C.; Chuzel, G. (Eds.) Francia, Montpellier. pp 125-136.

Soccol, C. R. (1998). " Valorization of agroindustrial residues by solid state fermentation in Brazil".En: Proceedings of the international training course on solid state fermentation, FMS, Curitiba, 6-10 Oct. 1997. Raimbault, M.; Soccol, C.; Chuzel, G. (Eds.) Francia, Montpellier. pp 111-124.

Sochava, I. V. y Smirnova, O. I. (1993), "Heat capacity of hydrated globular proteins. Denaturation increment of heat capacity". *Food Hydrocolloids,* 6: 513-524.

Solá-Penna, M.; Ferreira-Pereira, A.; Lemos A. dos Passos and Meyer-Fernandes, J. R. (1997), "Carbohydrate protection of enzyme structure and function against guanidinium chloride treatment depends on the nature of carbohydrate and enzyme". *European Journal of Biochemistry,* 248: 24-29.

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

Somogyi, M. (1944), "A new reagent for the determination of sugars". *Journal of Biological Chemistry,* 153: 61-68.

Spagna, G. ; Pifferi, P. (1994), "The purification of a commercial pectin lyase from *Aspergillus niger*". *Food Chem*istry, 50: 343-349.

Sperling, L. H. (1986), En "Introduction to physical polymer science". John Wiley & Sons, NY, 2da. Ed.:224-295.

Sterling, C. (1970), "Crystal-structure of ruthenium red and stereochemistry of its pectic stain". *Am. J. Bot.* 57: 172-175.

Stratilová, E.; Markovic, O.; Skrovinová, D.; Rexová- Benková, L.; Jornvall, H. (1993), "*Pectinase Aspergillus* sp. polygalacturonases: Multiplicity, divergence, and structural patterns linking fungal, bacterial and plant polygalacturonases". *J. Prot. Chem.*, 12: 15-22.

Strumillo, C., Markowski, A.S. ; Adamiec, J., (1991), "Selected aspects of drying of biotechnological products", En: *Drying '91*, A.S. Mujumdar and I. Filková (Eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam . pp.36-55.

Sych, J.; Lacroix, C.; Adambounou, L. T. and Castaigne, F. (1990), "Cryoprotective effects of lactitol, Palatinit and Polydextrose registered on cod surimi proteins during frozen storage". *Journal of Food Science*, 55: 356-360.

Sych, J.; Lacroix, C.; and Carrier, M. (1991 a), "Determination of optimal level of lactitol for surimi". *Journal of Food Science*, 56: 285-290, 298.

Sych, J.; Lacroix, C.; Adambounou, L. T. and Castaigne, F. (1991 b), "The effect of low-or non-sweet additives on the stability of protein functional properties of frozen cod surimi". *International Journal of Food Science and Technology*, 26: 185-197.

Szczodrak, J.; Wiater, A., (1998), "Selection of method for obtaining an active lactase preparation from *Penicillium notatum*", *J. Basic Microbiol.*, 38: 71-75.

Taylor, M.; Richardson, T. (1979), "Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology". *Advances in Applied Microbiology,* 25: 7-33.

Terebiznik, M. R. (1998)."α-amilasa de *Aspergillus oryzae*: estudios de producción por fermentación ensustrato sólido, purificación y estabilización". Tesis doctoral, FCEyN, UBA.

Terebiznik, M. R.; Buera, M. P. ; Pilosof, A. M. R. (1997), "Thermal stability of dehydrated α-amylase in trehalose matrices in relation to its phase transitions". *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 30: 513-518.

Terebiznik, M. R.; Buera, M. P. and Pilosof, A. M. R. (1998 a), "Thermostability and browning development of fungal α-amylase freeze-dried in carbohydrate and PVP matrices". *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 31: 143-149.

Terebiznik, M. R.; Zylberman, V.; Buera, M. P.; Pilosof, A. M. R. (1998 b), "Stabilizing crude and ultrafiltrated α-amylase and α-glucosidase from *Aspergillus oryzae* by trehalose". *Biotechnology Techniques*, 12: 683-687.

Terebiznik, M. R.; Pilosof, A. M. R. (1999), "Biomass estimation in solid state fermentation by modelling dry matter weight loss". *Biotechnology Techniques*, 13: 215-219.

Thimasheff, S. (1993), "The control of protein stability and association by weak interactions with water. How do solvents affect these processes?". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22: 67-97.

Tombs, M. P. (1985), "Stability of enzymes". *Journal of Applied Biochemistry*, 7: 3-24.

Troller, J. A. ; Stinson, J. V. (1978), *Applied and Environmental Microbiology, 35: 521-526.*

Tucker, G. A. (1996), *Int. Food Ingr.* N 2, pag. 23-25.

Vegeraud, G.; Christensen, T. B. (1975), "Glycosylation of proteins: a new method of enzyme stabilization". *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 1391-1397.

Vieille, C. and Zeikus, G. (1996), "Thermozymes: identifiying molecular determinants of protein structural and functional stability". *TIBTECH*, 14: 183-190.

Vilariño, C.; Del Giorgio, J.; Cascone, O. (1993), "Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination". *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technologie*, 26: 107-110.

Vrábel, P.; Polakovič, M.; Štefuca, V. ; Báleš, 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), "Introducción a la biotecnología de los hongos". Ed. Acribia , S.A. Zaragoza, España.

Wang Zhi-Gang; Tong Zhe; Cheng Zu-Yun; Cong Li-Ming, (1992), "Study on pectinase and sclerotuim producing abilities of two kinds of *Aspergillus flavus* isolates from Zhejiang". *Mycopathologia,* 121: 163-168.

Wang, M.; Keen, N. (1970), "Purification and characterization of endopoligalacturonase from *Verticillum albo atrum*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 141: 749-757.

Ward, O. P. (1989), "Biotecnología de la fermentación". Ed. Acribia SA. Zaragoza (España),.

Wattad, C.; Dinoor, A. ; Prusky, D. (1994), "Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: A possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose" MPMI, 7: 293-297.

Willick, E. G.; Seligy, V. L. (1985), "Multiplicity in cellulases of *Schizophylum commune*: Derivation partly from heterogeneity in transcription and glycosylation". *European Journal of Biochemistry*, 151: 89-96.

Wiseman, A. (1985), "Manual de Biotecnología de las enzimas" Edit. Acribia S. A. Zaragoza, España. Cap.3.

Wright, D. H. T. (1982), "Application of scanning calorimetry to the study of protein behaviour in foods". En: Developments in food proteins I. Hudson, B. (Ed.), *Applied Science Publishers,* London and New Jersey.

Yamamoto, S. y Sano, Y., (1992), "Drying of enzymes: Enzyme retention during drying of a single droplet", *Chemical Engineering Science*, 47: 177-183.

Yamamoto, S. y Sano, Y., (1995), "Drying of carbohydrate and protein solutions", *Drying Technology*, 13: 29-41.

Yurkevich, V. V. (1983), "Feedback control of the synthesis of secreted enzymes by their level in the medium". In: Environmental Regulation of Microbial Metabolism; Kulaev, I. S.; Dawes, E. A. and Tempest, D. W. (Eds.); Ed. Academic Press; Biology Department, Lomonosov State University, Moscow, USSR; pp.317-324.

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

# Anexo

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Es un procedimiento mediante el cual se utiliza una matriz matemática prefijada para barrer una determinada área experimental sin necesidad de recurrir a la realización exhaustiva de todos los experimentos requeridos (por ejemplo si se quiere evaluar el efecto de cuatro factores o variables en tres niveles diferentes cada una, sobre una respuesta, se deberían realizar $3^4=81$ experimentos).

Con la utilización del diseño experimental se puede disminuir el número de ensayos, detectar interacciones entre variables, óptimos y modelizar los resultados pudiendo realizar predicciones.

Los tipos de diseños más utilizados son:

a) Diseño factorial fraccionado: Se divide un diseño factorial completo dependiendo del número de factores (variables en estudio). Su principal ventaja reside en la disminución sensible del número de ensayos pero tiene una importante desventaja que es la imposibilidad de detectar interacciones entre los factores. (no se puede llegar a ajustar los modelos a ecuaciones de segundo orden). (Cochran & Cox,1976).

b) Diseño central compuesto rotacional: Disminuye el número de ensayos a realizar. Está asociado a modelos de segundo orden por lo que detecta óptimos, interacciones y coeficienes cuadráticos. Se puede empezar con dos niveles por factor descartando así los que no parecen ser importantes y completar luego con las pruebas faltantes requeridas por la matriz experimental. Su restricción es que todos los factores deben tener el mismo número de niveles (Box & Hunter, 1957).

c) Diseño en red de Doehlert: Al igual que el anterior disminuye el número de ensayos a realizar. y está asociado a modelos de segundo orden por lo que detecta óptimos, interacciones y coeficienes cuadráticos. Se puede empezar con pocos factores y completar luego con otros de interés (existe la posibilidad de ampliar la matrices). Su característica es que para cada factor, el número establecido de niveles es diferente y fijo (Doehlert, 1970).

En todos los casos de acuerdo al número de factores y niveles, existen matrices prehechas con valores codificados Cuando se decide qué factores y en qué rangos se trabajará (valor máximo y mínimo a evaluar de cada variable) se procede a relacionar cada valor real (Xi) con el correspondiente codificado (Zi) por la siguiente ecuación:

$$X_i = z_i * \frac{\Delta x}{\Delta z} + x_0$$

Donde Xi es cada valor real; $z_i$ es cada valor codificado de la matriz prehecha; $x_o$ es el valor central (promedio del valor mínimo y máximo); $\Delta X$ es la diferencia entre el valor mínimo y máximo establecidos por el experimentador como de interés y $\Delta Z$ es lo mismo pero para los valores codificados establecidos por la matriz.

En general los dos últimos diseños (rotacional y Doehlert) cuando son modelizados ajustan a ecuaciones de segundo grado:

$$Y=a_0+a_1*X_1+a_2*X_2+.....+a_{12}*X_1*X_2+a_{13}*X_1*X_3+.....+a_{11}X_1^2+a_{22}X_2^2+.....$$

Donde Y es la respuesta; $a_0$ es el coeficiente independiente; Xi son los factores estudiados, $a_i$ es el coeficiente lineal asociado a cada factor; aij es el coeficiente asociado a la interacción entre las variables $X_i$ y $X_j$ y $a_{ii}$ es el coeficiente cuadrático asociado a la respuesta cuadrática de cada factor.

En el presente trabajo de tesis, se eligió trabajar con una red de Doehlert para poder estudiar más a fondo algunas variables de mayor interés (a las que se le asignaron mayor número de niveles), mientras que a las variables sobre las que se tenía mayor conocimiento previo se les asignaron con menor número de niveles.