

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y DE LAS  
CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE  
PROTEASAS ACIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO  
SÓLIDO

PRESENTA:

**ING. URIEL CERVERA CASTRO**

MATRICULA: 86254993

ASESOR :

**DR. SERGIO REVAH MOISEEV**

MARZO DE 1992

---

**OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO Y  
DE LAS CONDICIONES DE OPERACION PARA  
LA PRODUCCION DE PROTEASAS ACIDAS POR  
FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.**

**ING. URIEL CERVERA CASTRO.**

**ASESOR DR. SERGIO REVAH MOISEEV.**

**DPTO. DE ING. DE PROCESOS E HIDRAULICA.**

**AREA DE INGENIERIA QUIMICA.**

**MARZO DE 1992.**

**MATRICULA 86254993**

## INDICE.

I.- <u>RESUMEN</u>	1
II.- <u>MOTIVACION PARA EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO</u>	2
III.- <u>INTRODUCCION</u>	3
a) Generalidades de fermentación	3
b) Tipos de fermentaciones	3
b.1) Fermentación en estado líquido	3
b.2) Fermentación en estado sólido	5
c) Enzimas	6
c.1) Generalidades	6
c.2) Aplicaciones de las enzimas en general.	7
c.3) Fuentes de enzimas.	8
c.3.1) Enzimas vegetales.	9
c.3.2) Enzimas animales.	10
c.3.3) Enzimas microbianas	10
c.3.3.1) Producción de enzimas microbianas por fermentación en estado líquido	12
c.3.3.2) Producción de enzimas microbianas por fermentación en estado sólido	13
c.3.3.3) Proteasas	13
c.3.3.3.1) Generalidades	13
c.3.3.3.2) Tipos de proteasas	13
c.3.3.3.2.1) Proteasas alcalinas	14
c.3.3.3.2.2) Proteasas neutras	14
c.3.3.3.2.3) Proteasas ácidas	14
c.3.3.3.3) Producción comercial de proteasas microbianas	14
c.3.3.3.4) Formulación de medios de cultivo y optimización de las condiciones de operación para la producción de proteasas ácidas	15
IV.- <u>OBJETIVOS</u>	16
V.- <u>MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES</u>	17
a) Descripción del sistema experimental	17
a.1) Sistema experimental para las fermentaciones en general	17
a.2) Sistema experimental para las cinéticas de crecimiento	18
a.2.1) Cinética con fermentadores diferenciales	18
a.2.2) Cinética con un fermentador tubular	19
b) Procedimiento experimental	20
b.1) Enfoque de las experimentaciones	20
b.2) Cepas utilizadas	20
b.3) Preparación de las esporas	20
b.4) Preparación del medio de cultivo y montaje de la fermentación	20
b.5) Preparación de la solución enzimática	22
c) Técnicas analíticas	22

c.1) pH	22
c.2) Humedad	22
c.3) Pérdida en peso seco	22
c.4) Actividad proteolítica	23
c.4.1) Preparación de reactivos	23
c.4.2) Procedimiento	23
c.5) Nitrógeno soluble	25
c.6) Azúcares totales	25
c.7) Acidos nucleicos	26
c.8) Análisis estadístico	26
c.9) Determinación del crecimiento microbiano mediante el modelo de Sato	26
VI.- <u>RESULTADOS.Y DISCUSION</u>	28
a) Optimización del medio de cultivo para la producción de proteasas ácidas por medio de fermentación en estado sólido (FES)	28
a.1) Selección de la mejor cepa productora de proteasas ácidas	28
a.1.1) Fermentación con todas las cepas	28
a.1.2) Fermentación con las dos mejores cepas	31
a.2) Selección del mejor medio de cultivo utilizado como soporte de la fermentación	33
a.3) Efecto de las condiciones de operación	36
a.3.1) Efecto de la humedad inicial y de las condiciones de aereación	36
a.3.2) Efecto de la temperatura de fermentación	40
a.3.3) Efecto del pH inicial del medio de fermentación	41
a.3.4) Efecto del tamaño de partícula del medio de fermentación	44
a.3.5) Efecto del tamaño de inóculo	46
a.3.6) Efecto de la densidad de empaque del medio de fermentación	48
a.4) Efecto de la adición de inductores de las proteasas ácidas en el medio de fermentación	50
a.4.1) Adición de fuentes de carbono y nitrógeno	50
a.4.2) Adición de microelementos	53
a.4.3) Niveles de cloruro de amonio y de sulfatos de fierro y de zinc	56
a.4.4) Adición de caseína entera e hidrolizada y de combinaciones de cloruro de amonio con sulfatos de fierro y de zinc	59
a.4.5) Niveles de combinaciones de algunas fuentes de nitrógeno con microelementos de fierro y de zinc en forma de sulfatos	62
a.5) Efecto de sustancias que inducen la permeabilidad de la membrana celular	65
DISCUSION GENERAL	67
b) Cinéticas de crecimiento con las condiciones óptimas	69
b.1) FES montada en fermentadores diferenciales	69
DISCUSION	75
b.2) FES montada en un fermentador tubular	76
b.3) Comparación de las cinéticas b.1 y b.2	80
VII.- <u>CONCLUSIONES</u>	83
VIII.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	84

## I.- RESUMEN.

Mediante un proceso de fermentación en estado sólido (FES) se producen proteasas ácidas como una alternativa para satisfacer las demandas crecientes de las industrias en las que se aplican, tales como la farmacéutica, la cervecera, la alimenticia, etc.

Se optimizó el medio de fermentación y las condiciones de operación para obtener la mayor producción de proteasas ácidas, se experimentó con tres medios de fermentación que funcionan como nutrientes y soporte a la vez, los cuales fueron salvado, soya y trigo como medios puros y en diferentes combinaciones entre sí con una humedad del 50%, empacados en unos fermentadores diferenciales y acoplados a unos humificadores durante 36 horas de fermentación.

Al medio de fermentación se le adicionaron fuentes de carbono y de nitrógeno además de microelementos como promotores de la producción de proteasas ácidas, también se modificaron las condiciones de operación tales como la temperatura, el pH y la humedad iniciales del medio de fermentación, el tamaño de partícula de éste y su densidad de empaque, el tamaño de inóculo y las condiciones de aereación observándose así el efecto producido sobre la producción de dichas enzimas.

Con el medio de fermentación optimizado y las condiciones de operación más adecuadas se realizó una cinética de crecimiento midiendo la cantidad de oxígeno y de bióxido de carbono por medio de cromatografía de gases, en lo cual las tasas de consumo y producción respectivamente se utilizan como parámetros para estimar el crecimiento microbiano en fermentadores empacados.

## II.-MOTIVACION PARA EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

Como un resultado de la creciente demanda de las enzimas en sus múltiples campos de aplicación y los elevados costos de las importaciones en el mercado mundial, surge la necesidad de implementar métodos sencillos que utilicen materia prima barata para complementar y satisfacer los requerimientos de las industrias en las que se aplican dichas enzimas, así como también en importantes procesos en los que éstas se requieren.

La mayoría de las proteasas ácidas son de importación, por lo cual su explotación es muy atractiva en el mercado nacional por las diversas aplicaciones que se tienen.

Los procesos de fermentación en estado sólido (FES) no han sido explotados aún en la misma magnitud que los de fermentación en estado líquido (FEL), ésto es debido a la heterogeneidad resultante en el medio de fermentación y a la problemática que surge debido a que no se pueden controlar las condiciones de operación tales como el pH, la humedad, la remoción del calor metabólico producido, etc. bajando así los rendimientos.

Sin embargo, como resultado de varias experimentaciones a nivel laboratorio se determinarán los parámetros que se utilizarán para el escalamiento a nivel planta piloto y posteriormente a escala industrial, aprovechando además algunas de las ventajas que la FES ofrece sobre la FEL.

Las enzimas obtenidas por FES pueden utilizarse como concentrados enzimáticos, dando como resultado que los procesos de purificación puedan ser baratos, además se utilizan en concentraciones pequeñas con rendimientos aceptables, siendo así muy atractivas en la multiplicidad de sus usos.

Cabe mencionar que las enzimas obtenidas por FES no reemplazarán a las obtenidas por FEL, sino que se proyectan como una alternativa para complementar la demanda en sus diversos campos de aplicación.

### III.-INTRODUCCION.

#### a) Definición y generalidades de fermentación.

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado los procesos de fermentación aún sin tener conocimiento alguno de la existencia de los microorganismos, principalmente en la producción y conservación de alimentos y de algunas bebidas alcohólicas (Hesseltine, 1965; Sauer, 1972; Yamada, 1977; Steinkraus, 1980).

A partir de que Pasteur a mediados del siglo pasado demostró que la fermentación alcohólica se llevaba a cabo por medio de levaduras, desde ese momento hasta la segunda guerra mundial se desarrollaron algunos procesos de fermentación para producir ácido acético, láctico y cítrico además de acetona, glicerina y butanol (Bocquet, 1985; Quintero, 1987). Con el desarrollo de la industria de los antibióticos iniciada con la penicilina en esa época (Elder, 1970; Miall, 1975; Yamada, 1977), los procesos de fermentación se expandieron a nivel industrial y se han perfeccionado haciéndolos más eficientes y cada vez más sencillos debido a los modernos sistemas de control.

Los procesos de fermentación de interés llevan a cabo mediante procesos de Bioconversión, la cual se puede definir como el proceso de transformación de materiales biológicos por medio de procesos bioquímicos, que bajo condiciones controladas permiten obtener productos específicos de importancia comercial.

De esta manera para que se realice una fermentación es necesario tener lo que efectúa los procesos bioquímicos como son bacterias, levaduras, hongos y algunas algas, los nutrientes o materiales biológicos para el proceso de transformación y las condiciones ambientales adecuadas (Bocquet, 1985; Bailey, 1986; Quintero, 1987).

Cuando a un sistema de fermentación se le suministra oxígeno se efectúa una fermentación aerobia con generación de bióxido de carbono y si dicho elemento se encuentra ausente entonces se realiza una fermentación anaerobia.

Dependiendo de los productos comerciales que se requieran será el tipo de microorganismo que se utilice, el medio de fermentación adecuado y las condiciones óptimas de operación. Para el caso de los microorganismos existen varias colecciones microbianas a nivel mundial.

Las principales áreas de importancia comercial en donde se aplican las fermentaciones son la industria de los alimentos, la farmacéutica y la química, además se aplica en otros campos como en la agricultura, la ganadería, la medicina y en control ambiental para el tratamiento de aguas y residuos sólidos (Kubiak y Dubuis, 1985; Pourquie y Vandecasteele, 1985; Bailey, 1986; Quintero, 1987). Los principales productos obtenidos por fermentación son: ácidos orgánicos, aminoácidos, alcoholes y solventes, antibióticos, esteroides, proteína unicelular, vitaminas, alcaloides, enzimas, insecticidas biológicos, metano, nucleótidos utilizados como saborizantes, polisacáridos y algunos promotores del crecimiento (Yamada, 1977; Ryu, 1983; Hecht y col., 1985; Raimbault y col., 1985; Bailey, 1986; Grajek, 1988; Gibbons y Westby, 1988).

#### b) Tipos de fermentaciones.

##### b.1) Fermentación en estado líquido.

Las FEL constituyen el método de crecimiento de microorganismos más utilizado aún cuando son más recientes que las FES; a partir de los años treinta con la

industria de los antibióticos se han desarrollado enormemente a escala industrial, incluso en muchos procesos industriales las FEL se utilizan como la etapa inicial en la producción del inoculo, además de una gama muy amplia en otras aplicaciones (Barford, 1981; Godfrey, 1985; Scriban, 1985; Bailey, 1986).

Las FEL generalmente se aplican en procesos aerobios, en los cuales principalmente se considera a los siguientes (Miall, 1975; Leveau y Bouix, 1985; Calam, 1986; Quintero, 1987):

i) Aquellos en los cuales se requieren cantidades de oxígeno considerables para producir una mayor cantidad de microorganismos, principalmente en las fermentaciones con hongos filamentosos como los de la clase de los *Actinomicetos*.

ii) Aquellos en los cuales la cantidad de oxígeno requerido es mucho menor como en el caso de las fermentaciones con bacterias.

El propósito de las FEL es suministrar oxígeno y nutrientes a los microorganismos para su crecimiento, en lo cual el éxito del proceso dependerá de los equipos y materiales utilizados, de su mantenimiento, de las condiciones de incubación y del control de la temperatura, de la selección de los mecanismos de agitación, del tratamiento y esterilización del gas de aereación, del medio de cultivo y del área de trabajo (Godfrey, 1985; Leveau y Bouix, 1985; Calam, 1986).

Los problemas prácticos que se presentan en las FEL se enfocan en dos áreas, en los procesos microbiológicos y en las operaciones de proceso en los equipos de fermentación, en general se tiene lo siguiente (Leveau y Bouix, 1985; Calam, 1986):

i) La preparación del medio de fermentación y del fermentador con sus especificaciones no presenta ningún problema tecnológico, sin embargo el volumen óptimo del medio requerirá pruebas prácticas elevando los costos de producción, ya que este efecto está asociado con la transferencia de oxígeno.

ii) Un problema que generalmente se presenta es el tamaño del fermentador y del inoculo, lo cual se refleja como un bajo crecimiento, la experiencia indica que el inoculo debe madurar 2 días por lo menos antes de ser utilizado y en algunos otros procesos se requiere de un tiempo mayor para obtener mejores resultados.

iii) El crecimiento en los hongos filamentosos se aumenta utilizando medios ricos o medios complejos, pero también se incrementan los costos de producción.

iv) Frecuentemente se produce espuma en estos cultivos y se tiene la necesidad de utilizar agentes antiespumantes, los cuales se deben evaluar antes de ser utilizados teniendo además riesgos de contaminación y disminución de los rendimientos.

v) La contaminación es uno de los problemas más considerables en las FEL presentándose cambios en la apariencia del medio de cultivo, texturas en forma de nubes en los filtrados, bajos rendimientos del producto de interés y otros efectos; dichas contaminaciones se comprueban al observar una muestra en el microscopio.

vi) Las contaminaciones se evitan mediante condiciones de asepsia muy estrictas, teniendo que esterilizar el medio de fermentación y todos los adicamentos periféricos, sin embargo ciertos medios de cultivo no soportan el tratamiento térmico y se descomponen o precipitan, por lo cual se necesita de otro tratamiento con un equipo adicional que incrementa los costos del proceso.

vii) Los dispositivos periféricos de la instalación se deben aislar del biorreactor por medio de válvulas especiales que impidan introducir microbios o que acumulen material orgánico que permita el desarrollo de microorganismos, ya que resultan muy difíciles de limpiar y desinfectar, ésto también debe considerarse en los dispositivos en los que se introducen los antiespumantes.

viii) La esterilización de los dispositivos periféricos que involucren circuitos se debe de realizar de tal forma que no dañe a éstos.

ix) En algunos casos para el control del pH se adiciona bicarbonato de calcio, el cual tiene un efecto no deseado sobre el crecimiento microbiano.

x) En el caso de los organismos filamentosos cuyo crecimiento es mediante un alargamiento simétrico en todas direcciones en forma de pellets, la transferencia de oxígeno al interior de la masa del micelio se efectúa de manera deficiente, sólo en la periferia del micelio se tiene una transferencia adecuada.

xi) Según el tipo de microorganismo utilizado, las células microbianas o conglomerados tienden a sedimentarse o a flotar provocando una heterogeneidad perjudicial para el buen desarrollo del proceso, de este modo en las zonas ocupadas por los microorganismos los productos del metabolismo tienden a acumularse, teniendo un efecto de disminución y frenado del proceso por débil que resulte el papel inhibitorio de éstos sobre dichos microorganismos, mientras que en las zonas no ocupadas por la biomasa el sustrato no es degradado y no puede haber crecimiento ni producto.

xii) La homogeneidad del medio se debe de elegir cuidadosamente, ya que hay microorganismos frágiles que sufren cambios con los agitadores mecánicos y por lo tanto se recurrirá a la agitación por métodos gasógenos.

En conclusión los procesos de las FEL requieren del equipo y de los mecanismos de control adecuados, además de los medios de cultivo óptimos y de los microorganismos idóneos si se desean obtener buenos rendimientos, lo cual se traduce en una inversión considerable.

#### b.2) Fermentación en estado sólido.

Las FES se caracterizan porque el crecimiento microbiano y la formación de producto se llevan a cabo sobre la superficie de los sustratos sólidos. Estas fermentaciones constituyen procesos microbianos bien conocidos tales como el crecimiento en suelos, cultivo superficial, composteo, madera podrida, cultivo de hongos y la producción de diversos alimentos como los orientales, etc. (Cannel y Moo-Young, 1980; Doelle, 1983; Mudgett, 1986).

Los sustratos que tradicionalmente se fermentan por medio de la técnica de Koji (Miall, 1975) incluyen una variedad de productos agrícolas tales como arroz, trigo, cebada, mijo, maíz y soya, sin embargo los sustratos no tradicionales que pueden tener un importante desarrollo industrial se encuentran como un abundante suministro en los desperdicios agrícolas, forestales y alimenticios (Cannel y Moo-Young, 1980; Doelle, 1983; Hours y col., 1988; Duana y col., 1990).

En las FES se considera una mezcla gas-líquido-sólida, en la cual la fase acuosa está íntimamente asociada con las superficies sólidas y ambas a su vez están en contacto con el gas del medio que las rodea. La interfase gas-líquido provee una frontera para el intercambio de oxígeno y de bióxido de carbono, así como también para la transferencia de calor. La fase sólida aporta una fuente rica y compleja de nutrientes que pueden ser suficientes o no para los requerimientos de un microorganismo en un cultivo de fermentación (Hesseltine, 1977; Mudgett, 1986).

Los microorganismos utilizados en las FES son hongos filamentosos, unas cuantas bacterias, algunas especies de *Bacillus* y levaduras, generalmente son microorganismos aerobios (Cannel y Moo-Young, 1980; Mudgett, 1986).

Los métodos de FES no están tan avanzados como las FEL, sin embargo son utilizadas ampliamente en oriente en el procesamiento de alimentos desde hace más de 2000 años (Lonsane y Childyal, 1985; Mudgett, 1986).

Los procesos en las FES difieren de los de las FEL en que los principales nutrientes de éstos últimos son mucho más sencillos como minerales, hidrolizados proteicos, etc. mientras que en el caso de los primeros dichos nutrientes son mezclas de productos naturales generalmente, con bajas concentraciones de humedad del

medio favoreciendo la síntesis de enzimas extracelulares, además ofrecen las siguientes ventajas a nivel laboratorio y a mayor escala (Tengerdy, 1985; Mudgett, 1986):

i) Si se utiliza el grano entero entonces sólo se necesitará humedecer el medio, aunque también se puede adicionar algún ingrediente necesario disuelto en agua. Los mejores resultados se obtienen al fragmentar y controlar el tamaño de partícula de los granos.

ii) El tamaño requerido del recipiente de fermentación es relativamente pequeño debido a la menor cantidad de agua utilizada teniendo así el sustrato concentrado. La complejidad del equipo de fermentación no es mayor que el utilizado en fermentaciones convencionales.

iii) Las esporas de los hongos son utilizadas directamente en la fermentación sin tener la necesidad de disponer de tanques con inoculos previamente desarrollados.

iv) El bajo contenido de humedad requerido para obtener altos rendimientos de producto disminuye la posibilidad de contaminaciones con bacterias, teniendo cuidado de no humedecer los taponés de algodón o de otro tipo de cubiertas.

v) Las condiciones bajo las cuales los hongos crecen son mejores que las que se encuentran en sus hábitats naturales.

vi) Con una agitación constante la esporulación es casi inhibida en su totalidad eliminando los riesgos de contaminación del área de trabajo, y más aún si se trata de un microorganismo patógeno.

vii) Al menos a nivel laboratorio la aereación es facilitada debido a los espacios intersticiales formados entre las partículas del sustrato.

viii) En muchas FES los rendimientos son comparables con los obtenidos en las FEL aún cuando los cálculos no hayan sido hechos en base a peso seco.

ix) En opinión de Hesseltine los rendimientos son tan reproducibles como en el caso de las fermentaciones convencionales, lo cual está basado en resultados obtenidos en el laboratorio de Ingeniería y Desarrollo del Departamento de Agricultura en Estados Unidos.

x) El producto se extrae directamente con el solvente adecuado en menor cantidad y de manera muy eficiente, además se puede guardar el fermento en bolsas de papel y de plástico congelándolo por un tiempo sin requerir de recipientes de almacenamiento especiales.

xi) Debido a que el producto está concentrado se puede secar éste y ser incorporado a las formulaciones balanceadas animales.

En conclusión el desarrollo de las FES ha permitido mejorar los cultivos fúngicos para obtener mayores rendimientos de producto por la selección de cepas, las mutaciones inducidas, las hibridaciones y otras técnicas de Ingeniería Genética. Además los modernos equipos de control, las condiciones de operación, la optimización de los medios de cultivo y los bajos costos hacen atractivos estos procesos para la explotación comercial de los productos que se obtienen.

### c) Enzimas.

#### c.1) Generalidades.

Para llevar a cabo las reacciones metabólicas energéticamente posibles (pH's cercanos a la neutralidad, temperaturas de 0-40°C y presiones similares a la atmosférica) los seres vivos utilizan unas biomoléculas especializadas y específicas para cada función denominadas enzimas, las cuales son los catalizadores biológicos

cuya acción consiste en abatir la energía de activación cuya velocidad se multiplica por un factor del orden de  $10^{12}$ - $10^{20}$ .

Las enzimas son macromoléculas que corresponden a la clase de proteínas globulares, algunas son holoproteínas constituídas únicamente por un encadenamiento de los alfa aminoácidos y otras son heteroproteínas que poseen una parte no proteica denominada cofactor, el cual permite la actividad catalítica y está asociado a la parte proteica con una estabilidad apreciable (Schwimmer, 1981; Hubert, 1985).

La característica fundamental de los catalizadores biológicos (que son de naturaleza proteica) es que al final de cada ciclo de una reacción permanecen sin alteración alguna, listos para seguir funcionando y alcanzando rápidamente el equilibrio de dicha reacción sin alterarlo (Schwimmer, 1981; Hubert, 1985; Stanbury y Whitaker, 1987).

En conclusión las enzimas son las llaves útiles de la Biotecnología y la Bioindustria para llevar a cabo un gran número de procesos.

### c.2) Aplicaciones de las enzimas en general.

La utilización de las enzimas aporta varios beneficios, pues su especificidad permite obtener un sólo producto comparado con los procesos químicos en los cuales se obtienen generalmente productos no deseados, además incrementan los rendimientos del producto reduciendo considerablemente los costos de operación (Boyce, 1987).

Las enzimas son utilizadas en muchos campos que involucran principalmente los siguientes procesos (Godfrey, 1985; Boyce, 1987; Stanbury y Whitaker, 1987):

i) Reducir la viscosidad: Muchas enzimas reducen la viscosidad en varios materiales por medio de hidrólisis, así por ejemplo los procesos de harina de pescado pueden reducir sus costos al hacer más eficiente el secado del producto.

ii) Mejorar las extracciones: Las enzimas son utilizadas para degradar la pectina y la celulosa en los procesos de jugo de manzana, reduciendo la viscosidad y mejorando la extracción y el filtrado del jugo separándolo de la fruta aumentando además los rendimientos.

iii) Realizar bioconversiones: Por ejemplo en el proceso de inversión de glucosa a fructosa las enzimas realizan la operación de manera eficiente, obteniendo el jarabe que se utiliza como sustituto del azúcar común.

iv) Provocar separaciones: Las enzimas utilizadas en la fabricación de los quesos inducen a que la proteína de la leche y la grasa se separen del agua y de los azúcares que contiene la leche; en otros casos los quesos se obtienen cuajando la leche con renina facilitando la separación de los cuajados y procediendo a la elaboración de los quesos correspondientes.

v) Cambiar la funcionalidad: Las propiedades funcionales de la proteína de la soya pueden ser modificadas utilizando enzimas, de esta manera mediante una hidrólisis controlada de proteasas se permite que las proteínas que contiene la soya sean más solubles y más estables, aumentando además el valor proteico del producto vegetal por su mayor disponibilidad.

vi) Modificar sabores: Muchas enzimas se utilizan para modificar el sabor de los alimentos, por ejemplo el sabor picante de ciertos quesos italianos es provocado por la adición de lipasas durante su elaboración.

vii) Sintetizar químicos: Algunas reacciones hidrolíticas se pueden hacer reversibles para obtener solventes orgánicos, más aún, las enzimas también se pueden utilizar para sintetizar compuestos tales como ésteres terpenoides con altos

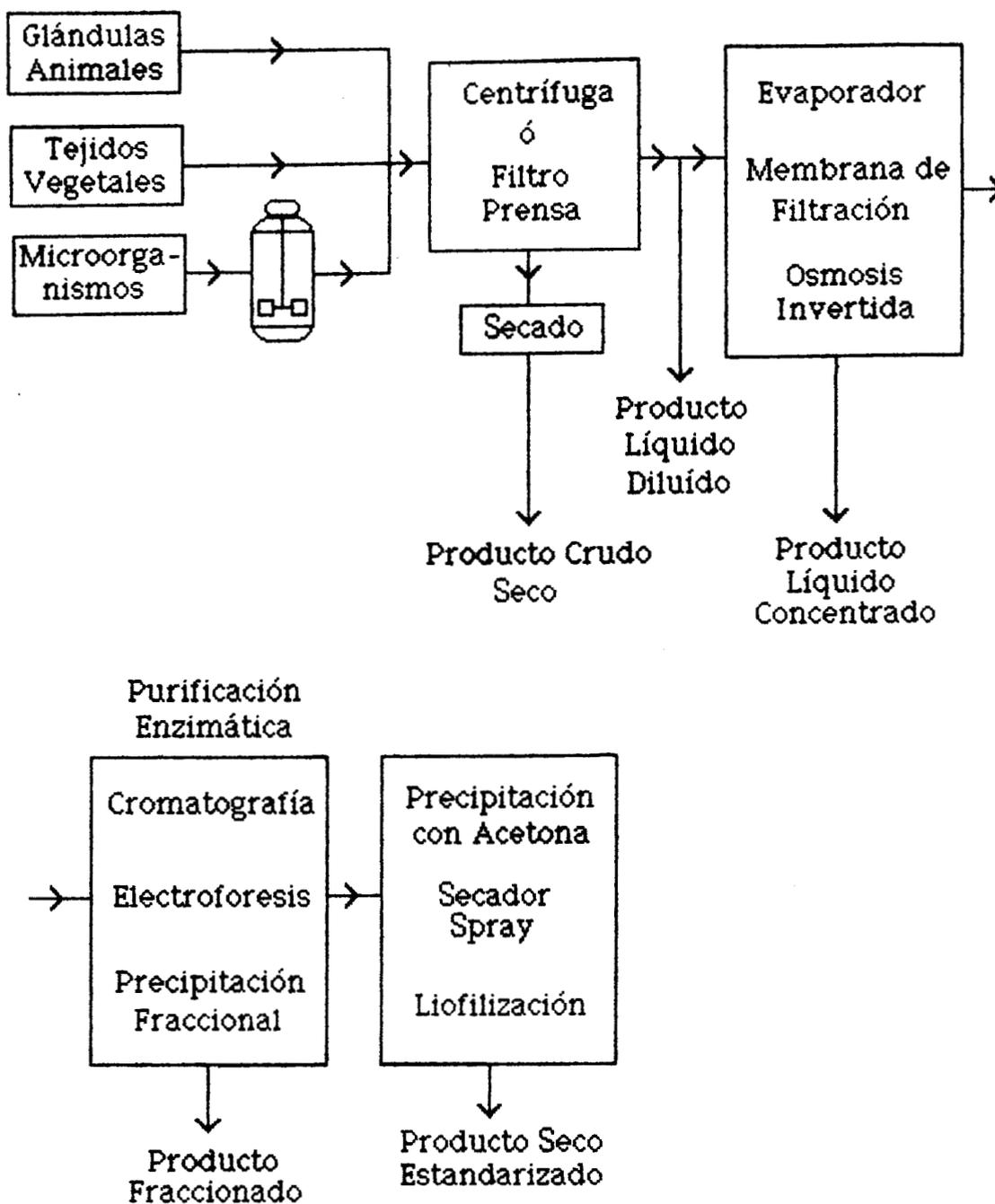
rendimientos sin obtener mezclas racémicas indeseables como en el caso de los métodos químicos.

viii) Mejorar la limpieza: Las amilasas y las proteasas se agregan en las formulaciones de las industrias de detergentes para remover de manera eficiente las manchas en el lavado de la ropa.

c.3) Fuentes de enzimas.

Existen unas 2000 enzimas diferentes, de las cuales apenas unas 50 se producen en cantidades comerciales (Barford, 1981) y muchas más en menor cantidad en Ingeniería Genética, algunas se obtienen de fuentes animales, vegetales y en su mayoría de fuentes microbianas.

Las enzimas utilizadas en la bioindustria y en otras industrias como la farmacéutica, textil, de pieles, etc. son de origen vegetal, animal y microbiano cuyo proceso se puede resumir en la figura No.1 (Yamada, 1977; Schwimmer, 1981; Godfrey, 1985; Scriban, 1985):



**Figura No.1.** Procesamiento industrial de las enzimas a partir de sus principales fuentes.

c.3.1) Origen vegetal.

Las enzimas de origen vegetal, en especial las proteasas, son de un interés tecnológico muy amplio teniendo principalmente en orden de importancia las siguientes (Schwimmer, 1981; Godfrey, 1985; Scriban, 1985):

- i) La papaína que proviene de una planta ecuatorial y trópica denominada

papaya (*Carica papaya*).

ii) La bromelina que se extrae de la piña (*Ananas comosus merr*), la cual debe merecer más atención debido a que no se le da valor a los desperdicios de las fábricas de conservas de esta fruta.

iii) La ficina que proviene del higo (*Ficus carica*).

iv) Otras enzimas de menor aplicación con sus fuentes las lista Schwimmer (1981) en la p.91.

La papaína constituye la enzima de más interés desde el punto de vista tecnológico, tiene numerosas aplicaciones industriales entre las que destacan en su mayoría la industria cervecera para la estabilización coloidal de la cerveza, en la industria cárnica como ablandadores, en la fabricación de hidrolizados de pescado destinados a la alimentación animal, en la industria farmacéutica, etc. (Godfrey, 1985; Scriban, 1985).

### c.3.2) Origen animal.

i) La pepsina es la enzima comercial de este tipo de más uso, se produce industrialmente a partir de la mucosa gástrica del cerdo por medio de una autodigestión, raspado y triturado en medio acuoso acidificado con ácido clorhídrico en presencia de cloroformo. Esta enzima tiene aplicación en bebidas refrescantes, en la estabilización coloidal de la cerveza durante su pasteurización en las botellas y en la precipitación de las proteínas o polipéptidos en medio líquido como en la leche (Schwimmer, 1981; Godfrey, 1985; Scriban, 1985).

El uso tecnológico de la pepsina debe tener en consideración que hidroliza a otras enzimas como las amilasas, la tripsina y la papaína industrial (Godfrey, 1985; Scriban, 1985).

ii) La renina utilizada en la fabricación de quesos se obtiene del cuarto estómago de los terneros y en Israel de los estómagos de los pollos (Schwimmer, 1981; Godfrey, 1985).

iii) Las esterasas y lipasas se obtienen de tejidos del tracto digestivo y salival de cabritos y corderos (Schwimmer, 1981; Godfrey, 1985).

iv) La pancreatina se extrae de los páncreas de los bovinos y porcinos principalmente (Schwimmer, 1981).

### c.3.3) Origen microbiano.

Desde que el desarrollo de la Microbiología ha permitido comprender mejor los sistemas que condicionan la síntesis de enzimas en los microorganismos, la producción industrial de éstas se ha orientado hacia los procesos de fermentación, las principales ventajas de las enzimas microbianas con respecto a las de extracción son las siguientes (Klibanov, 1983; Scriban, 1985; Stanbury y Whitaker, 1987):

i) Una producción independiente de restricciones estacionales o geográficas.

ii) La posibilidad de utilizar materias primas de fácil adquisición.

iii) Los rendimientos en la producción pueden aumentar en proporción importante al mejorar las cepas microbianas y aplicar las condiciones óptimas de fermentación.

iv) Las enzimas microbianas tienen propiedades y especificidades diversas.

Estas ventajas predominan sobre los inconvenientes propios de las industrias de fermentación como fuertes inversiones, consumo de energía, riesgos de contaminación, etc. En los últimos treinta años se han desarrollado un número

importante de fermentaciones productoras de enzimas.

Para una producción enzimática industrial se considera un cierto número de etapas (Godfrey, 1985; Scriban, 1985):

i) Definición de la enzima que se busca: En este caso se analizará la exigencia potencial de su uso que estará determinado por sus propiedades tales como su especificidad, valor óptimo de pH y de temperatura.

ii) Selección de una cepa microbiana: Los microorganismos capaces de producir enzimas para la degradación de ciertos compuestos se localizan generalmente en donde abundan esas sustancias, por ejemplo los microorganismos que excretan celulasas se encuentran en gran número en los suelos de los bosques de donde se aíslan y se prueban. La cepa adecuada deberá ser capaz de producir la enzima requerida con eficiencia y deberá satisfacer ciertos requisitos como desarrollarse en un medio sencillo, producir el menor número de metabolitos secundarios como antibióticos por ejemplo, que excrete la enzima de tal forma que facilite su extracción y purificación, no originar contaminantes diversos y no ser patógeno ni producir compuestos tóxicos.

Las cepas seleccionadas se someterán a investigación a nivel Ingeniería Genética y mutaciones para mejorar sus características y rendimientos.

iii) Producción: Las enzimas microbianas son producidas por fermentación líquida, por cultivo superficial en una capa delgada de un medio líquido o por fermentación sólida, en lo cual la mayor parte de estos procesos son acaparados principalmente por los cultivos sumergidos que se han desarrollado enormemente.

iv) Preparación del inóculo: En este punto se deberá conservar la capacidad productora de la cepa y eliminar todo riesgo de contaminación, por lo que es necesario preservar la cepa en las condiciones adecuadas y su propagación para evitar el excesivo manejo.

v) Composición del medio de cultivo: En general un medio de cultivo debe de contener una fuente de carbono y de nitrógeno, además de los principales factores de crecimiento necesarios para la cepa microbiana. También se debe de tomar en cuenta la necesidad de adicionar un inductor para producir la enzima deseada y considerar las posibles represiones catabólicas producidas por la glucosa.

vi) Fermentación y equipo necesario: En este punto es necesario establecer y optimizar las condiciones de operación de la fermentación, el equipo adecuado y los sistemas de control; en lo cual la calidad de las enzimas producidas estará en función de la forma en que se realice el proceso, la selección de las materias primas, los métodos de esterilización, el procedimiento para regular la formación de espuma en los cultivos sumergidos, la aereación y la agitación así como la duración de la fermentación que afecta el rendimiento, los costos de producción, el color, el olor y la estabilidad de la enzima.

vii) Extracción y purificación: Terminado el proceso se procede a separar las enzimas producidas de la biomasa y del medio de fermentación para obtener las preparaciones enzimáticas comerciales que correspondan a los criterios de pureza y estabilidad deseados.

Los métodos de extracción y purificación son operaciones unitarias tales como centrifugación, filtración, evaporación, precipitación, secado, etc. obteniendo productos comerciales como concentrados enzimáticos, enzimas liofilizadas, inmovilizadas, etc., en lo cual las formas líquidas son más fáciles de manejar que las formas deshidratadas, sin embargo éstas presentan mejor estabilidad para su conservación (Scriban, 1985; Bailey, 1986, Villegas, 1991).

Para elevar la productividad enzimática se consideran varios factores (Schwimmer, 1981):

- i) Selección del microorganismo.
- ii) Condiciones de operación:
  - ii.1) pH.
  - ii.2) Temperatura.
  - ii.3) Aereación.
- iii) Composición del medio de cultivo.
  - iii.1) Surfactantes.
  - iii.2) Trazas de metales.
- iv) Tasa de crecimiento.
- v) Etapas del ciclo de crecimiento.
- vi) Inducción.
- vii) Inhibición por productos finales.
- viii) Represión catabólica.
- ix) Técnicas de Ingeniería genética.
  - ix.1) Dosificación de genes.
  - ix.2) Transferencia de episomas.
  - ix.3) Mutaciones.

#### c.3.3.1) Producción de enzimas microbianas por FEL.

Las enzimas microbianas acaparan la mayoría de las enzimas comerciales producidas en la industria (Barford, 1981), pues se tienen varias ventajas como el rápido crecimiento de los microorganismos bajo condiciones controladas, los sustratos generalmente son productos agrícolas disponibles casi en cualquier parte del mundo en toda época del año, además de una amplia selección del microorganismo deseado y de fácil propagación.

El principio de manufactura de enzimas microbianas por fermentación es relativamente simple (Godfrey, 1985; Scriban, 1985), se selecciona el microorganismo disponible y adecuado, se propaga a través de un número de etapas y finalmente se crece en un tanque que contiene al medio de fermentación. Las enzimas producidas durante el crecimiento microbiano se pueden encontrar dentro de las células por lo que reciben el nombre de enzimas intracelulares, mientras que las que son excretadas fuera de las células se denominan enzimas extracelulares; cuando la medición de la actividad enzimática alcanza su máximo valor termina la fermentación y se procede a las etapas de purificación y estandarización según sus usos.

En este proceso es necesario encontrar la combinación óptima de la cepa microbiana, del medio de crecimiento, de las condiciones de fermentación y de los métodos de extracción.

Las técnicas de fermentación constituyen dos procesos, los cultivos sumergidos y los de medio sólido, aunque los primeros son los utilizados más ampliamente por su gran desarrollo (Godfrey, 1985; Scriban, 1985; Bailey, 1986), las FES están produciendo ciertas enzimas principalmente fungales (Narahara, 1982; Mudgget, 1986; Quintero, 1987).

La producción de enzimas intracelulares y extracelulares está en función del tipo de microorganismo utilizado, las primeras se obtienen en menor proporción que las segundas aunque tienen importantes aplicaciones como en análisis clínicos, en investigación bioquímica, en la producción de los jarabes fructosados, etc. (Lilly, 1979).

Las técnicas de extracción de las enzimas intracelulares las trata ampliamente Bailey (1986), la regulación de la síntesis enzimática por inducción, producto final y represión catabólica es revisada por Clarke, (1971); Demain, (1972) y en flujo continuo por Melling, (1977).

Las enzimas extracelulares son sintetizadas y excretadas fuera de la célula, en tan sólo unos cuantos años ha habido progresos significativos que han hecho posible la comprensión de las bases moleculares del proceso (Ramaley, 1979). Las disciplinas de interés para su aplicación son muy amplias (Barford, 1981; Godfrey, 1985), las investigaciones se concentran en los efectos de los factores ambientales como la temperatura, el pH, la composición del medio de cultivo, etc. y en los de las selecciones genéticas sobre la producción comercial de estas enzimas (Priest, 1977; Ramaley, 1979).

#### c.3.3.2) Producción de enzimas microbianas por FES.

La FES está avanzando en la producción de enzimas debido a la diversidad de trabajos realizados, lo cual ha permitido mejorar las técnicas y los rendimientos, en algunos de estos trabajos se reporta la producción de celulasas (Zetelaki y Horváth, 1984; Chahal, 1985; Deschamps y col., 1985), b-glucosidasas (Deschamps y Huet, 1984; Macris y col., 1987), a-galatosidasa e invertasas (Silman, 1980), amilasas (Windish, 1965; Narahara, 1982), pectinasas (Hankin, 1975, Hours y col., 1988), proteasas que se tratan ampliamente en el siguiente tema y otras enzimas como las ribonucleasas, las desoxirribonucleasas, las ureasas, etc. (Hankin, 1975).

#### c.3.3.3) Proteasas.

##### c.3.3.3.1) Generalidades.

Las proteasas constituyen un 60% de las enzimas comerciales utilizadas en el mercado, son producidas de fuentes animales, vegetales y microbianas. Estas enzimas involucran un grupo complejo de éstas que difieren en sus propiedades tales como la especificidad de sustratos, sitios activos, mecanismos catalíticos, pH, temperatura y perfiles de estabilidad aplicándose en múltiples procesos como en la fabricación de quesos, en la industria de los detergentes, las formulaciones de alimentos balanceados para animales, etc. (Ward, 1985, Löffler, 1986), además estas enzimas están involucradas en la regulación de los procesos metabólicos tales como la formación, la germinación y la maduración de esporas, en la coagulación de la sangre, la fagocitosis, la activación de proteínas y otras enzimas, etc. (Ward, 1985; Bond y Butler, 1987).

El campo de aplicación de las enzimas intracelulares es muy pequeño comparado con el de las extracelulares, ambas pueden ser endoenzimas que actúan sobre los enlaces peptídicos internos, o bien exoenzimas que actúan sobre los grupos amino y carboxílico terminales de los péptidos. Todas las enzimas son intracelulares en alguna etapa de su existencia, sólo que algunas son excretadas fuera de las células después de haber sido sintetizadas y pasan a ser extracelulares (Ward, 1985; Bond y Butler, 1987), las cuales constituyen el interés general de los investigadores, pues ya no es necesario extraerlas del interior de las células.

##### c.3.3.3.2) Tipos de proteasas.

Los grupos que contienen las proteasas les confieren características específicas de actividad en un rango de pH, así las que contienen grupos tiol y serina

se denominan proteasas alcalinas, las que tienen metales se denominan proteasas neutras y las que tienen grupos carboxílicos se denominan proteasas ácidas.

#### c.3.3.3.2.1) Proteasas alcalinas.

Se producen por bacterias como *Bacillus spp*, levaduras y hongos, además se encuentran en los tejidos mamarios de los mamíferos, estas enzimas se aplican en la industria de los detergentes, en la farmacéutica como la tripsina y la quimotripsina y en preparaciones comerciales de proteasas alcalinas fungales como las de *Aspergillus oryzae*. Las proteasas alcalinas tienen su actividad óptima a pH's cercanos a 10, son específicas según su fuente y actúan sobre los aminoácidos aromáticos o hidrófobos en el lado del grupo carboxilo (Ward, 1985; Löffler, 1986).

#### c.3.3.3.2.2) Proteasas neutras.

Estas enzimas contienen un átomo metálico esencial, generalmente es zinc y tienen su actividad óptima a pH's cercanos a la neutralidad, actúan sobre los aminoácidos hidrófobos del lado del grupo amino. Estas enzimas muestran gran actividad sobre sustratos sintéticos y son producidas principalmente por *Bacillus spp* (Ward, 1985; Löffler, 1986) y también de *Aspergillus spp*. Su aplicación está enfocada a preparaciones comerciales de proteasas fungales, en el horneado, en procesos de alimentos, en la modificación de proteínas, en curtiduría, en alimentos para animales y en la industria farmacéutica (Ward, 1985; Löffler, 1986).

#### c.3.3.3.2.3) Proteasas ácidas.

Estas enzimas se encuentran distribuidas ampliamente en células animales, hongos, levaduras y unas cuantas bacterias, contienen grupos aspartato en su sitio activo, su actividad óptima es a pH's de 3-4 y atacan los aminoácidos aromáticos en ambos lados. Las proteasas ácidas se clasifican en base a su actividad catalítica en reninas y pepsinas, las primeras son extraídas de los terneros o de fuentes microbianas como de *Mucor spp*, las cuales tienen una importancia comercial mayor que las primeras en la producción de quesos, pues poseen mayor habilidad para cuajar la leche; el grupo de las pepsinas incluye las de los bovinos, las de los porcinos y las microbianas, principalmente de *Aspergillus spp* y algunas de *Rhizopus spp* (Ward, 1985; Löffler, 1986).

#### c.3.3.3.3) Producción comercial de proteasas microbianas.

Las proteasas son producidas extracelularmente por FEL y se recuperan separando las células del líquido por filtración o por centrifugación, posteriormente según los requerimientos del grado de pureza será el proceso al que se someterá la solución enzimática. Las proteasas son producidas sólo por cultivos sumergidos (Raimbault, 1988), aunque hay algunos trabajos en FES que se proyectan como una alternativa comercial para su explotación (Hesseltine, 1977; Aido, 1982; Fukushima, 1982; Cervera y col.; 1989, Cervera y Revah, 1991).

c.3.3.3.4) Formulación de medios de cultivo y optimización de las condiciones de operación en la producción de proteasas ácidas.

Existen medios de cultivo y condiciones de operación ya establecidos en algunos reportes en sistemas de producción de enzimas y de crecimiento, así todos los parámetros se acoplaron al sistema experimental desarrollado en este trabajo, variando las condiciones alrededor de sus valores para observar su efecto (Raimbault, 1980; Silman, 1980; Narahara, 1982; Deschamps y Huet, 1984; Chahal, 1985, Deschamps y col., 1985; Hours y col., 1988).

## IV.- OBJETIVOS.

1.- IMPLEMENTAR LA TECNICA DE FES PARA LA PRODUCCION DE PROTEASAS ACIDAS QUE UTILICE MATERIA PRIMA BARATA EN FERMENTADORES DIFERENCIALES BENCH-SCALE.

2.- OPTIMIZAR EL MEDIO DE CULTIVO Y LAS CONDICIONES DE OPERACION PARA LA PRODUCCION PROTEASAS ACIDAS POR FES.

3.-REALIZAR UNA CINETICA DE CRECIMIENTO CON LAS CONDICIONES OPTIMAS OBTENIDAS.

## V.-MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES.

a) Descripción del sistema experimental.a.1) Sistema experimental para las fermentaciones en general.

El sistema de fermentación está integrado por una serie de fermentadores diferenciales de vidrio de 19 cm de longitud y 1.9 cm de diámetro interno, los cuales se esterilizaron antes de cada proceso con tapones de algodón en ambos extremos y papel filtro en la parte inferior para contener el medio fermentación, éste ya inoculado se empaca en condiciones de asepsia y cada uno de los fermentadores se acoplan con un tapón de hule del número 5 a unos humidificadores de vidrio de 12 cm de longitud y 2.3 cm de diámetro interno, éstos contienen agua destilada hasta las tres cuartas partes de su volúmen y se les conecta a cada uno en forma independiente las entradas de aire, controlando el flujo volumétrico a 0.0133 litros/gramo de materia seca-minuto (VGM) por medio de unas válvulas conectadas en serie. El aire es suministrado mediante una bomba de vacío y se somete a un tratamiento de prehumidificado, ésto se realiza en un prehumidificador de 3.5 litros conteniendo agua hasta las tres cuartas partes de su volúmen, de donde el aire pasa a los humidificadores y posteriormente al medio de fermentación a través de los espacios intersticiales de éste, suministrándole al microorganismo el oxígeno necesario para su metabolismo.

El prehumidificador y el conjunto de fermentadores y humidificadores se sumergen en un baño agitado de temperatura constante a 33°C durante 36 horas de fermentación, al término de la cual los fermentadores son retirados del sistema y sometidos a temperatura de refrigeración para frenar el crecimiento microbiano, para posteriormente realizar las técnicas analíticas correspondientes.

El procedimiento anterior se muestra a continuación en la figura No.2.

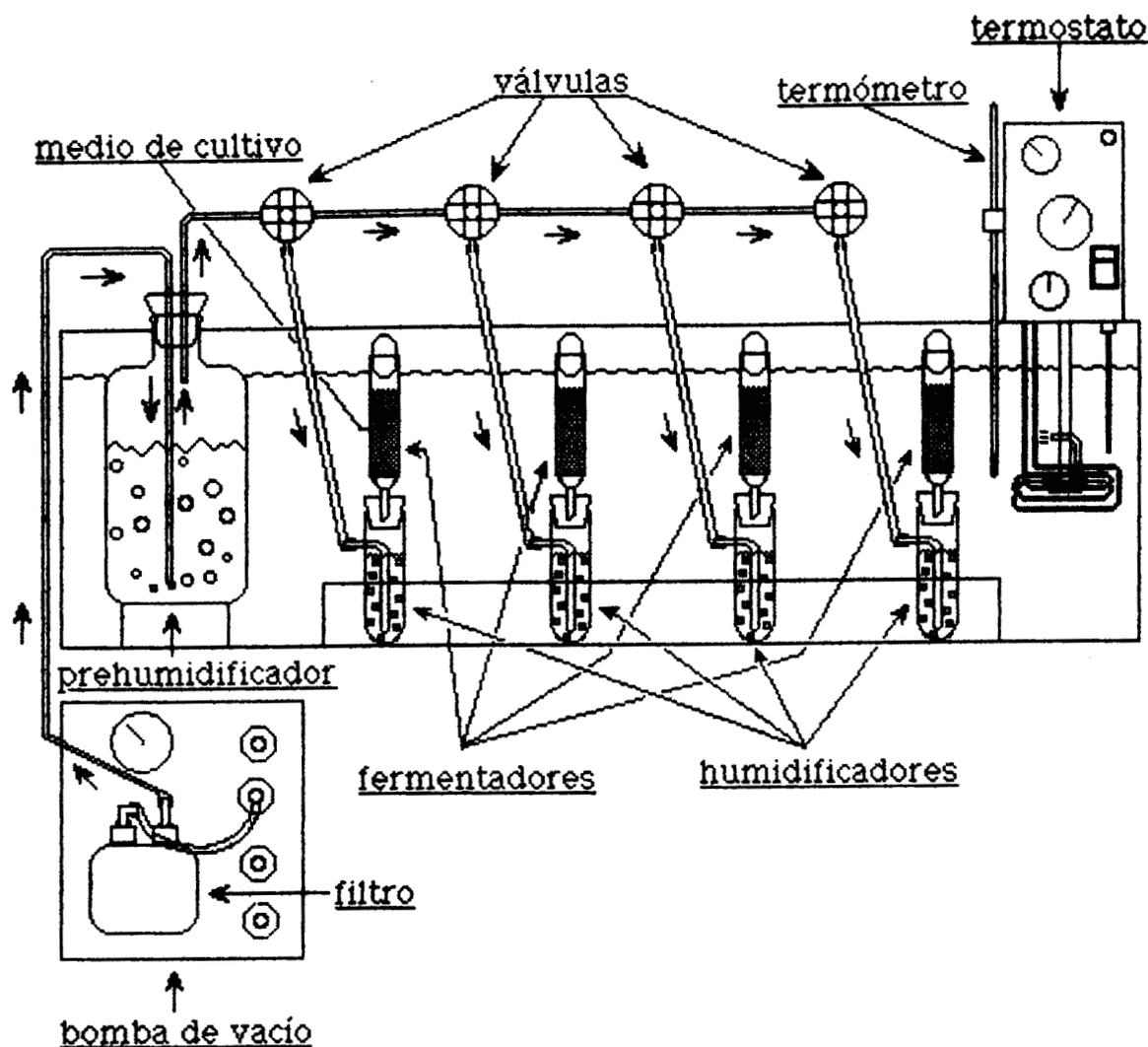


Figura No.2: Diagrama del montaje de una fermentación en proceso.

a.2) Sistema experimental para las cinéticas de crecimiento.

a.2.1) Cinética con fermentadores diferenciales.

Se montó una fermentación de acuerdo con las características expuestas en la sección a.1 del capítulo V, teniendo las siguientes etapas:

i) Se tomaron muestras cada dos horas a partir de las 10 hr de fermentación y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de analizarlas.

ii) A uno de los fermentadores diferenciales se le acopló una conexión especial que permitió monitorear la cantidad de oxígeno consumido y de bióxido de carbono producido. Las muestras se tomaron en tiempos análogos al punto anterior y se analizaron en un cromatógrafo de gases Gow-Mac, equipado con un detector de

conductividad térmica y una columna concéntrica (CTR-1, Alltech) que separaron los gases utilizando helio como gas acarreador.

#### a.2.2) Cinética con un fermentador tubular.

Se montó una fermentación de acuerdo a las siguientes características:

i) Se utilizó un fermentador integrado por seis módulos armables de 15 cm de altura por 4 cm de diámetro interno, teniendo una altura total de 90 cm. Cada módulo está integrado de dos cilindros concéntricos, conteniendo 303 g de sustrato seco (60% salvado de trigo y 40% de soya) en el interno y agua como medio de calentamiento o enfriamiento circulando por el externo, ésto se muestra a continuación en la figura No. 3.

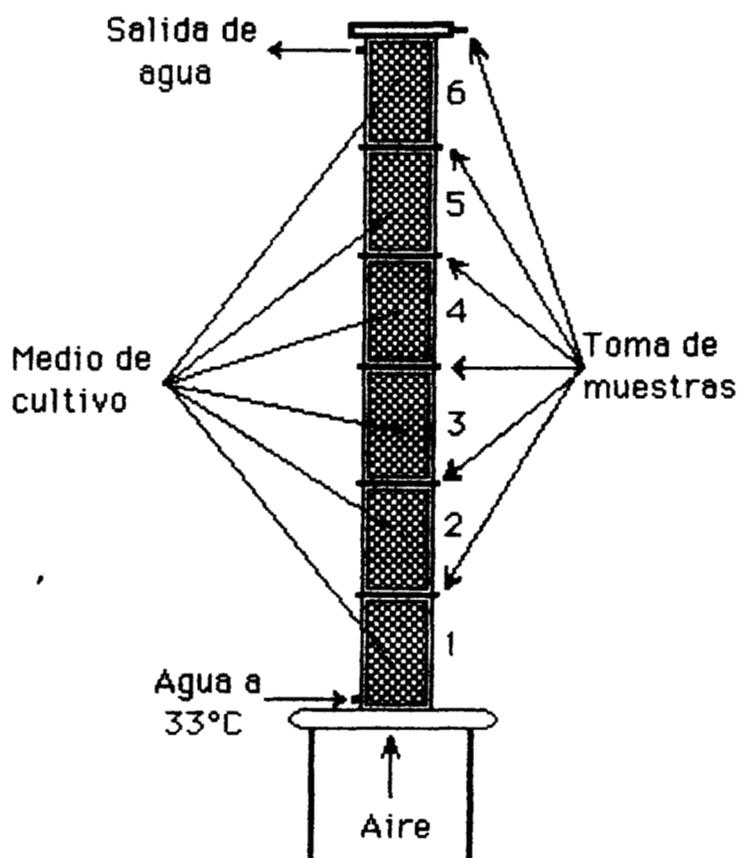


Figura No.3. Diagrama del montaje de una fermentación en un fermentador tubular.

ii) Entre las uniones de los módulos hay unas tomas por las que se monitorearon las cantidades de oxígeno consumido y de bióxido de carbono producido, el muestreo se realizó cada dos horas a partir de las 8 hr de fermentación y se analizó en el cromatógrafo de gases descrito en la etapa ii de la sección a.2.1 del capítulo V.

iii) El módulo inferior tiene unas perforaciones por donde se le suministró aire prehumidificado al medio de cultivo a razón de 0.0133 VGM y el proceso de fermentación tuvo una duración de 36 horas.

**b) Procedimiento experimental.****b.1) Enfoque de las experimentaciones.**

Las experimentaciones están enfocadas de la siguiente manera:

b.1.1) Cinco grupos de experimentos ligados con la mayor productividad de proteasas ácidas que enfocan la optimización del medio de cultivo, de las condiciones de operación y de sustancias inductoras de estas enzimas.

b.1.2) Dos cinéticas de crecimiento con las condiciones óptimas de los resultados obtenidos en b.1.1, lo cual permitirá la producción de proteasas ácidas a mayor escala, ésto se realizó conforme lo siguiente:

b.1.2.1) Una cinética montada en los fermentadores diferenciales de las características expuestas en la sección a.2.1 del capítulo V.

b.1.2.2) Una cinética montada en un fermentador tubular descrito en la sección a.2.2 del capítulo V.

**b.2) Cepas utilizadas.**

Las cepas utilizadas del género *Aspergillus* en la primera fase de la sección b.1.1 fueron las siguientes:

b.2.1) Dos cepas de la colección nacional de microorganismos japonesa:

b.2.1.1) *A. awamori* IFO 4314.

b.2.1.2) *A. awamori* IFO 4888.

b.2.2) Tres cepas de colección de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,

México:

b.2.2.1) *A. niger* cepa 10 (Raimbault, 1981).

b.2.2.2) *A. niger* cepa 009.

b.2.2.3) *A. oryzae*.

b.2.3) Una cepa mutada hiperproductora de proteasas ácidas donada por la Universidad de Compiegne, Francia.

b.2.3.1) *A. M.-UAMI*.

**b.3) Preparación de las de esporas.**

Se propagó la cepa del hongo correspondiente en medio de agar de dextrosa y papa, incubándose a 30°C de seis a ocho días hasta su esporulación total y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de utilizarse.

**b.4) Preparación del medio de cultivo y montaje de la fermentación.**

El procedimiento para montar una fermentación fué el siguiente:

i) Se le determinó la humedad al medio de fermentación para conocer el contenido de agua inicial (ver la sección c.1 del capítulo V).

ii) Se tamizó el salvado pasando malla 10 y no pasando malla 18, teniendo un tamaño de partícula promedio de 1.455 mm, mientras que la soya se tamizó pasando por malla 35 resultando un tamaño de partícula menor o igual que 0.47 mm.

iii) Dependiendo del número de fermentadores y considerando que se empacaron 5 g de sustrato seco en cada uno, se pesó salvado y soya de la etapa ii en una relación 60:40 en por ciento respectivamente y se colocó en un vaso de

precipitados de 4000 ml tapándolo con papel aluminio.

iv) En un frasco con tapa de 500 ml se colocó agua destilada con unas gotas de tween 20 en una relación de 3 gotas de éste por cada 100 ml.

v) A los fermentadores diferenciales utilizados se les colocó un tapón de algodón en cada extremo y un círculo de papel filtro encima del tapón de la parte inferior.

vi) El material de las etapas iii y iv se esterilizaron en el autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

vii) Una vez fría el agua con tween, se le agregó un volumen de 120 ml a las esporas obtenidas de la sección b.3 del capítulo V, realizándose en condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar, se mezcló a temperatura ambiente en un agitador magnético, se tomó 1 ml de esta solución y se aforó a 100 ml para el conteo de esporas, el cual se realizó con un microscopio óptico en una cámara de Neubauer, teniendo así el número de esporas por ml en promedio. Se hicieron los cálculos correspondientes y se determinó el volumen de la suspensión de esporas (inoculo) que se adicionó al medio de fermentación, considerando que se agregarían  $2 \cdot 10^8$  esporas por cada 10 gramos de sustrato inicial.

Nota: Por sustrato inicial se consideró al salvado y a la soya con su contenido de agua original.

viii) Los fermentadores ya esterilizados se etiquetaron y se pesaron.

ix) Se determinó la cantidad de agua que se agregó al medio de cultivo para llevarlo a una humedad inicial determinada tomando en cuenta:

- a) La cantidad de agua inicial contenida en el medio de cultivo seco.
- b) La cantidad de agua contenida en la suspensión de esporas que se agregó ( $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de sustrato inicial).
- c) La cantidad de agua contenida en la solución de ácido clorhídrico 2 N estéril para ajustar el pH a 5.5 (aproximadamente 1 ml por cada 15 g de sustrato inicial).

x) En un matríz Erlenmeyer estéril se mezcló la suspensión de esporas, el ácido clorhídrico 2 N estéril y el agua necesaria estéril para las condiciones requeridas, ésto se realizó en la campana de flujo laminar y se adicionó al medio de cultivo mezclando con una espátula de cuchara estéril.

xi) Se empacaron los fermentadores diferenciales con el medio de cultivo ya inoculado, utilizando la espátula de cuchara sin compactar demasiado y se taparon nuevamente, ésto se realizó en condiciones de asepsia. El medio de cultivo sobrante se guardó en el refrigerador para evaluar los parámetros iniciales.

xii) Se pesaron los fermentadores ya empacados y se les determinó a cada uno el peso del medio de cultivo inicial con el peso de los fermentadores vacíos (etapa viii de esta sección).

xiii) Cada uno de los fermentadores se acoplaron con un tapón de hule a los humidificadores que contenían agua destilada hasta las tres cuartas partes de su volumen, se conectaron las entradas de aire con un flujo de 0.0133 V.G.M. y se sumergieron en un baño de temperatura constante a 33°C, evitando la entrada de agua por ambos extremos (ver la figura No.2).

xiv) Se llevó a cabo la fermentación durante 36 horas vigilando que las condiciones de operación se mantuvieran constantes.

xv) Después de este proceso se desmontaron los fermentadores y se determinó el peso del medio de cultivo final.

xvi) Los fermentadores se mantuvieron en refrigeración frenando el crecimiento microbiano, hasta el momento en que se realizaron las técnicas analíticas correspondientes.

#### b.5) Preparación de la solución enzimática.

Los fermentos obtenidos en la sección b.4 del capítulo V se sometieron al siguiente proceso sin ser necesarias las condiciones de asepsia:

i) El contenido de cada fermentador se vació en vasos de precipitados de 100 ml debidamente etiquetados y se mezclaron con una espátula de cuchara.

ii) En vasos de precipitados de 100 ml etiquetados se pesó 1 g de cada una de las muestras antes y después de la fermentación.

iii) A cada una de éstas se les agregaron 25 ml de agua destilada y se homogeneizaron con un homogeneizador de tejidos Ultratúrrax durante un minuto.

iv) Cada una de las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 r.p.m. y se guardó el sobrenadante.

v) Las soluciones enzimáticas resultantes se colocaron en vasos de precipitados tapados y se realizaron las técnicas analíticas correspondientes el mismo día.

#### c) Técnicas analíticas.

##### c.1) Determinación del pH.

A cada una de las soluciones enzimáticas antes y después de la fermentación obtenidas en la sección b.5 del capítulo V, se les midió el pH con un potenciómetro.

##### c.2) Humedad.

A cada una de las muestras sólidas antes y después de la fermentación se les determinó el contenido de agua mediante el siguiente procedimiento:

i) Se pesaron 3 g de muestra sólida y se secó en una termobalanza a 100°C.

ii) Una vez que la temperatura se mantuvo constante se calculó el porcentaje de humedad mediante la ecuación (1):

$$\% H. = 100\% - \% M.S. \quad (1)$$

donde % M.S. es el porcentaje de materia seca y se obtiene con la ecuación (2):

$$\% M.S. = \frac{L.P.F.}{L.P.I.} * 100\% \quad (2)$$

L.P.F. es la lectura del peso final en la termobalanza expresado en gramos.

L.P.I. es la lectura del peso inicial en la termobalanza expresado en gramos.

##### c.3) % de pérdida en peso seco total (PPS).

El % de pérdida en peso seco representa la cantidad de materia seca que se transforma en bióxido de carbono, se determinó con el procedimiento anterior de humedad y determinando el porcentaje de pérdida en peso seco total con la ecuación (3):

$$\%P.P.S. = 100\% - \frac{M. H. f * \%M. S. f}{M. H. i * \%M. S. i} * 100\% \quad (3)$$

donde % P.P.S. es el porciento de pérdida en peso seco.

M.H.<sub>i,f</sub> es el peso de la materia húmeda al inicio y al final de la fermentación expresado en gramos.

%M.S.<sub>i,f</sub> es el porciento de materia seca al inicio y al final de la fermentación evaluada con la ecuación (2):

#### c.4) Actividad proteolítica:

Para esta técnica se utilizó el procedimiento reportado por Ichísima (1971) adaptándole algunas etapas.

##### c.4.1) Se prepararon los siguientes reactivos:

i) Reactivo de Folín en relación 1:1 con un volúmen del reactivo de Fenol Folín-Ciocalteu y un volúmen de agua destilada. La cantidad dependió del número de muestras que se trataron y se preparó hasta el momento de utilizarlo, pues se descompone con la luz y se mantuvo en refrigeración.

ii) 100 ml de acetato de sodio 0.1 M y se le ajustó el pH a 2.7.

iii) 100 ml de ácido clorhídrico 0.2 M.

iv) 100 ml de ácido clorhídrico 1 N.

v) 50 ml de ácido clorhídrico 2 N y se esterilizó.

vi) 500 ml de ácido tricloroacético 0.4 M

vii) Un litro de carbonato de sodio 0.4 M.

viii) Solución de caseína al 2%\* preparada de la siguiente manera:

- En un vaso de precipitados se pesaron 2.0 g de caseína, se agregaron 70 ml de agua destilada y 1.5 ml de ácido clorhídrico 1 N.

- Se disolvió con agitación a temperatura de ebullición en un agitador magnético y se agregaron 25 ml de agua destilada.

- Se enfrió la solución y se le ajustó el pH a 2.7.

- Se aforó a un volúmen de 100 ml y se mantuvo en refrigeración.

ix) 100 ml de hidróxido de sodio 1 N.

x) Solución de tirosina al 0.01%\*; preparada de la siguiente manera: en un vaso de precipitados se disolvieron 0.01 g de tirosina en 100 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.2 M, con agitación y calentando ligeramente en una parrilla magnética.

\*Nota: Estas soluciones se prepararon en el momento de utilizarse.

##### c.4.2) Procedimiento:

i) Se hicieron diluciones de la solución enzimática obtenida en la sección b.5 del capítulo V, con una solución buffer de acetato de sodio 0.1 M a pH de 2.7 en una relación de 1:2, 1:5 o 1:10 según sea necesario para facilitar las lecturas en el espectrofotómetro.

ii) En tubos de ensaye previamente etiquetados con un testigo para cada muestra, se colocó 1 ml de solución de caseína al 2%, sólo a los testigos 2 ml de ácido tricloroacético 0.4 M y tanto a muestras como a testigos 1 ml de la dilución de la

solución enzimática de la etapa anterior.

iii) Cada tubo se mezcló en un vórtex y se colocaron en baño María a una temperatura de 30°C durante 10 minutos.

iv) Terminado el tiempo de reacción los tubos se enfriaron en un baño de hielo y se les agregó sólo a las muestras 2 ml de ácido tricloroacético 0.4 M para frenar la reacción enzimática.

v) Todos los tubos se mezclaron en el vórtex dejando reposar 5 minutos, se filtraron con papel Whatman del No. 2 y se tomó un alícuota de cada uno de 1 ml en tubos de ensaye.

vi) Se preparó una curva estándar haciendo diluciones de una solución de tirosina al 0.01% para tener concentraciones en un rango de 0-100 mg de tir./lt.

vi.1) Se tomó un alícuota de 1 ml y se colocó en tubos de ensaye adicionándoles 1 ml de agua destilada, 2 ml de ácido tricloroacético 0.4 M y se mezcló.

vi.2) De las soluciones resultantes se tomó un alícuota de 1 ml.

vii) Las soluciones obtenidas en las etapas v y vi se sumergieron en un baño de temperatura constante de 40°C, se agregaron 5 ml de carbonato de sodio 0.4 M y 1 ml del reactivo de Folín manteniendo estas dos últimas soluciones a la misma temperatura al adicionarlas.

viii) Cada una de las soluciones resultantes se mezclaron en el vórtex y se mantuvieron en el baño durante 40 minutos en la oscuridad.

ix) La coloración azul se leyó en el espectrofotómetro a 660 nm utilizando el filtro rojo, teniendo como blanco el tubo con 0 mg de tir./lt de la curva estándar.

x) Los resultados de concentración obtenidos de la curva estándar se obtuvieron en miligramos de tirosina por litro, teniendo que multiplicar por los factores de conversión adecuados para expresarlos en micromoles de tirosina por gramo de materia seca y por minuto, utilizando la ecuación (4):

$$X \frac{\text{mg}}{\text{lt}} * \frac{1 \text{ mg-mol}}{181.2 \text{ mg}} * \frac{10^3 \mu \text{ moles}}{1 \text{ mg-mol}} = X * 5.519 \frac{\mu \text{ moles}}{\text{lt}} \quad (4)$$

Finalmente se multiplicó por la dilución de la materia sólida húmeda, se convirtió a materia seca con la relación obtenida en la sección c.2 del capítulo V después de la fermentación, se multiplicó por la dilución de la solución enzimática y se dividió entre el tiempo de la reacción enzimática llevada a cabo en la etapa iii, de esta manera se obtuvo la ecuación (5):

$$X * 5.519 \frac{\mu \text{ moles}}{\text{lt}} * \frac{1 \text{ lt}}{10^3 \text{ ml}} * \frac{26 \text{ ml}}{1 \text{ g M.H.}} * \frac{1 \text{ g M.H.}}{X \text{ g M.S.}} * \frac{\delta}{10 \text{ min}} \quad (5)$$

Lo cual se resumió en la ecuación (6):

$$\boxed{\frac{X * \delta}{X} * 0.01435 \frac{\mu \text{ moles de tirosina}}{\text{g M. S. - min}}} \quad (6)$$

donde X es la cantidad de tirosina en miligramos por litro de la curva estándar para cada una de las muestras.

X representa los gramos de materia seca por gramo de materia húmeda.

δ es la dilución de la solución enzimática.

g M.H. son los gramos de materia húmeda.

g M.S. son los gramos de materia seca.

### c.5) Nitrógeno soluble.

El nitrógeno soluble representa la cantidad de nitrógeno disponible para el crecimiento del hongo; se siguió el mismo procedimiento de la sección anterior de actividad proteolítica con la diferencia de que no se dividió entre los 10 minutos de reacción enzimática en la ecuación (5), una unidad de nitrógeno soluble representa una micromol de tirosina por gramo de materia seca.

### c.6) Azúcares totales.

Esta técnica está basada en el procedimiento reportado por Olmos (1987) utilizando el método de la antrona, el cual se realizó mediante las etapas siguientes:

i) Se prepararon 100 ml de una solución de glucosa al 0.5% en el momento de utilizarse pues se descompone con facilidad.

ii) Se hicieron diluciones del sobrenadante obtenido en la sección b.5 del capítulo V con agua destilada, en una relación de 1:50 o más según sea necesario para facilitar las lecturas en el espectrofotómetro.

iii) Se realizó una curva estándar haciendo diluciones de la solución de glucosa al 0.5% para obtener una concentración en un rango de 0-50 mg de glucosa/lit.

iv) En tubos de ensaye sumergidos en un baño de hielo se colocaron 5 ml del reactivo de antrona (200 mg de antrona en 100 ml de ácido sulfúrico), se adicionaron lentamente y resbalando por las paredes del tubo 2.5 ml de las soluciones obtenidas en las etapas ii y iii, y se homogeneizó en un vórtex.

v) Se colocaron los tubos en baño María a temperatura de ebullición durante 10 minutos

vi) Los tubos se enfriaron en el mismo baño de hielo y la coloración verdosa se leyó en el espectrofotómetro a 625 nm, teniendo como blanco el tubo con 0 mg de gluc./lit de la curva estándar.

vii) Los resultados de concentración obtenidos de la curva estándar se obtuvieron en miligramos de glucosa por litro, teniendo que multiplicar por los factores de conversión adecuados para expresarlos en miligramos de glucosa por gramo de materia seca por medio de la ecuación (7):

$$X \frac{\text{mg}}{\text{L}} * \frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ mL}} * \frac{26 \text{ mL}}{1 \text{ g M.S.}} * \frac{1 \text{ g M.H.}}{X \text{ g M.S.}} * \delta = 0.026 \frac{X * \delta}{X} \frac{\text{mg gluc.}}{\text{g M.S.}} \quad (7)$$

donde X es la cantidad de glucosa en miligramos por litro de la curva estándar para cada una de las muestras.

X representa los gramos de materia seca por gramo de materia húmeda.

δ es la dilución de la solución enzimática.

c.7) Acidos nucleicos.

Esta técnica está basada en el procedimiento reportado por Olmos (1987) mediante las siguientes etapas:

i) Se hicieron diluciones de la solución enzimática obtenida en la sección b.5 del capítulo V con agua destilada en una relación de 1:50.

ii) En tubos de ensaye se agregaron 5 ml de la dilución anterior, 5 ml de ácido perclórico 0.7 M y se colocaron en baño María a una temperatura de 70°C durante 20 minutos.

iii) Se centrifugó cada una de las soluciones a 3000 r.p.m. durante 20 minutos.

iv) El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta a 260 nm haciendo las diluciones necesarias para obtener lecturas entre 0.1 y 0.6 de densidad óptica.

v) Los resultados se expresan en términos de densidad óptica por gramo de materia seca mediante la ecuación (10):

$$\frac{D.O.}{g M.S.} = \delta_1 * \delta_2 \frac{1}{g M.S.} \quad (8)$$

donde D.O. es la densidad óptica en términos de absorbancia.

g M.S. representa los gramos de materia seca.

$\delta_1$  es la dilución utilizada para preparar las soluciones enzimáticas en la sección c.7 del capítulo V.

$\delta_2$  es la dilución utilizada al momento de leer en el espectrofotómetro.

c.8) Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza unidireccional para la actividad proteolítica utilizando un programa que determina la tabla de la ANOVA (Hewlett-Packard), con ésto se muestra qué tan significativamente diferentes son los resultados con respecto a un testigo, para que de esta manera se obtengan las condiciones óptimas de productividad enzimática. Dicho análisis consiste en la comparación de las desviaciones estándar para probar la hipótesis de que  $\sigma_1 \leq \sigma_2$  está dada por el intervalo  $[-\infty, F_{x,y,z}]$ , donde z representa el nivel de significancia que en este caso fue del 5% y  $F_{x,y,z}$  es el 100x punto porcentual de la distribución F con x y y grados de libertad, así la hipótesis de que  $\sigma_1 \leq \sigma_2$  se acepta si  $F < F_{x,y,z}$  y se rechaza si F está fuera de este intervalo. Este procedimiento tiene una probabilidad de 1-z de aceptar la hipótesis de que  $\sigma_1 = \sigma_2$  cuando es verdadera:  $P(F < F_{x,y,z}) = 1-z$ , el estadígrafo F relaciona un tratamiento de la suma de cuadrados con un error cuadrático medio de ésta (Bowker y Lieberman, 1972; Johnson, 1977).

c.9) Determinación del crecimiento microbiano mediante el modelo de Sato.

El modelo reportado por Sato y col. (1983) simula el crecimiento de

microorganismos aeróbicos en medios empacados de FES con aereación forzada, para ésto se utiliza la tasa de consumo de oxígeno (OUR) como parámetro monitoreado con un cromatógrafo de gases descrito en la sección a.2.1 del capítulo V.

El OUR de microorganismos aeróbicos involucra un término asociado al crecimiento y otro al mantenimiento por medio de:

$$\text{OUR} = \frac{1}{M_0} \left( \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dx}{dt} + m X \right) \quad (9)$$

donde  $M_0$  es la cantidad de materia seca en gramos

$Y_{x/o}$  es el rendimiento de la biomasa con respecto al oxígeno en g de biomasa/g de oxígeno

$X$  es la biomasa en gramos

$t$  es el tiempo de fermentación en horas

$m$  es el coeficiente de mantenimiento en g de  $O_2$  / g M.S.-hr

Al integrar la ec. (9) se obtiene:

$$\int_0^t \text{OUR} dt = \frac{1}{Y_{x/o}} (X_t - X_0) + m \int_0^t X dt \quad (10)$$

donde  $X_t$  y  $X_0$  denotan la biomasa a los tiempos "t" y cero.

Los valores de  $Y_{x/o} = 2.17$  g B / g  $O_2$  y de  $m = 0.096$  g  $O_2$  / g B-hr los reporta Sato y col. (1983) para *Aspergillus oryzae* y por Raimbault (1980)  $Y_{x/o} = 1.55$  g B/g  $O_2$  y  $m = 0.007$  g  $O_2$ /g B-hr para *Aspergillus niger* cepa 10, mientras que  $X_0$  se calcula con la relación reportada por Oriol (1987):

$$X_0 = V * \rho * E \quad (11)$$

donde  $V$  es el volúmen de una espora en  $cm^3$

$\rho$  es la densidad de las esporas en g /  $cm^3$

$E$  es el número de esporas inoculado en una cantidad de materia seca

Las esporas se consideran como unos cilindritos de 3  $\mu$  de diámetro por 2  $\mu$  de altura, la densidad se sitúa entre 1-1.1 g /  $cm^3$  (se seleccionó el valor medio) y  $E$  fue de  $1.074 \cdot 10^8$  esporas en 4.651 g de materia seca.

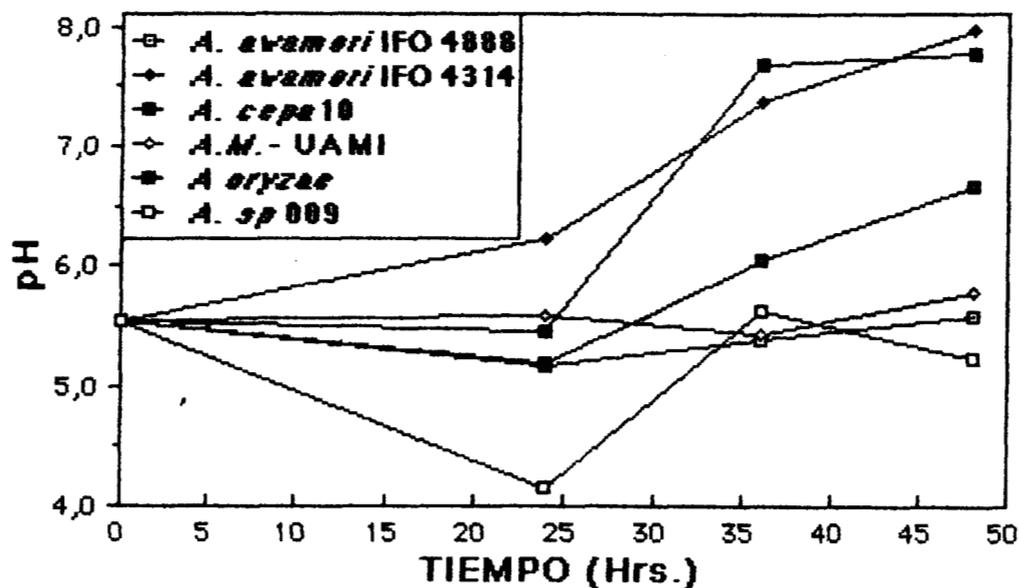
## VI.- RESULTADOS Y DISCUSION.

a) Optimización del medio de cultivo para la producción de proteasas ácidas por medio de FES.a.1) Selección de la mejor cepa productora de proteasas ácidas.

## a.1.1.- Fermentación con todas las cepas.

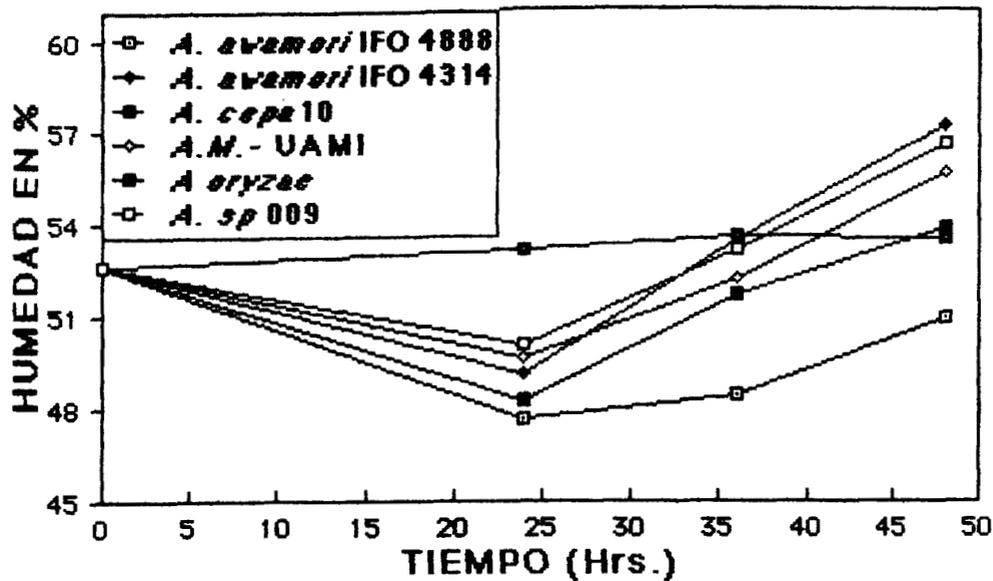
Se utilizó una cepa mutada del género *Aspergillus* hiperproductora de proteasas ácidas denominada AM-UAMI, la cual se comparó con otras cinco cepas de colección del mismo género expuestas en la sección b.2 del capítulo V.

Se tomaron datos a las 24, 36 y 48 hrs. a una temperatura de 33°C, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un pH y una humedad iniciales de 5.5 y 50% respectivamente, se utilizó soya como medio de fermentación con un tamaño de partícula promedio de 1.455 mm y un tamaño de inóculo de  $2 \times 10^8$  esp/10 g de SIS. Los resultados de la fermentación a.1.1 se dan a continuación en las gráficas No.1-4.



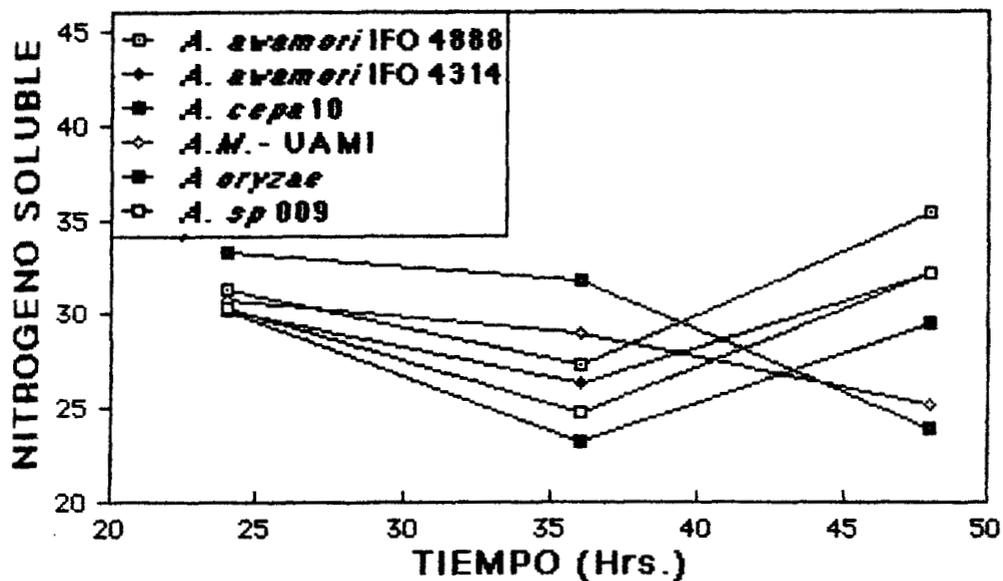
Gráfica No.1. Evolución del pH para todas las cepas durante 48 horas de fermentación.

La tendencia general de las cepas fue bajar el pH a un valor promedio de 5.3 a las 24 horas, para después subirlo y estabilizarlo a partir de las 36 horas hasta 6.5 en promedio.



Gráfica No.2. Evolución de la humedad para todas las cepas durante 48 horas de fermentación.

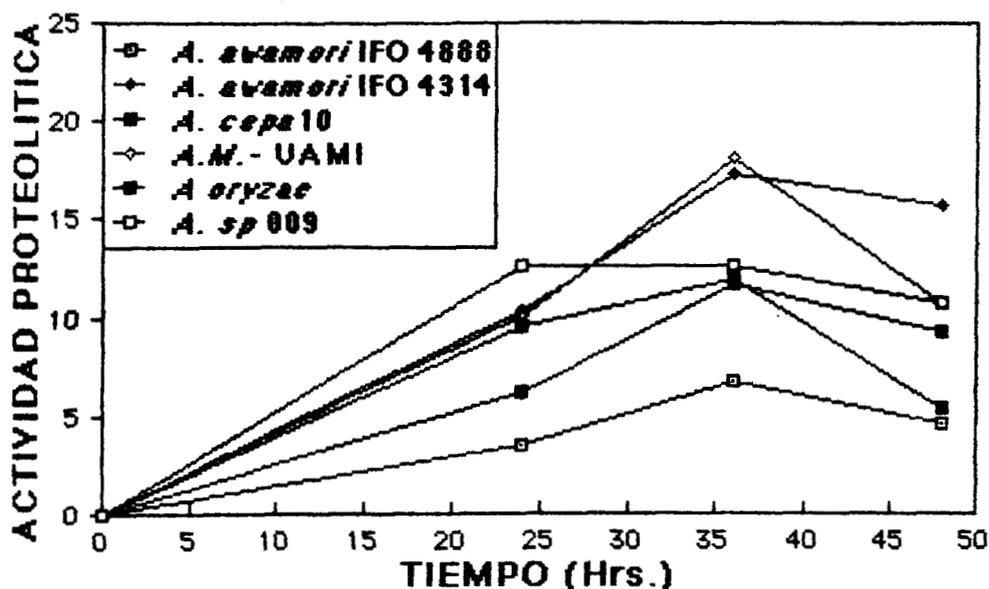
La humedad se disminuyó a un valor promedio de 50% a las 24 horas aumentando posteriormente hasta un promedio de 54.6% a las 48 horas, se puede considerar que este parámetro aproximadamente se mantiene.



Gráfica No.3. Evolución de la cantidad de nitrógeno soluble para todas las cepas durante 48 horas de fermentación.

El nitrógeno soluble (micromoles de tirosina por gramo de materia seca) da una idea de qué tan disponible se encuentra este elemento para el hongo, en lo cual para cada cepa en general hay una disminución después de las 24 hasta las 36 horas y un aumento posterior a las 48 hrs. a excepción de las cepas AM-UAMI y *A. cepa 10* en las cuales disminuyó.

Con respecto a la actividad proteolítica (micromoles de tirosina por gramo de materia seca y por minuto) se tiene lo siguiente:



Gráfica No.4. Comparación de todas las cepas para la producción de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo a la cepa A.M.-UAMI y haciendo el análisis en el tiempo de la mayor actividad proteolítica (36 hr) se obtiene lo siguiente:

a) <i>A. awamori</i> IFO4314	X= 6.76	s=0.78	F=185.16 > $F_{1\ 2\ 05}=18.51$
b) <i>A. awamori</i> IFO4888	X=17.32	s=1.08	F= 0.69 < $F_{1\ 2\ 05}=18.51$
c) <i>Aspergillus cepa 10</i>	X=11.93	s=0.65	F= 63.38 > $F_{1\ 2\ 05}=18.51$
d) A.M.-UAMI	X=18.14	s=0.89	(testigo)
e) <i>Aspergillus oryzae</i>	X=11.69	s=0.16	F=101.60 > $F_{1\ 2\ 05}=18.51$
f) <i>Aspergillus sp 009</i>	X=12.70	s=1.43	F= 20.88 > $F_{1\ 2\ 05}=18.51$

Nomenclatura: X-media, s-desviación estándar y F,  $F_x$  y z-factores estadísticos.

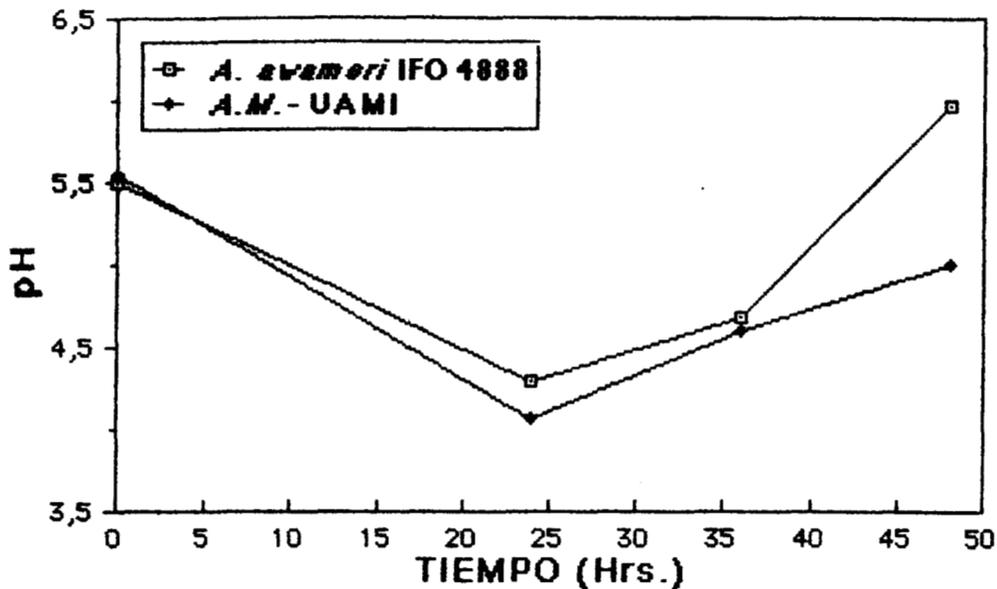
Por los factores estadísticos se obtuvo que sólo la cepa *A. awamori* IFO 4888 no presentó una diferencia significativa con respecto a la A.M.-UAMI, por lo que cualquiera de las dos cepas es adecuada para la producción de proteasas ácidas.

La mayor producción de proteasas ácidas se obtuvo a las 36 horas con la cepa A.M.-UAMI teniendo un pH de 5.4, 52.3% de humedad y 29 unidades de nitrógeno soluble.

En base a las tendencias observadas la mayor actividad proteolítica se obtuvo cuando el pH tiende a estabilizarse a las 36 hrs., al aumentar la humedad después de las 24 hrs. y al disminuir la cantidad de nitrógeno soluble en el mismo tiempo, o sea que la producción de estas enzimas podrían estar ligadas con las variables mencionadas.

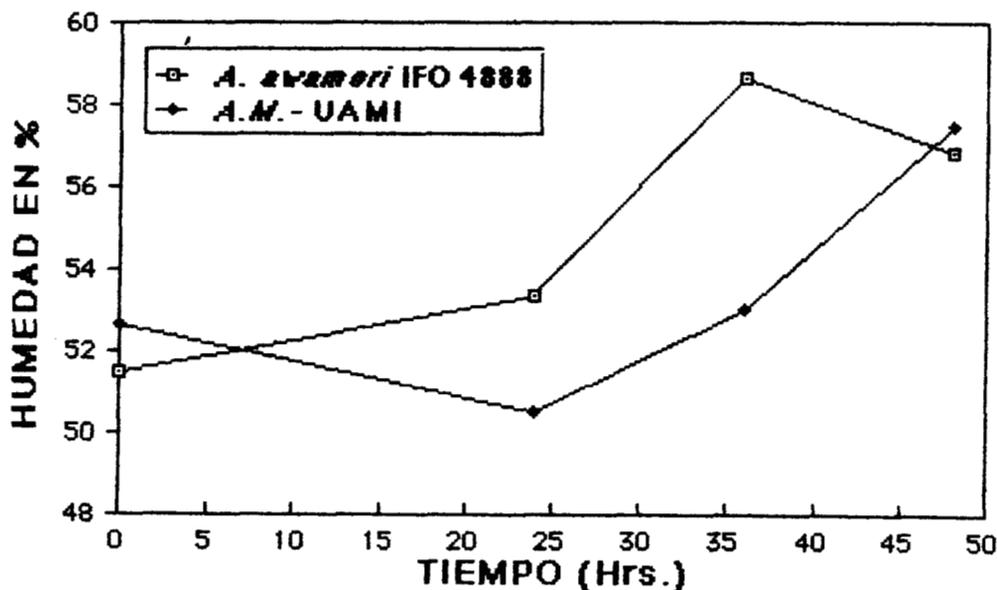
## a.1.2.- Fermentación con las dos mejores cepas.

Se probó la eficiencia de la cepa hiperproductora con respecto a la de *Aspergillus awamori* IFO 4888, teniendo las mismas condiciones de operación que la fermentación a.1.1 pero con salvado de trigo como sustrato, los resultados se dan en las gráficas No.5-8.



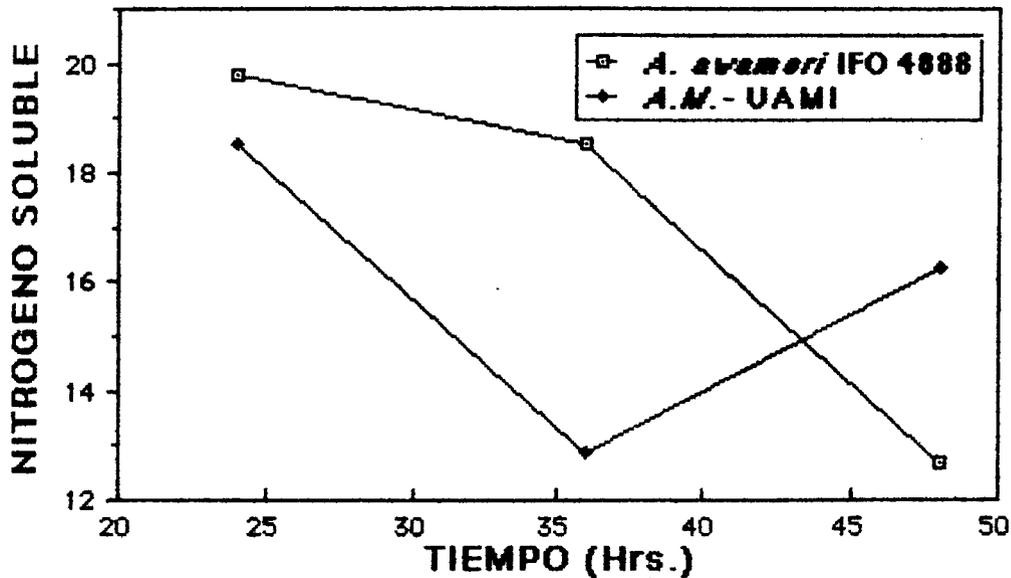
Gráfica No.5. Evolución del pH para las dos mejores cepas en 48 horas de fermentación.

En ambos casos el pH disminuye a un promedio de 4.18 a las 24 horas y aumentando después a 5 y 6 para A.M.-UAMI y *A. awamori*. IFO 4888 respectivamente.



Gráfica No.6. Evolución de la humedad para las dos mejores cepas durante 48 horas de fermentación.

La humedad sube un poco en la misma magnitud para las dos cepas teniendo la mayor diferencia a las 36 horas, 53 y 58.7% para A.M.-UAMI y A. *awamori*. IFO 4888 respectivamente.

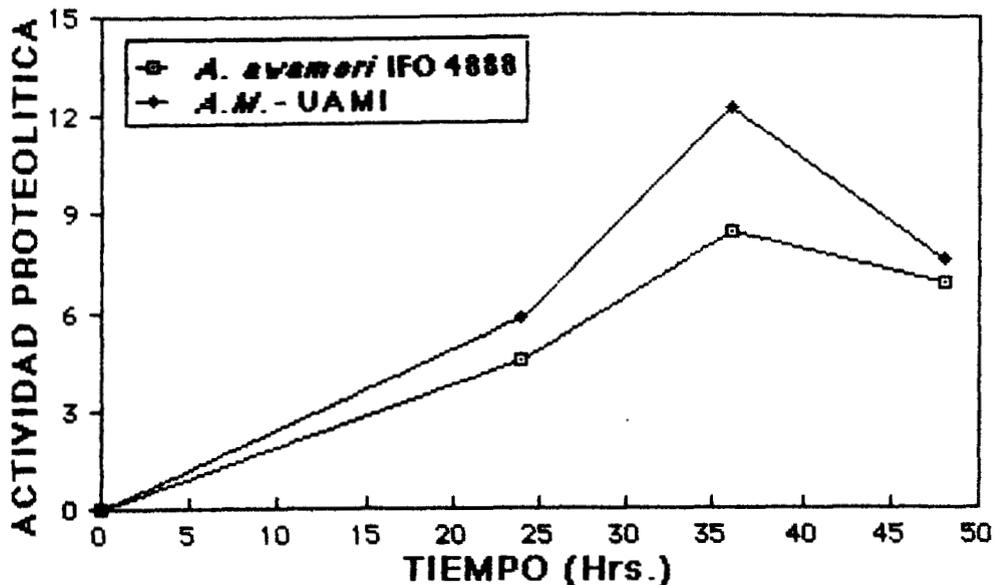


Gráfica No.7. Evolución de la cantidad de nitrógeno soluble para las dos mejores cepas durante 48 horas de fermentación.

El nitrógeno soluble ( $\mu$  moles de tirosina/g M.S.) tiene variaciones pequeñas tendientes a disminuir, a las 36 horas se tienen las más significativas con 12.9 y 18.5 unidades para A.M.-UAMI y A. *awamori*. IFO 4888 respectivamente.

En general durante la fermentación se tiene la tendencia de bajar el pH y el nitrógeno soluble en ambas cepas, también baja la humedad para la cepa AM-UAMI a las 24 hrs. y posteriormente aumenta, en cambio para la cepa A. *awamori* IFO. 4888 dicha humedad aumenta.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente perfil:



Gráfica No.8. Comparación de las mejores cepas productoras de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo a la cepa mutada A.M.-UAMI se obtuvo lo siguiente:

a) A. Awamori IFO4888	X= 8.38	s=1.40	F=8.07 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
b) A.M.-UAMI	X=12.18	s=1.27	(testigo)

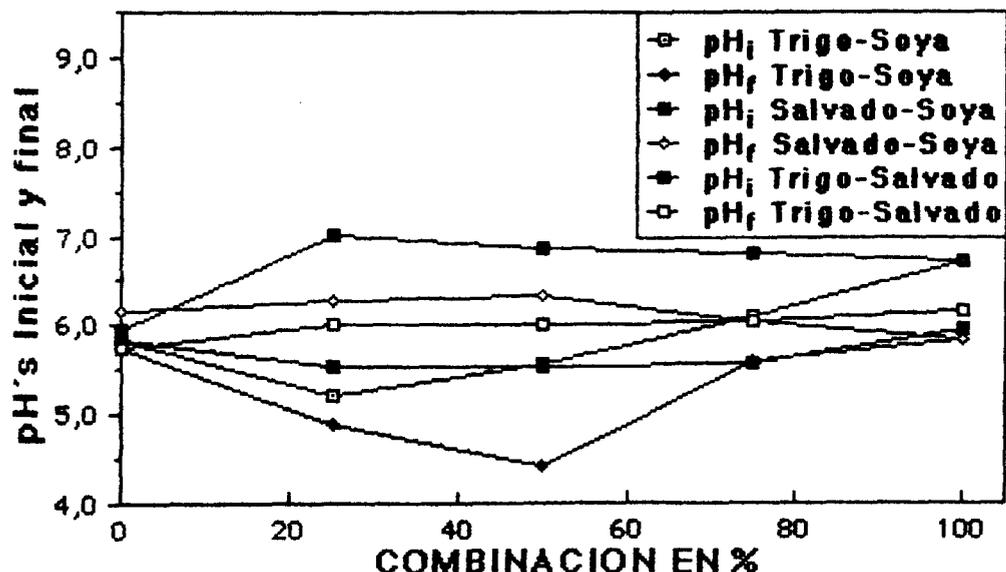
Nomenclatura: X-media, s-desviación estándar y F, F<sub>x y z</sub>-factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se observa que los resultados de ambas cepas no son significativamente diferentes, por lo que también con salvado de trigo se puede utilizar cualquiera de las dos para la producción de proteasas ácidas, así la cepa A.M.-UAMI es competitiva para la producción enzimática y es la que se utilizó para todas las fermentaciones siguientes a 36 horas de fermentación.

La mayor producción de proteasas se obtuvo con la cepa A.M.-UAMI cuando el pH tiende a estabilizarse hasta 4.6 a las 36 hrs., al aumentar la humedad al 53% y al disminuir la cantidad de nitrógeno soluble a 12.9 unidades después de las 24 horas.

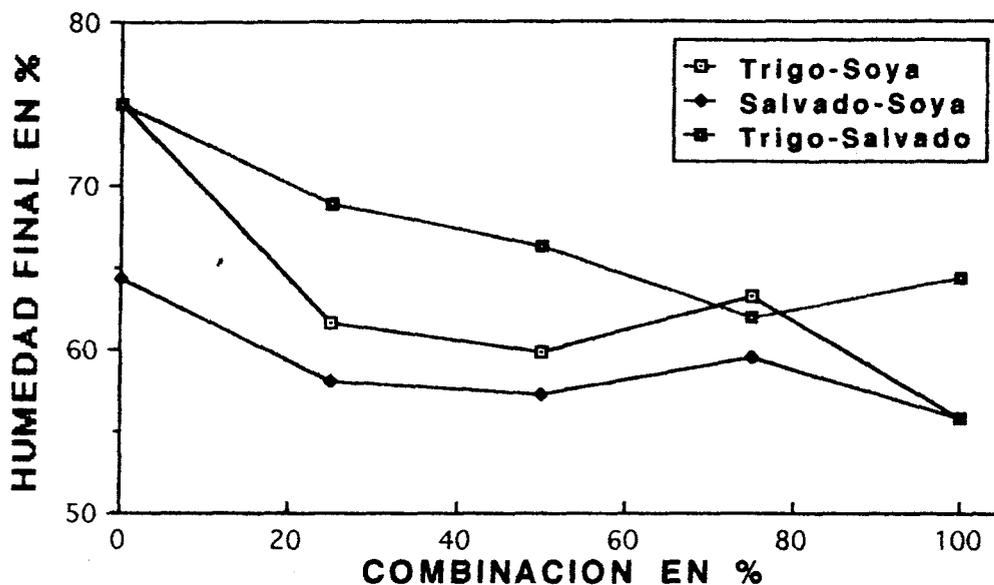
a.2) Selección del mejor medio de cultivo utilizado como soporte de la fermentación.

Se probaron tres soportes clásicos para la fermentación sólida implementando la técnica Koji, se utilizó salvado, soya y trigo como medios de fermentación puros y en combinaciones al 25, 50 y 75% con un tamaño de partícula promedio de 1.455 mm, a una temperatura de 33°C, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de inóculo de 2 \*10<sup>8</sup> esp/10 g de SIS, un pH y una humedad iniciales de 5.5-6.0 y 50% respectivamente durante 36 horas de fermentación. Los resultados se dan a continuación en las gráficas No.9-12.



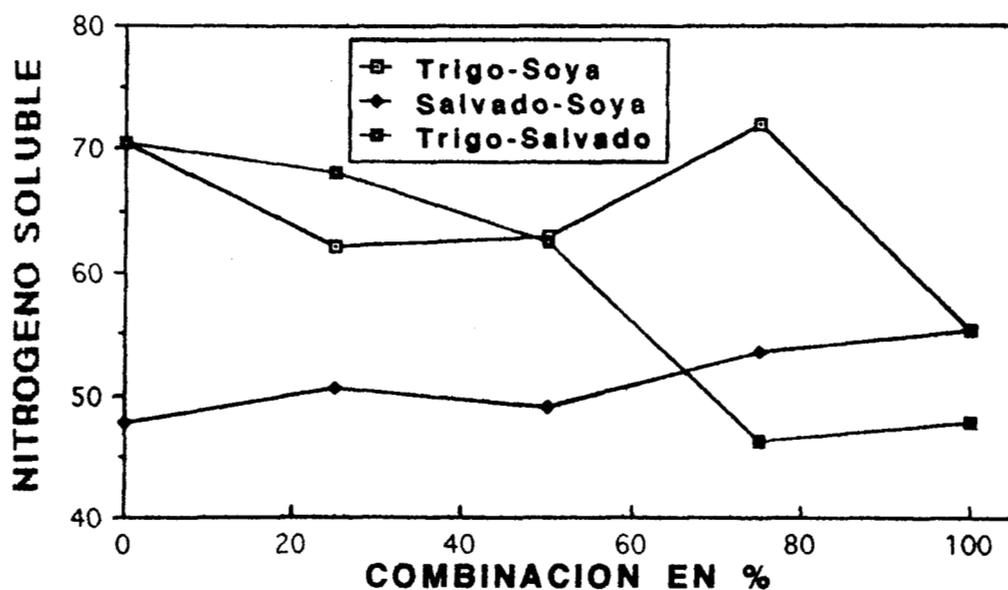
Gráfica No.9. Comparación de los pH's inicial y final para todas las combinaciones.

En general el pH final se mantiene en valores alrededor de 6 a excepción de las combinaciones de 50% trigo+50% soya y 75% trigo+25% soya, en donde se obtuvieron valores menores que 5.



Gráfica No.10. Comparación de la humedad final para todas las combinaciones.

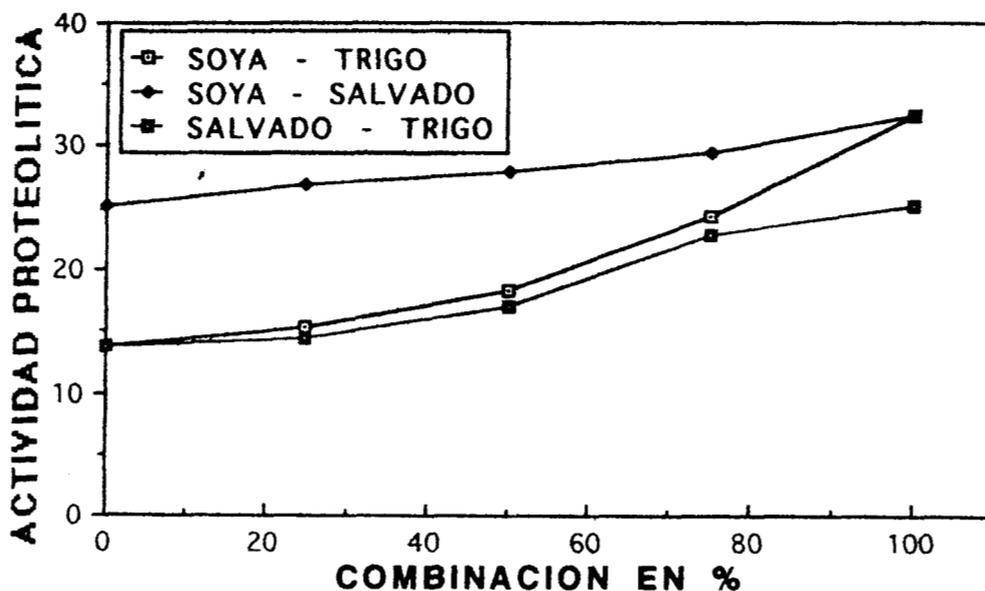
Las humedades finales tienen valores mayores de 60% para el trigo puro y sus combinaciones al igual que para salvado puro a excepción de 50% trigo+50%soya , y menores de este valor para soya pura y sus combinaciones con salvado.



Gráfica No.11. Comparación del nitrógeno soluble para todas las combinaciones.

El nitrógeno soluble (mmol tirosina/g M. S.) tiene valores mayores de 60 unidades para trigo y sus combinaciones con excepción de 25% trigo+75% salvado, y menores que este valor para salvado puro, soya pura y sus combinaciones.

Para la actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min se tiene lo siguiente:



Gráfica No.12. Comparación de tres soportes utilizados en la fermentación Koji para la producción de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo la relación 50% de salvado y 50% de soya se obtiene lo siguiente:

a) 100% TR	X=13.83	s=0.62	F=37.80 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51
b) 100% SV	X=25.09	s=0.94	F= 1.48 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
c) 100% SY	X=32.53	s=0.95	F= 3.79 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
d) 25% TR,75%SV	X=22.78	s=0.43	F= 5.16 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
e) 50% TR,50%SV	X=16.98	s=0.99	F=21.57 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51
f) 75% TR,25%SV	X=14.48	s=0.41	F=35.07 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51
g) 25% TR,75%SY	X=24.36	s=0.26	F= 2.52 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
h) 50% TR,50%SY	X=18.03	s=1.41	F=15.29 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
i) 75% TR,25%SY	X=15.25	s=0.07	F=31.68 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51
j) 25% SV,75%SY	X=29.46	s=0.35	F= 0.45 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
k) 50% SV,50%SY	X=27.95	s=3.19	(testigo)
l) 75% SV,25%SY	X=26.75	s=0.34	F= 0.28 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51

**Nomenclatura:** SV=salvado, SY=soya y TR=trigo, X-media, s-desviación estándar y F, F<sub>x</sub> y z-factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se tiene que las mejores combinaciones con respecto al testigo son 25% SV+75% SY y 75% SV+25% SY, por lo que se puede utilizar cualquiera de las combinaciones comprendidas entre estos valores. Debido a los problemas de empaque que se tienen con la soya y aprovechando las propiedades de retención de humedad del salvado se sugirió la combinación de 60% salvado y 40% soya.

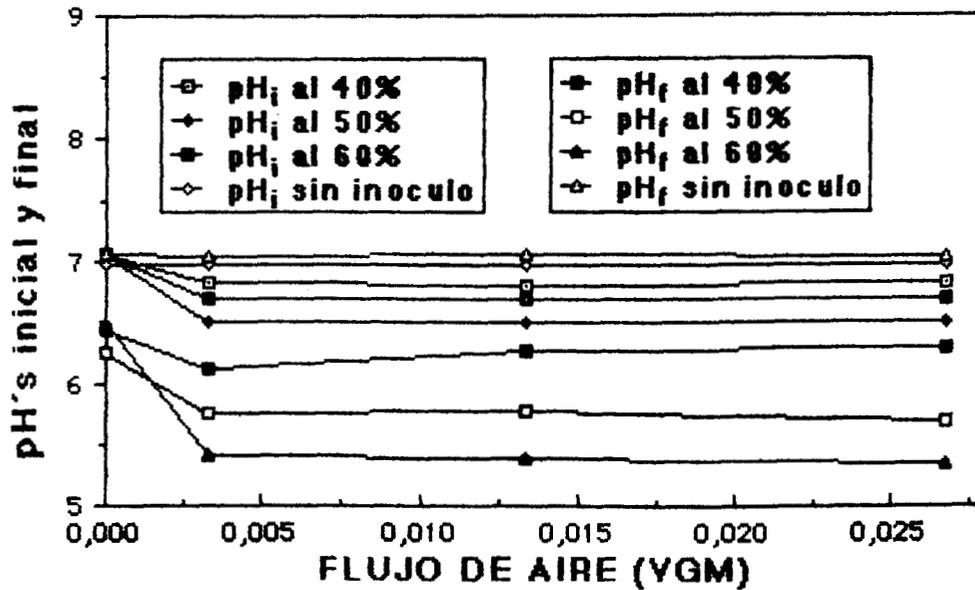
Se observó que la productividad proteolítica aumenta con bajos niveles de nitrógeno soluble y humedades de 55-60% para soya y sus combinaciones con salvado.

### a.3) Efecto de las condiciones de operación.

Se experimentó con factores físicos independientes de la preparación del medio de cultivo como temperatura y aereación y con los dependientes como la humedad y el pH iniciales, el tamaño de inoculo, el tamaño de partícula del medio de fermentación y la densidad de empaque de éste.

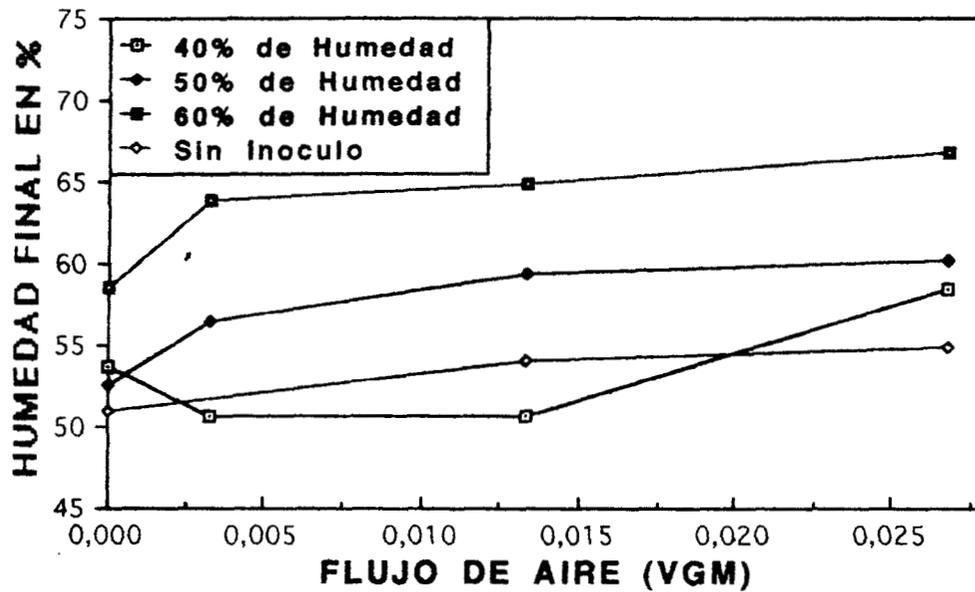
#### a.3.1) Efecto de la humedad inicial y de las condiciones de aereación.

Se varió el flujo de aire a razón de 0, 0.033, 0,0133 y 0,0267 VGM (0, 1, 4 y 8 lt/hr) utilizando humedades del 40, 50 y 60%, a una temperatura de 33°C, un pH inicial de 6.9, un tamaño de partícula promedio de 1.455 mm (60% salvado y 40% soya) y un tamaño de inoculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de SIS durante 36 horas de fermentación, teniendo los resultados en las gráficas No.13-17.



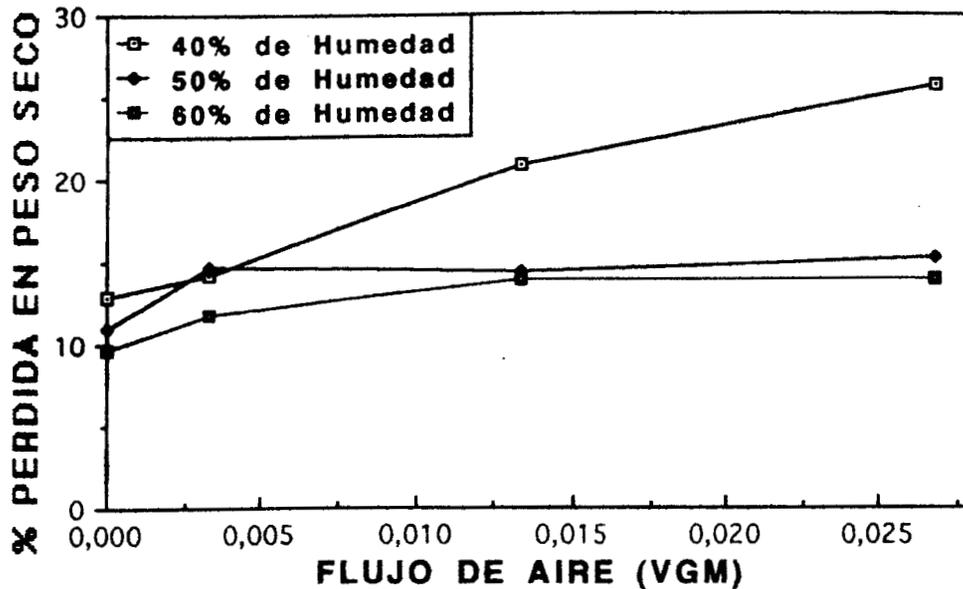
Gráfica No.13. Comparación de los pH's inicial y final a diferentes humedades y flujos.

El pH final tiende a mantenerse estable en valores de 6.2, 5.7 y 5.4 para 40, 50 y 60% de humedad en los flujos de 0, 0.033, 0.0133 y 0.0267 VGM y valores mayores que los anteriores a 0 VGM, el medio sin inoculo no tiene variaciones en el pH.



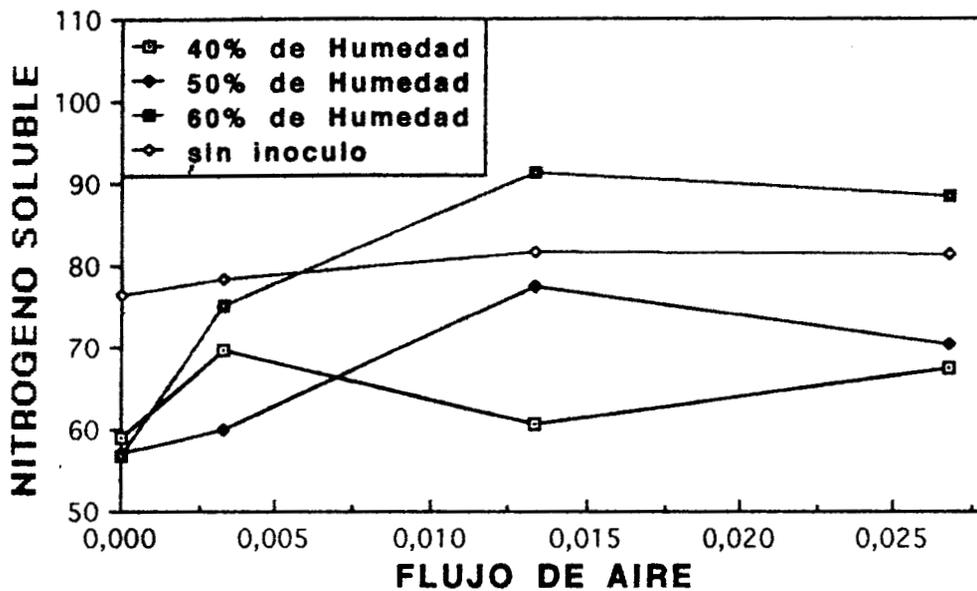
Gráfica No.14. Comparación de la humedad final a diferentes humedades y flujos.

La humedad final tiende a aumentar conforme aumenta el flujo de aire hasta valores de 60.09 y 66.81 para las humedades iniciales de 50 y 60% respectivamente, mientras que el medio de 40% de humedad inicial disminuye después de 0 VGM a 50.6%, se mantiene en el intervalo de 0.0033-0.0133 VGM y aumenta posteriormente a 58.4%



Gráfica No.15. Comparación del porcentaje de pérdida en peso seco a diferentes humedades y flujos.

El porcentaje de pérdida en peso seco tiende a aumentar en el medio de 40% de humedad inicial conforme aumenta el flujo de aire hasta un valor de 25.6%, en los otros casos se mantiene en un promedio de 13%.

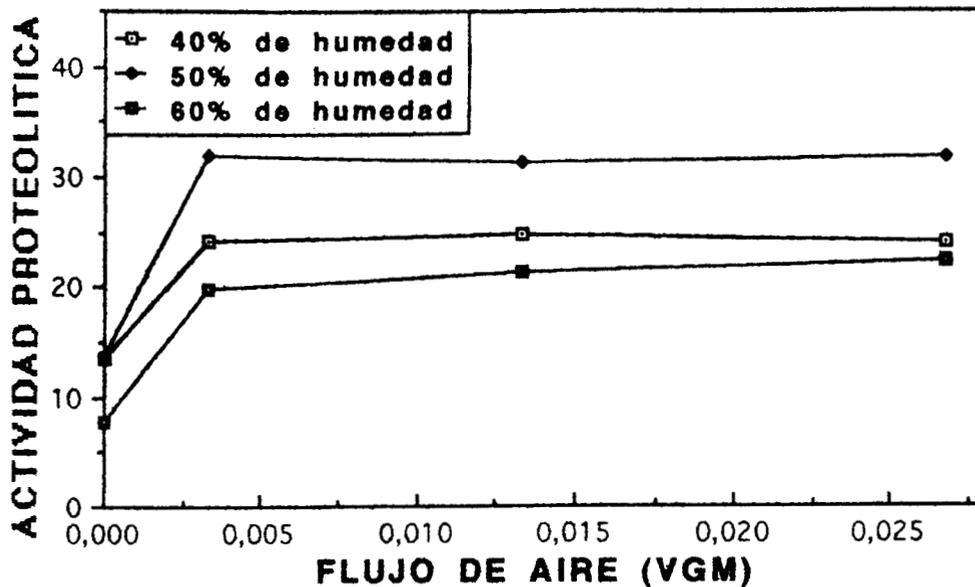


Gráfica No.16. Comparación del nitrógeno soluble a diferentes humedades y flujos.

El nitrógeno soluble ( $\mu$  moles de tirosina/g M.S.) aumenta hasta el flujo de 0.0133 VGM y luego disminuye ligeramente en el de 0.0267 VGM, a excepción del medio de

40% de humedad inicial en donde aumenta en el flujo de 0.0033 VGM y disminuye en el de 0.133 VGM manteniéndose posteriormente.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente perfil:



Gráfica No.17. Efecto de las condiciones de aereación del medio de fermentación sobre la producción de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo los flujos al 50% de humedad se obtiene lo siguiente:

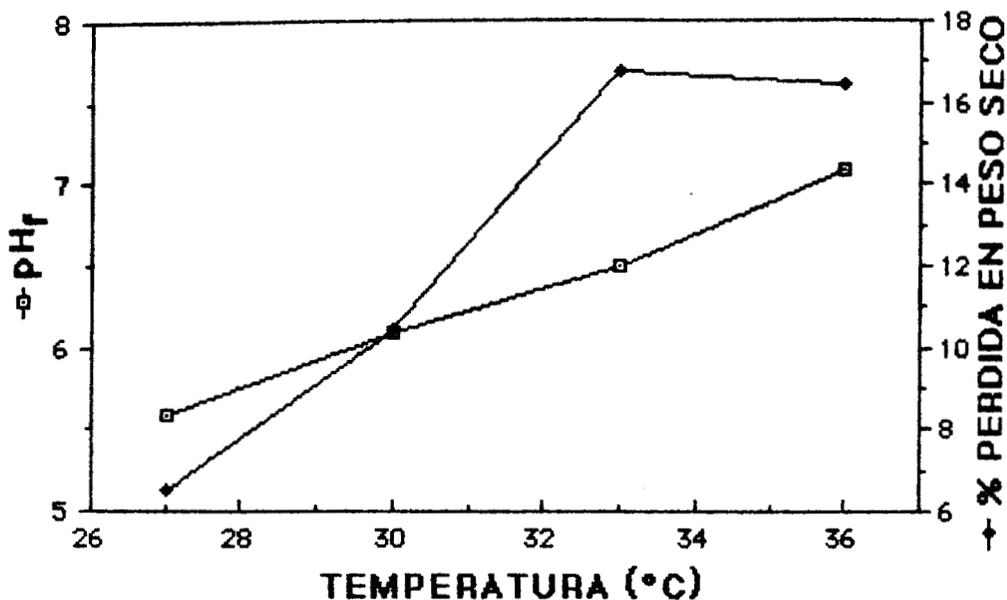
a) 40% H.	0.0000 VGM	X=13.44	s=2.61	F= 0.03 < $F_{1,4,05}=7.71$
	0.0033 VGM	X=24.11	s=0.54	F=606.60 > $F_{1,4,05}=7.71$
	0.0133 VGM	X=24.80	s=2.01	F= 18.35 > $F_{1,4,05}=7.71$
	0.0267 VGM	X=23.93	s=1.01	F= 80.01 > $F_{1,4,05}=7.71$
b) 50% H.	0.0000 VGM	X=13.72	s=0.52	(testigo)
	0.0033 VGM	X=31.82	s=0.06	(testigo)
	0.0133 VGM	X=31.29	s=1.69	(testigo)
	0.0267 VGM	X=31.79	s=1.14	(testigo)
c) 60% H.	0.0000 VGM	X=7.77	s=1.60	F=37.56 > $F_{1,4,05}=7.71$
	0.0033 VGM	X=19.78	s=4.37	F=22.82 > $F_{1,4,05}=7.71$
	0.0133 VGM	X=21.40	s=0.71	F=87.02 > $F_{1,4,05}=7.71$
	0.0267 VGM	X=22.25	s=2.20	F=44.63 > $F_{1,4,05}=7.71$

**Nomenclatura:** SIS-sustrato inicial seco, H-humedad, X-media, s-desviación estándar y F,  $F_x$  y  $F_z$ -factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se aprecia que los flujos al 50% de humedad son significativamente mejores que los flujos al 40 y 60% de humedad, por lo cual se utilizó esta condición para las fermentaciones posteriores con un flujo de aire de 4 lt/hr, para facilitar el suministro de oxígeno y la eliminación del calor metabólico generado por el hongo.

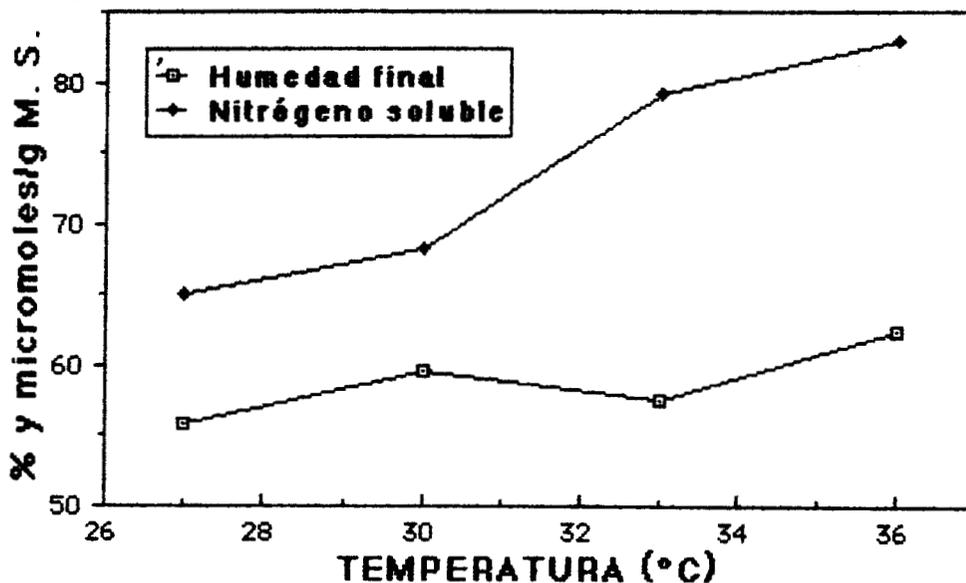
a.3.2) Efecto de la temperatura de fermentación.

Se probaron cuatro temperaturas en baños de temperatura constante independientes, a un pH de 7, una humedad del 51.16%, un tamaño de partícula promedio de 1.455 mm (60% salvado y 40% soya) y un tamaño de inóculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de SIS durante 36 horas de fermentación teniendo los resultados en las gráficas No.18-20.



Gráfica No.18. Variación del pH final y del porcentaje de pérdida en peso seco con la temperatura de fermentación.

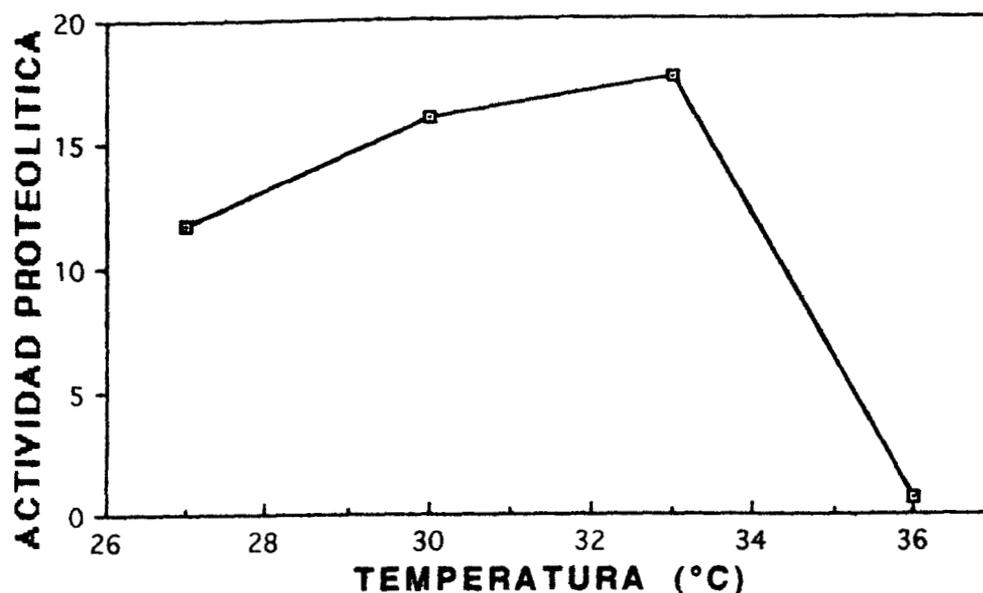
El pH final aumentó al aumentar la temperatura de fermentación mientras que la pérdida en peso seco se incrementó hasta un valor de 16.8% a 33°C y después disminuyó ligeramente a 36°C.



Gráfica No.19. Variación de la humedad final y del nitrógeno soluble con la temperatura.

Al aumentar la temperatura de fermentación el nitrógeno soluble ( m moles de tirosina/g M.S.) y la humedad final aumentaron hasta 82 unidades y 62.5% respectivamente.

La actividad proteolítica en  $\mu$  moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No.20. Efecto de la temperatura de fermentación sobre la producción de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo los flujos al 50% de humedad se obtiene lo siguiente:

a) 27°C	X=11.77	s=1.14	F=62.87 > F <sub>1,4,05</sub> =6.61
b) 30°C	X=16.03	s=1.09	F= 4.90 < F <sub>1,4,05</sub> =6.61
c) 33°C	X=17.59	s=0.60	(testigo)
d) 36°C	X= 0.66	s=0.22	F=2082.57 > F <sub>1,4,05</sub> =6.61

Nomenclatura: X-media, s-desviación estándar y F, F<sub>x</sub> y z-factores estadísticos.

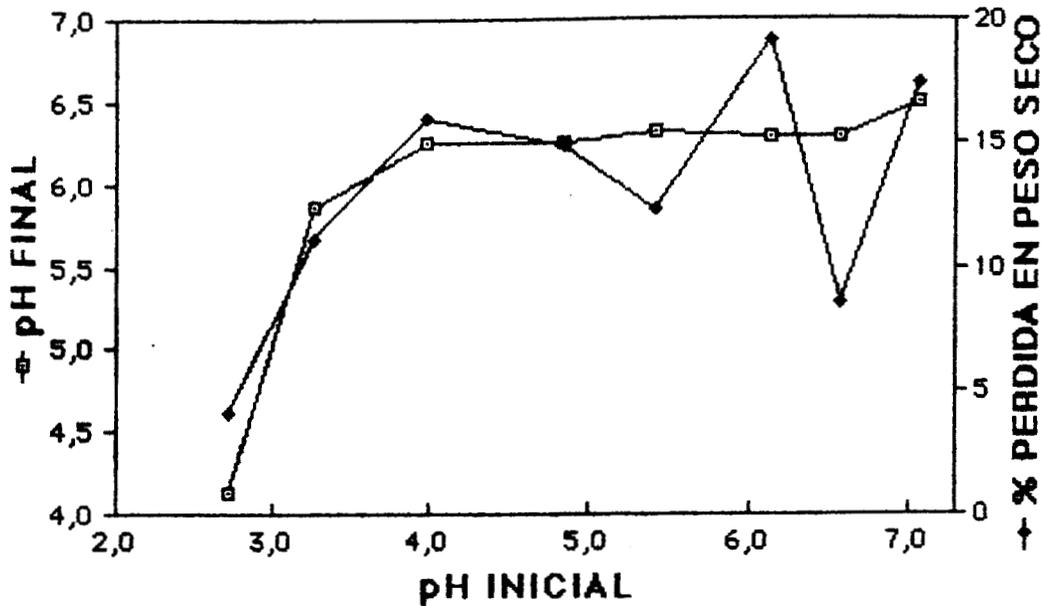
Por los factores estadísticos se observa que sólo a 30 y 33°C no se tiene una diferencia significativa, eligiendo la última temperatura para las fermentaciones siguientes debido a que es más fácil de regular por las condiciones del laboratorio.

Se observó que la productividad proteolítica aumenta con la temperatura hasta 33°C y posteriormente baja drásticamente a 36°C, por lo cual la producción de estas enzimas es función de la temperatura de fermentación.

### a.3.3) Efecto del pH inicial del medio de fermentación.

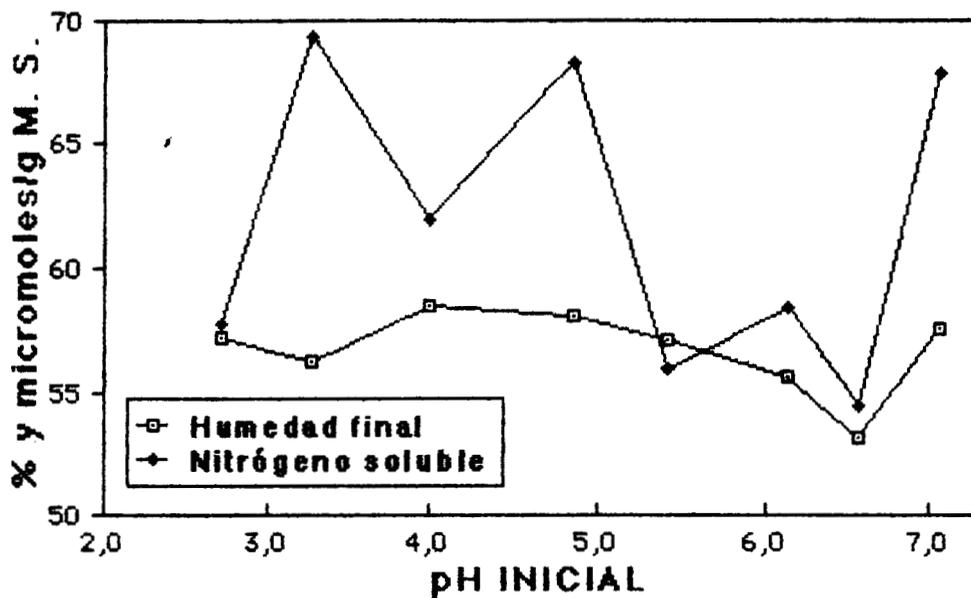
Se varió el pH inicial del medio de cultivo en forma independiente con un tamaño de inoculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de SIS, una humedad inicial promedio de 50%, a una temperatura de 33°C, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula

promedio de 1.455 mm (60% salvado y 40% soya), cuyos resultados se dan en las gráfica No.21-23.



Gráfica No.21. Efecto del pH inicial sobre el pH final y el porcentaje de pérdida en peso seco.

Al disminuir el  $pH_i$  el  $pH_f$  disminuyó hasta un valor de 4.12 y en el intervalo de 4-7 se mantuvo en un valor promedio de 6.3, el porcentaje de pérdida en peso seco bajó hasta un valor de 4.09% mientras que a  $pH$ 's más altos oscila alrededor de 14.7%.

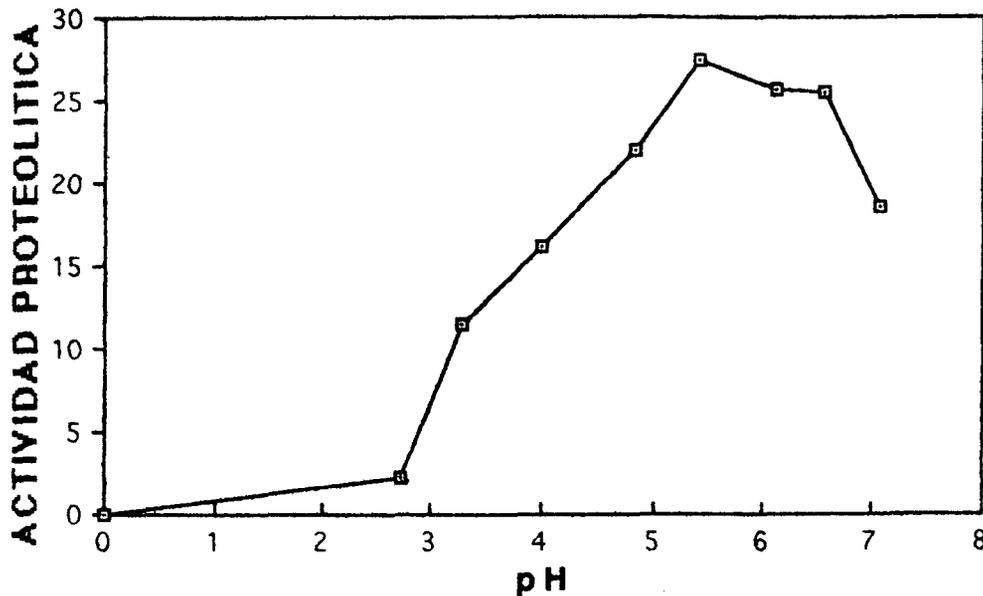


Gráfica No.22. Efecto del pH inicial sobre la humedad final y el nitrógeno soluble.

La humedad final tiende a mantenerse en un valor promedio de 56.7%, mientras que

el nitrógeno soluble (m moles de tirosina/g M.S.) se mantuvo oscilando alrededor de 61.8 unidades.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente perfil:



**Gráfica No. 23.** Efecto del pH inicial del medio de fermentación sobre la producción de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo el pH de 5.4 se obtiene lo siguiente:

a) 2.72	X= 2.32	s=0.33	F=851.36 > $F_{1, 4, 05}=7.71$
b) 3.27	X= 11.50	s=1.80	F=142.02 > $F_{1, 4, 05}=7.71$
c) 3.99	X= 16.12	s=0.38	F=169.79 > $F_{1, 4, 05}=7.71$
d) 4.85	X= 21.94	s=2.28	F= 12.29 > $F_{1, 4, 05}=7.71$
e) 5.41	X= 27.42	s=1.45	(testigo)
f) 6.13	X= 25.60	s=1.39	F= 2.46 < $F_{1, 4, 05}=7.71$
g) 6.56	X= 25.55	s=1.48	F= 2.45 < $F_{1, 4, 05}=7.71$
h) 3.99	X= 18.51	s=1.45	F= 56.40 > $F_{1, 4, 05}=7.71$

**Nomenclatura:** X-media, s-desviación estándar y F,  $F_x$  y  $F_z$ -factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se observa que los datos a pH de 6.13 y 6.56 no presentan diferencia significativa, sin embargo se eligió el testigo debido a que el medio de fermentación se alcaliniza y puede haber condiciones desfavorables para el crecimiento del hongo.

Se observó que al aumentar el pH inicial del medio de fermentación la producción de proteasas aumenta, alcanzando un valor máximo promedio de 26.2 unidades entre 5.5-6.0 y disminuyendo posteriormente.

#### a.3.4) Efecto del tamaño de partícula del medio de fermentación.

Se experimentaron cuatro tamaños de partícula tamizando el salvado y la soya con diferentes mallas de la siguiente forma:

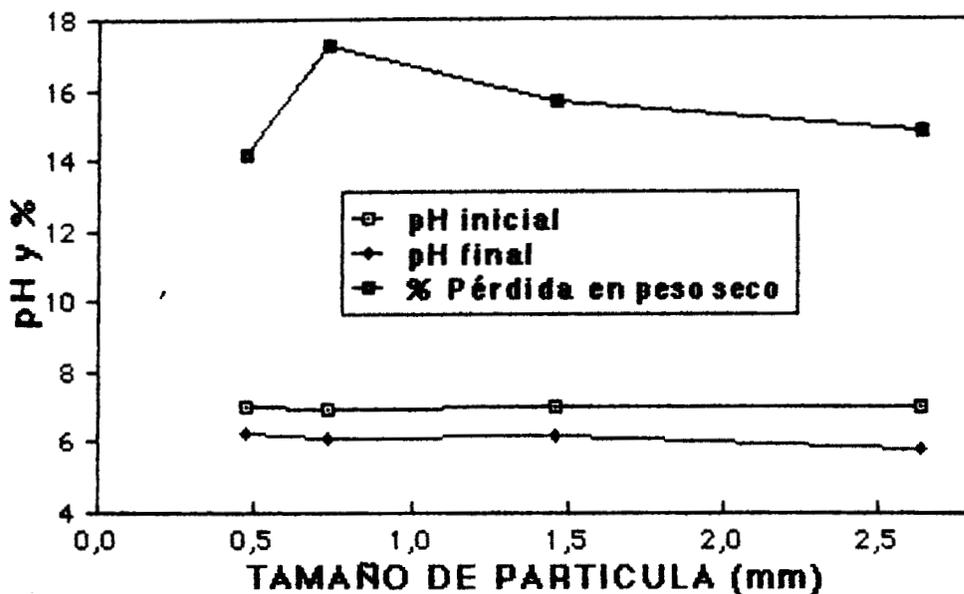
i.1) Tanto el salvado como la soya pasan malla del No.6 y no pasan malla del No.10, teniendo un tamaño de partícula promedio de 2.635 mm.

i.2) Tanto el salvado como la soya pasan malla del No.10 y no pasan malla del No.18, teniendo un tamaño de partícula promedio de 1.455 mm, éste es el testigo que se ha venido utilizando en todas las fermentaciones anteriores.

i.3) Tanto el salvado como la soya pasan malla del No.18 y no pasan malla del No.35, teniendo un tamaño de partícula promedio de 0.735 mm.

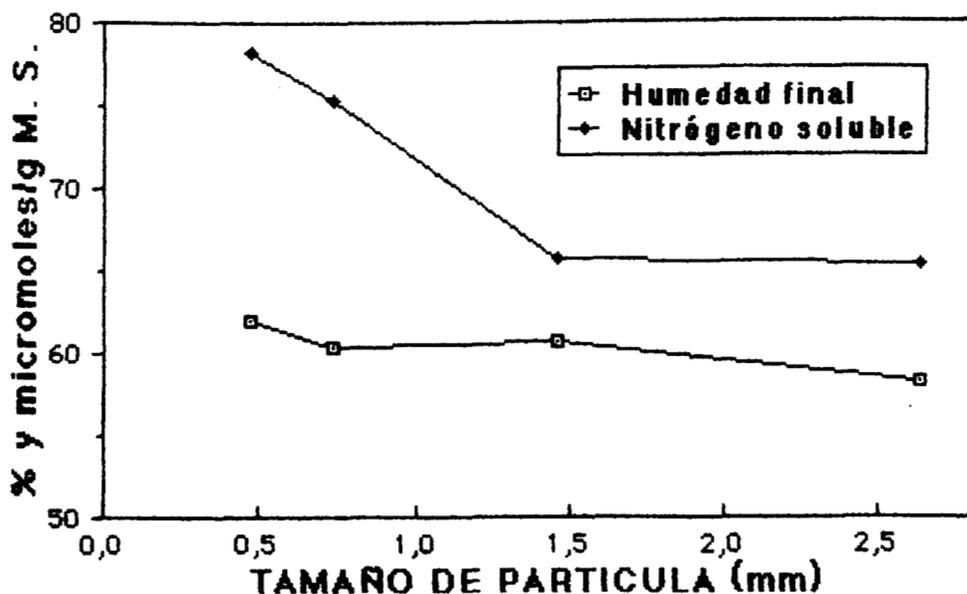
i.4) El salvado pasa malla del No.10 y no pasa malla del No.18 mientras que la soya pasa malla del No.35, teniendo un tamaño de partícula promedio de 1.455 mm y menor o igual que 0.47 mm respectivamente.

Se utilizó un tamaño de inóculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de SIS, un pH inicial de 7, una humedad de 52.8%, un flujo de aire de 0.0133 VGM, a 33°C durante 36 horas de fermentación teniendo los resultados en las gráficas No.24-26.



Gráfica No.24. Variación del pH final y del porcentaje de pérdida en peso seco con respecto al tamaño de partícula del medio de fermentación.

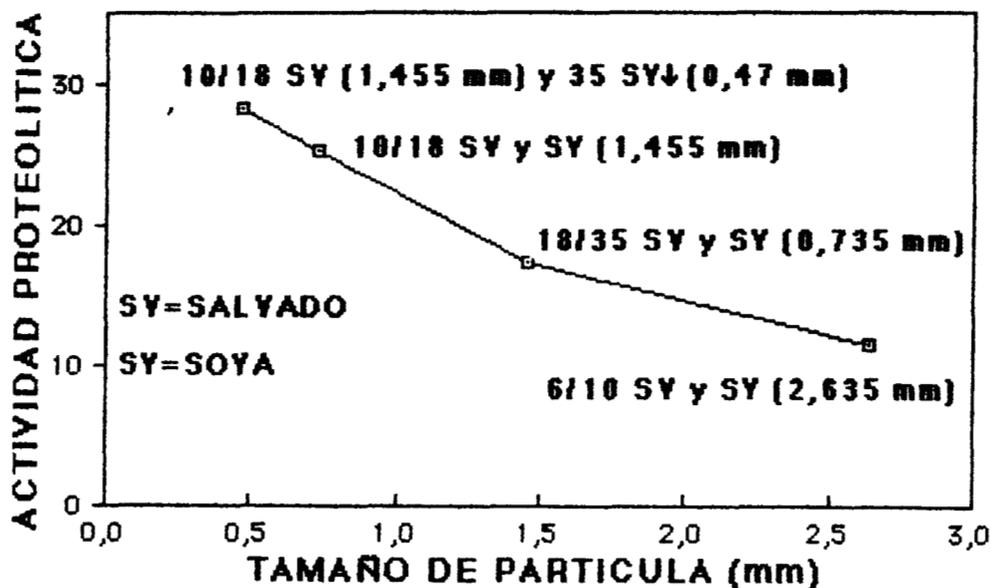
Al disminuir el tamaño de partícula del medio de fermentación el pH se mantuvo en un valor promedio de 6.1, mientras que el porcentaje de pérdida en peso seco aumentó hasta un valor de 17.2%.



Gráfica No.25. Variación de la humedad final y del nitrógeno soluble con respecto al tamaño de partícula del medio de fermentación.

Al disminuir el tamaño de partícula del medio de fermentación el pH final se mantuvo en un valor promedio de 6.1 mientras que el nitrógeno soluble ( $\mu$  moles de tirosina/g M.S.) aumentó hasta un valor de 78.2 unidades.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No.26. Efecto del tamaño de partícula del medio de fermentación sobre la producción de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo el tamaño de partícula de 1.455 y 0.47 mm para salvado y soya respectivamente se tiene:

a) 2.635 SV y SY	X= 11.56	s=0.92	F=229.20 > $F_{1,405}=7.71$
b) 1.455 SV y SY	X= 17.32	s=1.53	F= 69.27 > $F_{1,405}=7.71$
c) 0.735 SV y SY	X= 25.31	s=1.57	F= 4.79 < $F_{1,405}=7.71$
d) 1.455 SV y 0.47 SY	X= 28.21	s=1.67	(testigo)

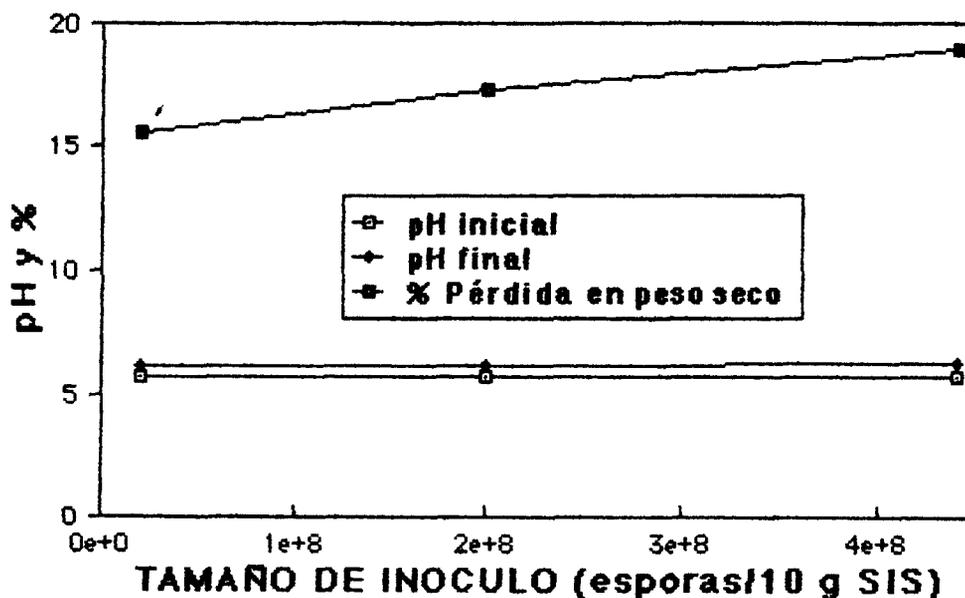
**Nomenclatura:** SV=salvado, SY=soya, X-media, s-desviación estándar y F,  $F_x$  y z factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se observa que sólo el tamaño de partícula de 0.735 mm para SV y SY no tiene diferencia significativa con respecto al testigo, éste es el que se eligió para las fermentaciones posteriores debido a que por los espacios intersticiales que presenta hay una mejor aereación, facilitando el suministro de oxígeno y la eliminación del calor metabólico generado por el hongo.

En general se observó que al disminuir el tamaño de partícula del medio de fermentación la producción de proteasas ácidas aumentó.

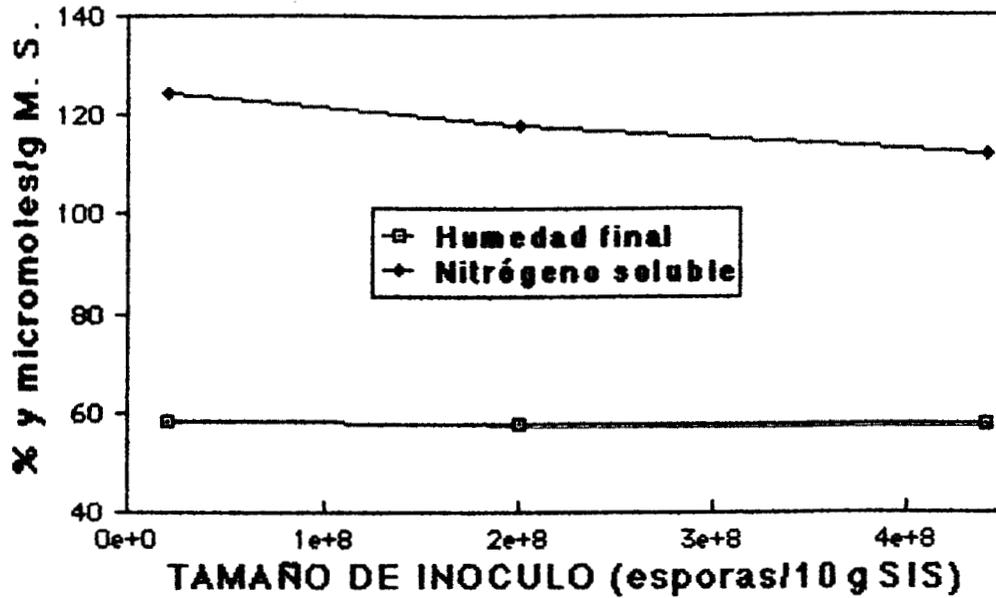
#### a.3.5) Efecto del tamaño de inóculo.

Se probaron tres tamaños de inóculo, los cuales son  $0.2 \cdot 10^8$ ,  $2 \cdot 10^8$  y  $4.4 \cdot 10^8$  esporas por cada 10 g de sustrato inicial seco (SIS), a un pH de 5.7, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula promedio de 1.455 y 0.47 mm para salvado (60%) y soya (40%) respectivamente, a 33°C durante 36 horas de fermentación y una humedad de 50%. Los resultados se dan a continuación en las gráficas No.27-29.



**Gráfica No.27.** Efecto del tamaño de inóculo sobre el pH final y el porcentaje de pérdida en peso seco.

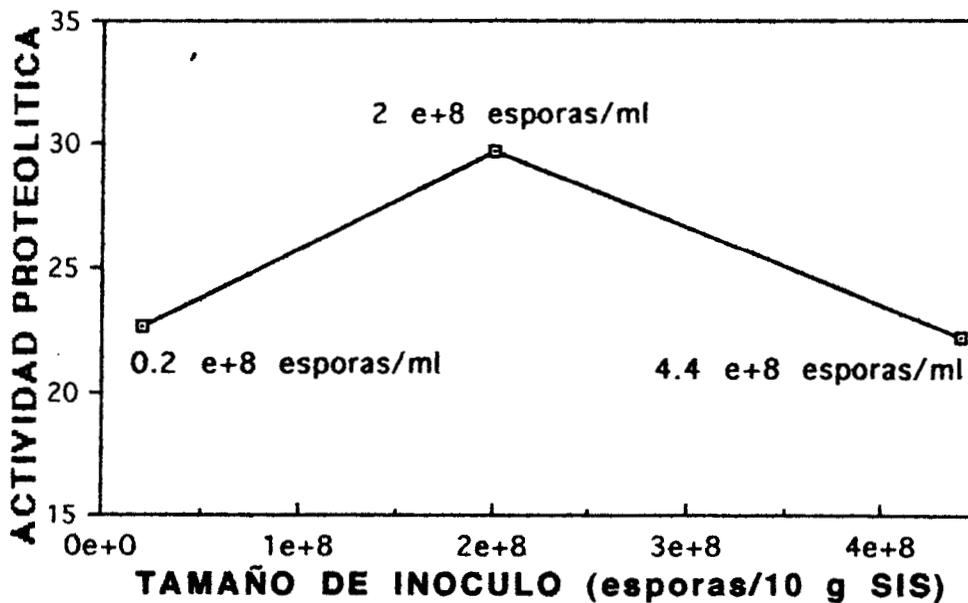
Al aumentar el tamaño de inoculo el pH final se mantuvo en un valor promedio de 6.2 mientras que el porcentaje de pérdida en peso seco aumentó hasta 19%, lo cual representa que a mayor tamaño de inoculo el crecimiento aumenta.



Gráfica No. 28. Efecto del tamaño de inoculo sobre la humedad final y el nitrógeno soluble

Al aumentar el tamaño de inoculo la humedad final se mantiene en un valor promedio de 57.95%, mientras que el nitrógeno soluble ( m moles de tirosina/g M.S.) disminuyó en 12 unidades.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No. 29. Efecto del tamaño de inoculo sobre la producción de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo el tamaño de inoculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g SIS se tiene lo siguiente:

a) $0.2 \cdot 10^8$	X= 22.59	s=2.16	F= 29.88 > $F_{1,405}=7.71$
b) $2.0 \cdot 10^8$	X= 29.77	s=0.71	(testigo)
c) $4.4 \cdot 10^8$	X= 22.22	s=0.96	F=119.47 > $F_{1,405}=7.71$

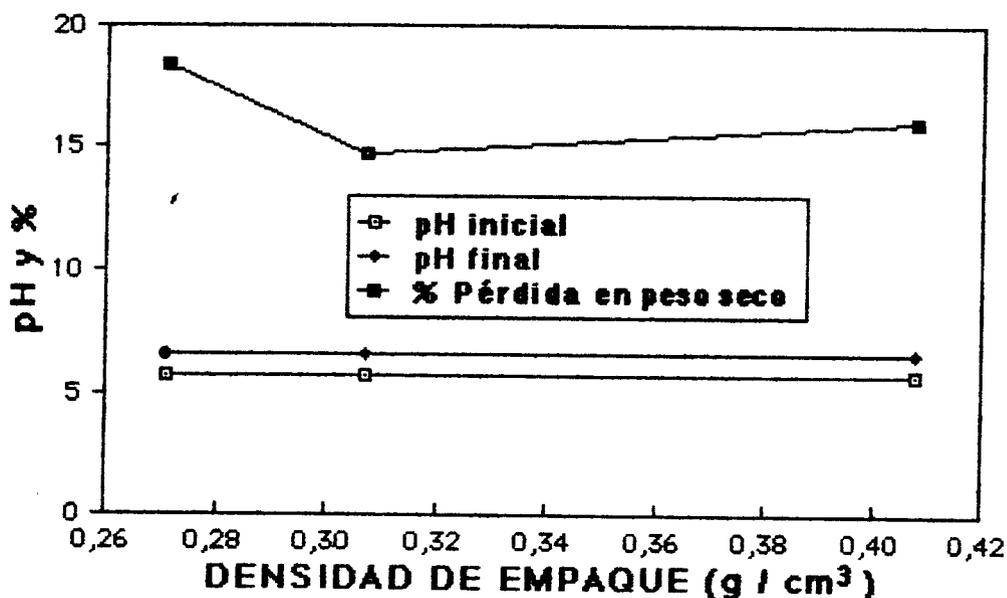
Nomenclatura: X-media, s-desviación estándar y F,  $F_x$  y z-factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se observa que se tiene una diferencia significativa con respecto al testigo, por lo que se utilizó el tamaño de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g SIS en las fermentaciones posteriores.

Al aumentar el tamaño de inoculo la producción de proteasas ácidas aumenta hasta un valor máximo y luego disminuye.

#### a.3.6) Efecto de la densidad de empaque del medio de fermentación.

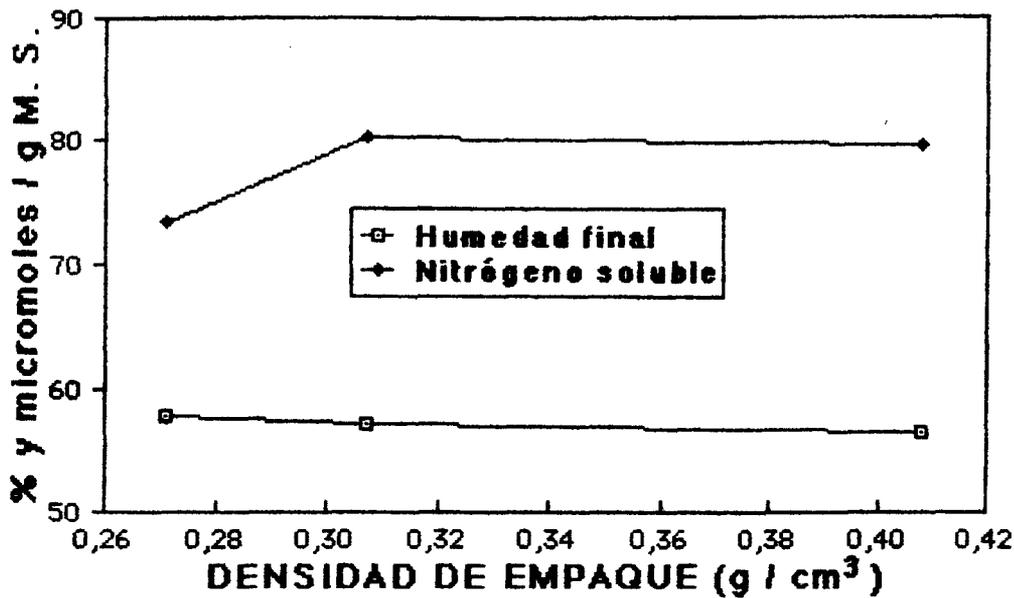
Se experimentaron tres densidades de empaque del medio de fermentación a un pH de 5.65, a una temperatura de  $33^\circ\text{C}$ , un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula promedio de 1.455 y 0.47 mm para salvado (60%) y soya (40%) respectivamente, una humedad del 49.2% y un tamaño de inoculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g SIS durante 36 horas de fermentación, mostrando los resultados en las gráficas No.30-32.



Gráfica No.30. Efecto de la densidad de empaque sobre el pH final y el porcentaje de pérdida en peso seco.

Al aumentar la densidad de empaque del medio de fermentación el pH final se mantuvo en un valor promedio de 6.6 mientras que el porcentaje de pérdida en peso disminuyó en el valor medio en 3.7 unidades y aumentando 1.3 unidades

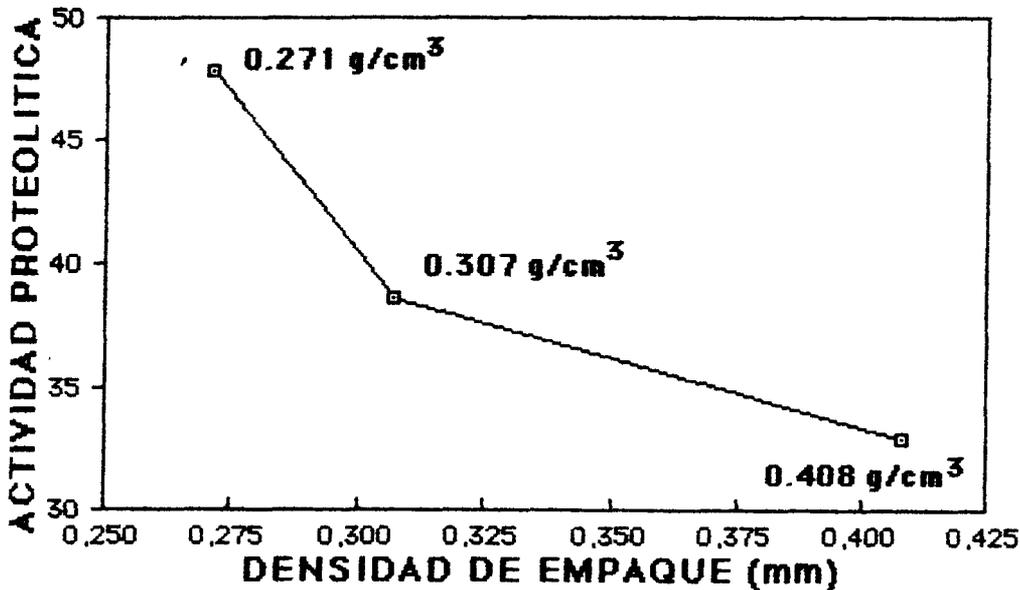
posteriormente.



Gráfica No.31. Efecto de la densidad de empaque sobre la humedad final y el nitrógeno soluble.

Cuando aumenta la densidad de empaque del medio de fermentación la humedad final se mantuvo en un valor promedio de 57.2%, y el nitrógeno soluble ( $\mu$  moles de tirosina/g M.S.) aumentó en el valor medio 6.7 unidades y se mantuvo.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No.32. Efecto de la densidad de empaque del medio de fermentación sobre la producción de proteasas ácidas.

Teniendo como testigo la densidad de empaque de  $0.27 \text{ g/cm}^3$  se tiene:

a) 0.27	X= 47.83	s=0.134	(testigo)
b) 0.31	X= 38.61	s=1.47	F= 43.00 > $F_{1, 2, 05}=18.51$
c) 0.41	X= 32.89	s=0.25	F=241.03 > $F_{1, 2, 05}=18.51$

Nomenclatura: X-media, s-desviación estándar y F,  $F_x$  y z-factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se observa que se tiene una diferencia significativa con respecto al testigo, por lo que se utilizó la densidad de empaque de éste en las fermentaciones posteriores.

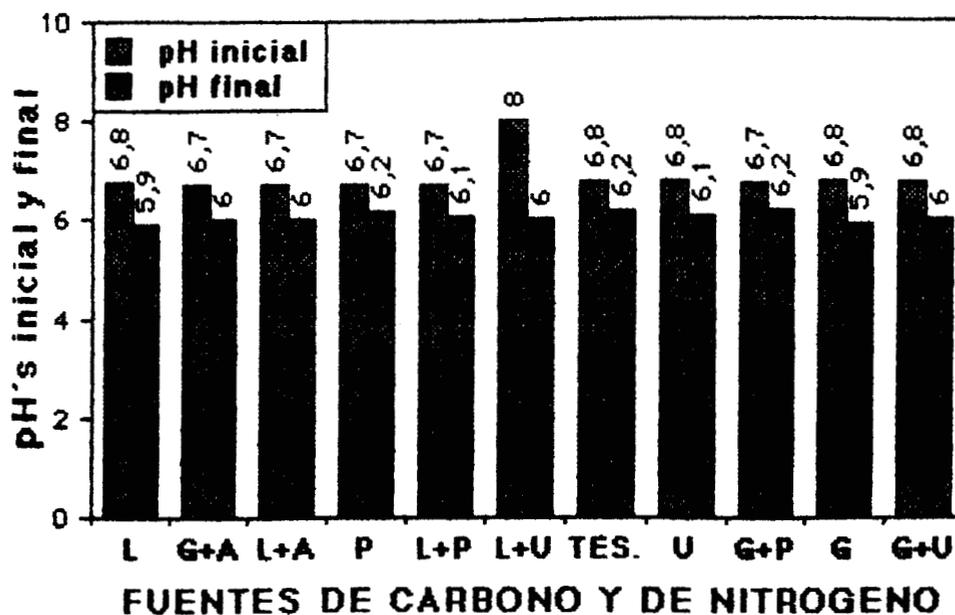
Al aumentar la densidad de empaque del medio de fermentación la producción de proteasas ácidas disminuye rápidamente hasta una diferencia de 14.9 unidades, esto probablemente es debido a que la compactación del medio de cultivo dificulta el suministro de oxígeno y la eliminación del calor metabólico generado por el hongo.

#### a.4) Efecto de la adición de inductores en el medio de fermentación.

Se adicionaron nutrientes al medio de fermentación para saber si la combinación de salvado-soya aportaba los necesarios, para el rendimiento óptimo en cuanto a producción de proteasas ácidas se refiere.

##### a.4.1) Adición de fuentes de carbono y nitrógeno.

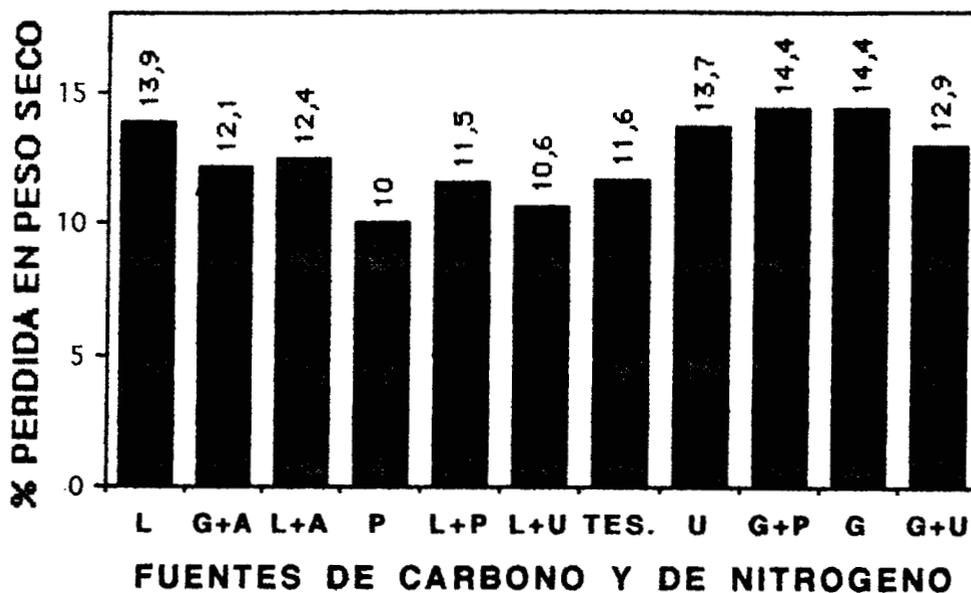
Se adicionó al medio de cultivo lactosa y glucosa como fuentes de carbono al 4% y cloruro de amonio, urea y peptona como fuentes de nitrógeno en una proporción tal que la relación carbono/nitrógeno (C/N) fuera igual a 10. En ambos casos se experimentaron como componentes puros y en combinaciones a un pH y una humedad promedio iniciales de 6.9 y 51.9% respectivamente, a  $33^\circ\text{C}$ , un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula promedio de 1.455 y 0.47 mm para salvado (60%) y soya (40%) respectivamente y un tamaño de inóculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de SIS durante 36 horas de fermentación. Los resultados se muestran a continuación en las gráficas No.33-36.



Gráfica No.33. Efecto de fuentes de carbono y nitrógeno sobre el pH final.

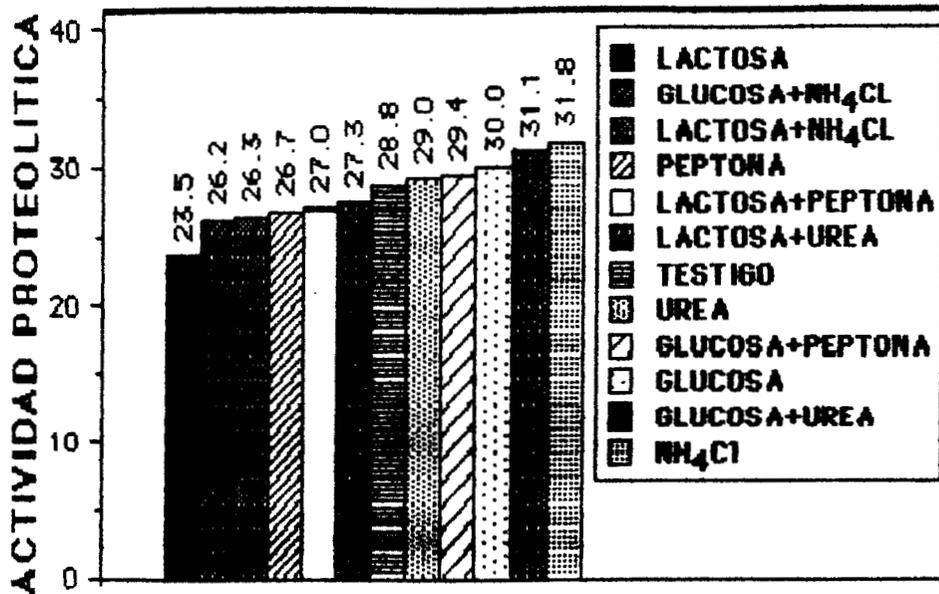
Nomenclatura: L-lactosa, G-glucosa, A-cloruro de amonio, P-peptona, U-urea y TES-testigo.

En general todos los componentes mantienen el pH final del medio de fermentación en un valor promedio de 6.1.



Gráfica No.34. Efecto de fuentes de carbono y nitrógeno sobre el porcentaje de pérdida en peso seco.

Nomenclatura: L-lactosa, G-glucosa, A-cloruro de amonio, P-peptona, U-urea y TES-testigo.



Gráfica No.36. Efecto de la adición de fuentes de carbono y nitrógeno al medio de fermentación para la producción de proteasas ácidas.

Los datos se comparan con respecto al testigo obteniendo lo siguiente:

a) Lactosa	X= 23.51	s=0.55	F=57.29 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51
b) Glucosa + NH <sub>4</sub> Cl	X= 26.20	s=3.03	F= 1.37 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
c) Lactosa + NH <sub>4</sub> Cl	X= 26.27	s=1.25	F= 5.74 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
d) Peptona	X= 26.20	s=3.03	F= 1.37 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
e) Lactosa + Peptona	X= 26.96	s=1.80	F= 1.74 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
f) Lactosa + Urea	X= 27.33	s=0.50	F= 4.70 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
g) Testigo	X= 28.80	s=0.82	(testigo)
h) Urea	X= 29.03	s=2.01	F= 0.02 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
i) Glucosa + Peptona	X= 29.36	s=1.72	F= 0.17 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
j) Glucosa	X= 30.02	s=0.46	F= 3.34 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
k) Glucosa + Urea	X= 31.13	s=0.88	F= 7.44 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
l) Cloruro de amonio	X= 31.78	s=0.76	F=14.14 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51

**Nomenclatura:** X-media, s-desviación estándar y F, F<sub>x</sub> y z-factores estadísticos.

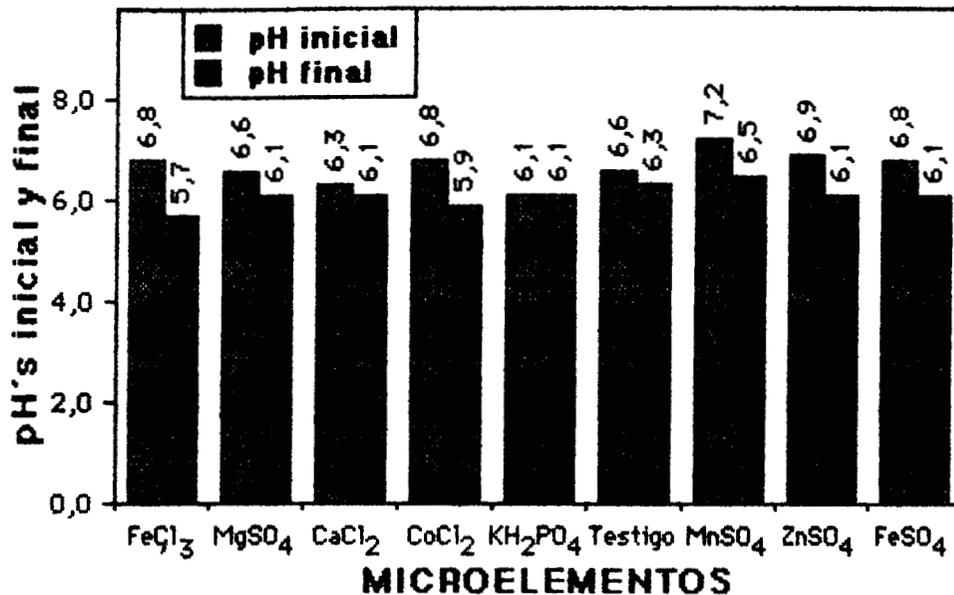
Por los factores estadísticos se observa que los datos cuyas medias son mayores que la del testigo no presentan una diferencia significativa, lo que sugiere que el medio por sí solo contiene las fuentes de carbono y de nitrógeno suficientes para los requerimientos metabólicos del hongo.

Conforme aumenta la pérdida en peso seco la producción de proteasas ácidas aumenta, con excepción del medio que contiene lactosa.

Debido a que el cloruro de amonio fué el componente que presentó la diferencia mayor se utilizó en los experimentos posteriores.

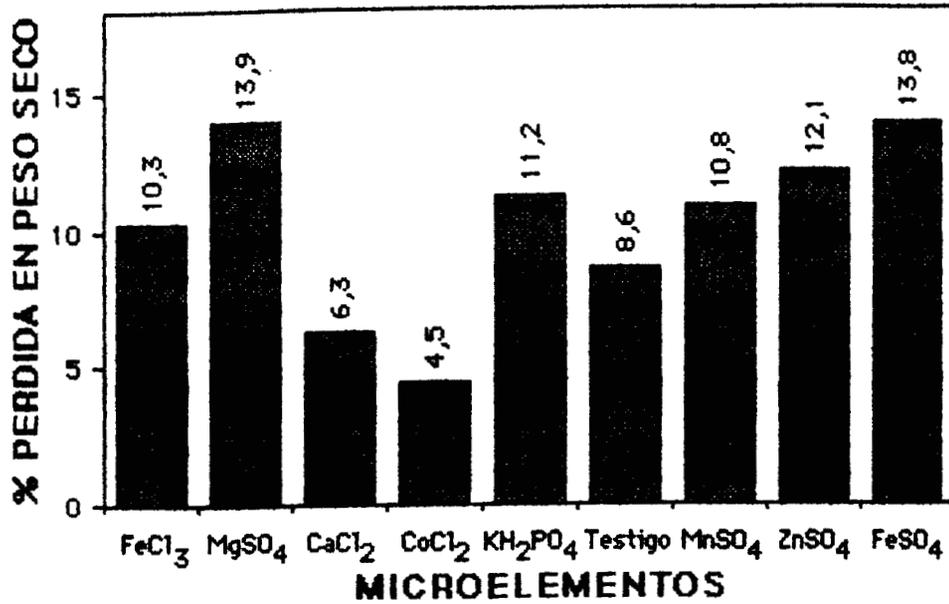
## a.4.2) Adición de microelementos.

Se adicionaron los microelementos más comunes utilizados en la fermentación como son fósforo (80 mg/g M. S. de  $\text{KH}_2\text{SO}_4$ ), magnesio (12 mg/g M. S. de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), manganeso (0.05 mg/g M. S. de  $\text{MnSO}_4$ ), fierro (0.384 mg/g M. S. de  $\text{FeCl}_3$  y 0.2 mg/g M. S. de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), zinc (0.05 mg/g M. S. de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), calcio (0.05 mg/g M. S. de  $\text{CaCl}_2$ ) y cobalto (0.08 mg/g M. S. de  $\text{CoCl}_2$ ) (Raimbault, 1980; Deschamps y Huet, 1984; Levonen, 1985; Chahal, 1985), a un pH y una humedad promedio de 6.7 y 47.3% respectivamente, a 33°C, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula promedio de 1.455 y 0.47 mm para salvado (60%) y soya (40%) respectivamente y un tamaño de inóculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de SIS durante 36 horas de fermentación. Los resultados se dan en las gráficas No.37-40.



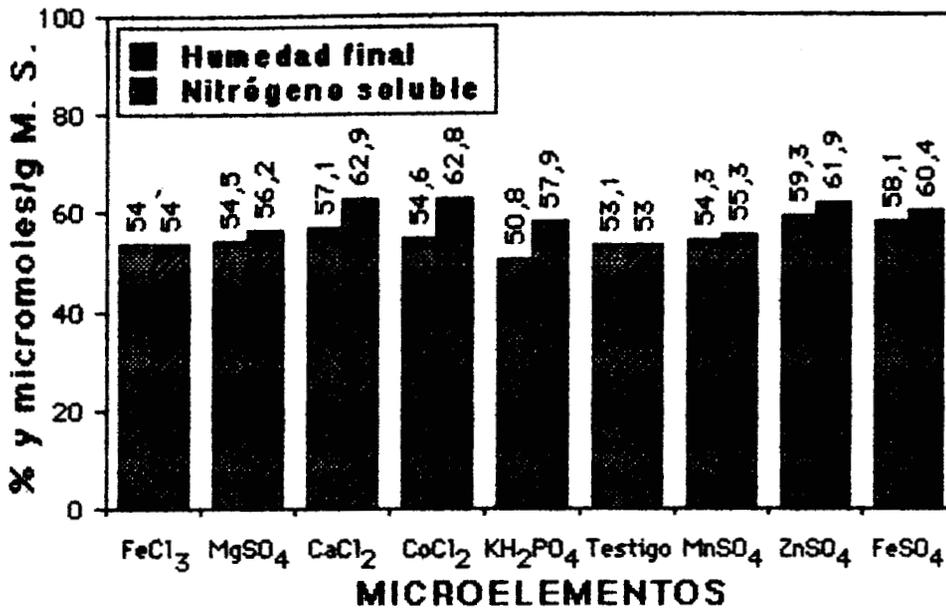
Gráfica No. 37. Efecto sobre el pH final de la adición de microelementos al medio de fermentación.

El pH final del medio de fermentación se mantuvo en un promedio de 6.16 para todos los componentes con excepción de los cloruros férrico y de cobalto que tienen valores de 5.70 y 5.86 respectivamente.



Gráfica No. 38. Efecto sobre el porcentaje de pérdida en peso seco de la adición de microelementos al medio de fermentación.

Los componentes que tuvieron los valores más altos de la pérdida en peso seco fueron los sulfatos de zinc, ferroso y de magnesio con 12.14, 13.84 y 13.91% respectivamente.

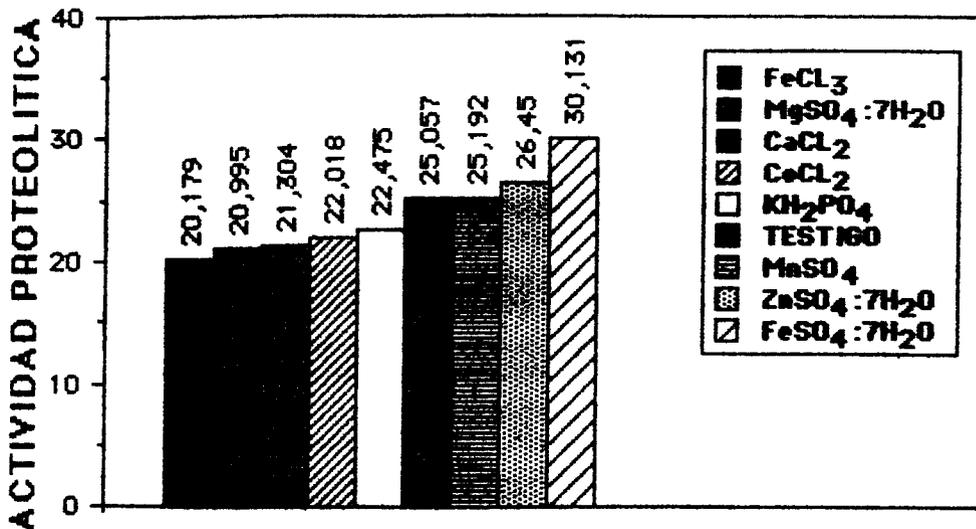


Gráfica No. 39. Efecto de la adición de microelementos al medio de fermentación sobre la humedad final y el nitrógeno soluble..

La humedad final se mantiene en un promedio de 54.07% con excepción de los sulfatos ferroso y de zinc con valores de 58.1 y 59.3% respectivamente. El nitrógeno

soluble ( $\mu$  moles de tirosina/g M.S) tiene sus valores mayores con los sulfatos ferroso y de zinc y con los cloruros de calcio y de cobalto.

La actividad proteolítica en  $\mu$  moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No.40. Efecto de la adición de microelementos al medio de fermentación para la producción de proteasas ácidas.

Los datos se comparan con respecto al testigo obteniendo lo siguiente:

a) FeCl <sub>3</sub>	X= 20.18	s=1.97	F=11.90 > F <sub>1 4 05</sub> =7.71
b) MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X= 21.00	s=1.87	F=8.80 > F <sub>1 4 05</sub> =7.71
c) CaCl <sub>2</sub>	X= 21.31	s=3.01	F=3.83 < F <sub>1 3 05</sub> =10.13
d) CoCl <sub>2</sub>	X= 22.02	s=1.88	F=4.91 < F <sub>1 4 05</sub> =7.71
e) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X= 22.48	s=1.73	F=3,93 < F <sub>1 4 05</sub> =7.71
f) Testigo	X= 25.06	s=1.45	(testigo)
g) MnSO <sub>4</sub>	X= 25.19	s=1.46	F=0.01 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
h) ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X= 26.45	s=0.56	F=2.41 < F <sub>1 4 05</sub> =7.71
i) FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X= 30.13	s=1.28	F=20.62 > F <sub>1 4 05</sub> =7.71

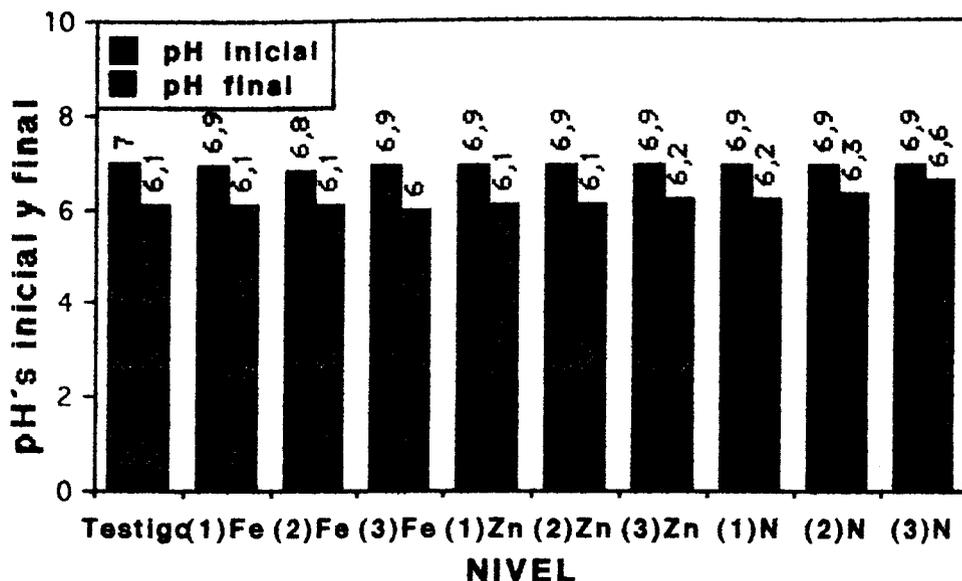
Nomenclatura: X-media, s-desviación estándar y F, F<sub>x</sub> y z-factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se observa que en los medios cuyas medias son mayores que el testigo sólo el sulfato ferroso presenta diferencia significativa, ésto es debido a que el hierro es un componente estructural de las enzimas al igual que el zinc, por lo que éste se utilizó en los experimentos posteriores.

Los medios que tuvieron los valores de humedad final y de pérdida de peso seco más altos, son los que mayor producción de proteasas ácidas presentaron con excepción del cloruro de calcio y del sulfato de magnesio.

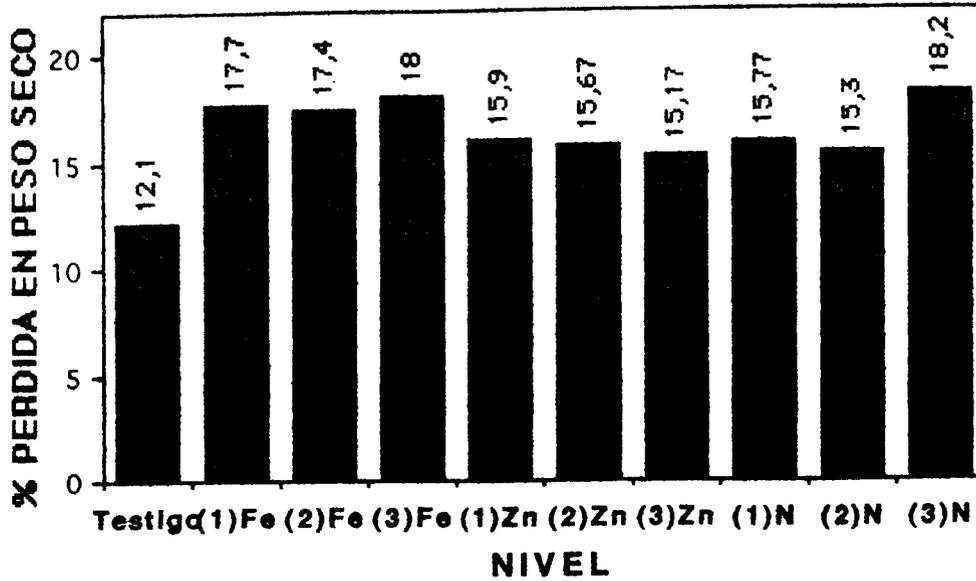
## a.4.3) Niveles de cloruro de amonio y sulfatos de fierro y de zinc.

Se modificaron las cantidades adicionadas a la mitad y al doble de las cantidades de cloruro de amonio (2.92 y 11.68 mg/g M.S.) y de sulfatos de fierro (0.1 y 0.4 mg/g M.S.) y de zinc (0.025 y 0.1 mg/g M.S.) utilizadas en las fermentaciones a.4.1 y a.4.2 respectivamente, ésto se realizó en dos diferentes niveles a un pH y una humedad promedio de 6.9 y 51.9% respectivamente, a 33°C, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula promedio de 1.455 y 0.47 mm para salvado (60%) y soya (40%) respectivamente y un tamaño de inculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de SIS durante 36 horas de fermentación. Los resultados se muestran en las gráfica No.41-44.



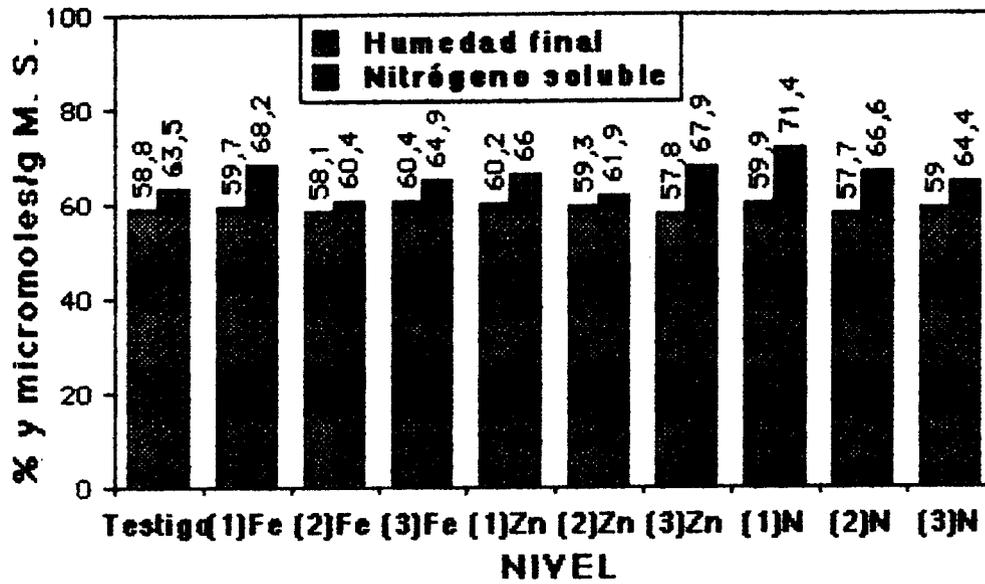
Gráfica No.41. Efecto de la adición de nitrógeno como fuente de nitrógeno y de microelementos de fierro y de zinc sobre los pH's finales.

Se observó que el pH final del medio de fermentación se mantuvo en un valor promedio de 6.1 a excepción del nivel 2 de cloruro de amonio que fue de 6.6.



Gráfica No.42. Efecto de la adición de nitrógeno como fuente de nitrógeno y de microelementos de hierro y de zinc sobre el porcentaje de pérdida en peso seco.

Los valores más altos de la pérdida en peso seco fueron los niveles 1 y 2 de sulfato ferroso y el nivel 2 del cloruro de amonio con valores de 17.7, 18 y 18.2% respectivamente.

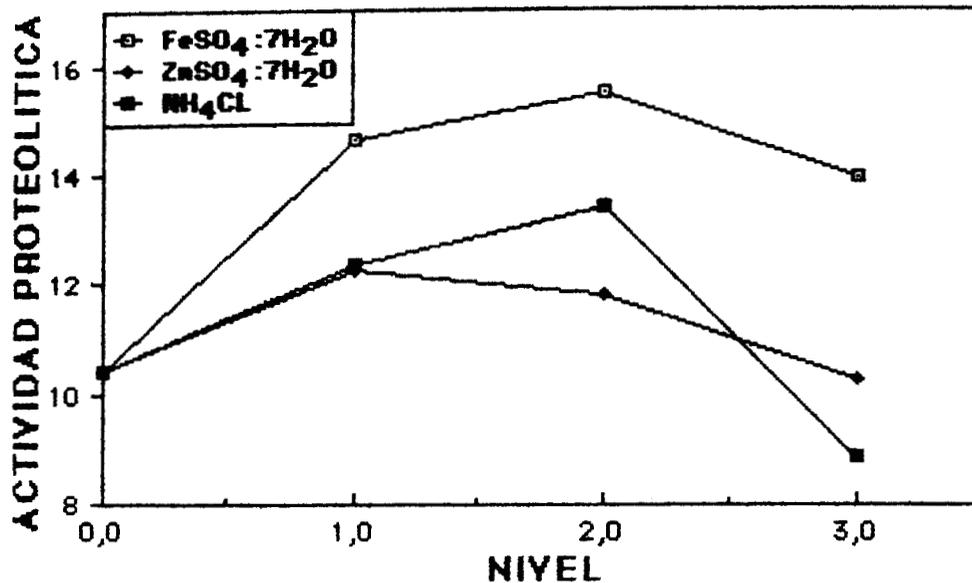


Gráfica No.43. Efecto de la adición de nitrógeno como fuente de nitrógeno y de microelementos de hierro y de zinc sobre la humedad final y el nitrógeno soluble.

La humedad final se mantuvo en un valor promedio de 59.6% y el nitrógeno soluble

( $\mu$  moles de tirosina/g M.S.) en 65.8 a excepción del nivel 1 de cloruro de amonio cuyo valor fue de 71.44 unidades.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No.44. Efecto de la adición de cloruro de amonio y microelementos de hierro y zinc al medio de fermentación para la producción de proteasas ácidas.

Los datos se comparan con respecto al testigo obteniendo lo siguiente:

a) (1) NH <sub>4</sub> Cl	X= 12.36	s=1.04	F= 5.46 < F <sub>1,405</sub> =7.71
b) (2) NH <sub>4</sub> Cl	X= 8.87	s=0.73	F= 4.75 < F <sub>1,405</sub> =7.71
c) (1) ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X= 12.26	s=1.15	F= 4.42 < F <sub>1,305</sub> =10.13
d) (2) ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X= 10.26	s=0.70	F= 0.05 < F <sub>1,405</sub> =7.71
e) (1) FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X= 14.62	s=2.11	F= 9.71 < F <sub>1,405</sub> =7.71
f) (2) FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X= 13.98	s=0.09	F=38.21 > F <sub>1,405</sub> =7.71
g) Testigo	X= 10.42	s=0.99	(testigo)

Nomenclatura: X-media, s-desviación estándar y F, F<sub>x</sub> y z-factores estadísticos.

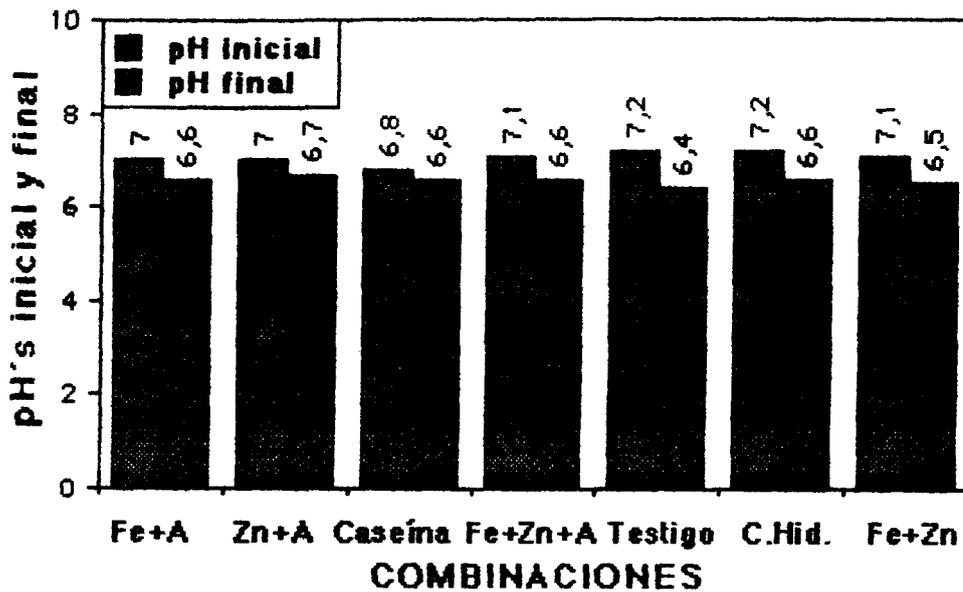
Por los factores estadísticos se observa que sólo el nivel 2 de sulfato ferroso presenta diferencia significativa, aunque también se consideró el sulfato de zinc en el nivel 1 por ser éste elemento un componente estructural de las enzimas al igual que el hierro.

Los valores más altos de la producción de proteasas ácidas se obtuvieron con los medios que presentaron la mayor pérdida en peso seco, por lo que también el nivel 1 de cloruro de amonio se eligió para los experimentos posteriores.

Nota. Los valores bajos de actividad proteolítica pudieron ser debidos a problemas de altas densidades de empaque.

a.4.4) Adición de caseína entera e hidrolizada y combinaciones de cloruro de amonio con sulfatos de fierro y de zinc.

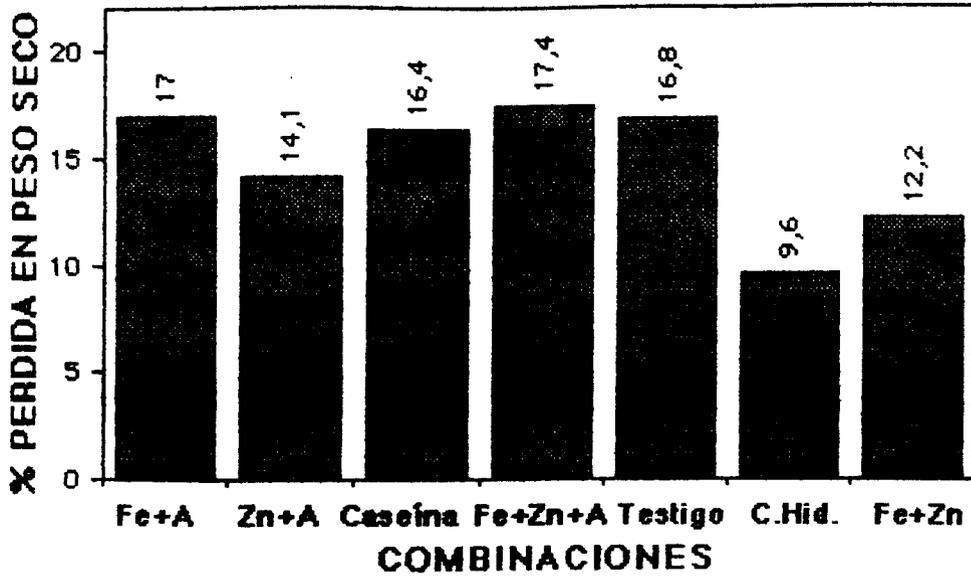
Se probó la combinación de la fuente de nitrógeno con los microelementos mencionados arriba y de éstos entre sí en forma independiente, lo anterior se realizó con los niveles óptimos de la fermentación a.4.3 (2.92 mg/g M. S. de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.025 mg/g M. S. de  $\text{ZnSO}_4$  y 0.4 mg/g M. S. de  $\text{FeSO}_4$ ) haciendo las combinaciones en todas sus posibilidades. Por otra parte se observó el efecto al adicionar caseína entera e hidrolizada, los experimentos se realizaron a un pH y una humedad promedio de 7.1 y 51.9% respectivamente, a 33°C, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula promedio de 1.455 y 0.47 mm para salvado (60%) y soya (40%) respectivamente y un tamaño de inoculo de  $2 \times 10^8$  esp/10 g de SIS durante 36 horas de fermentación. Los resultados se dan en las gráficas No.45-48.



Gráfica No.45. Efecto de combinaciones de nitrógeno, fierro y zinc adicionadas al medio de fermentación sobre los pH's.

Nomenclatura: Fe-sulfato ferroso, A-cloruro de amonio, Zn-sulfato de zinc, C.Hid.-caseína hidrolizada

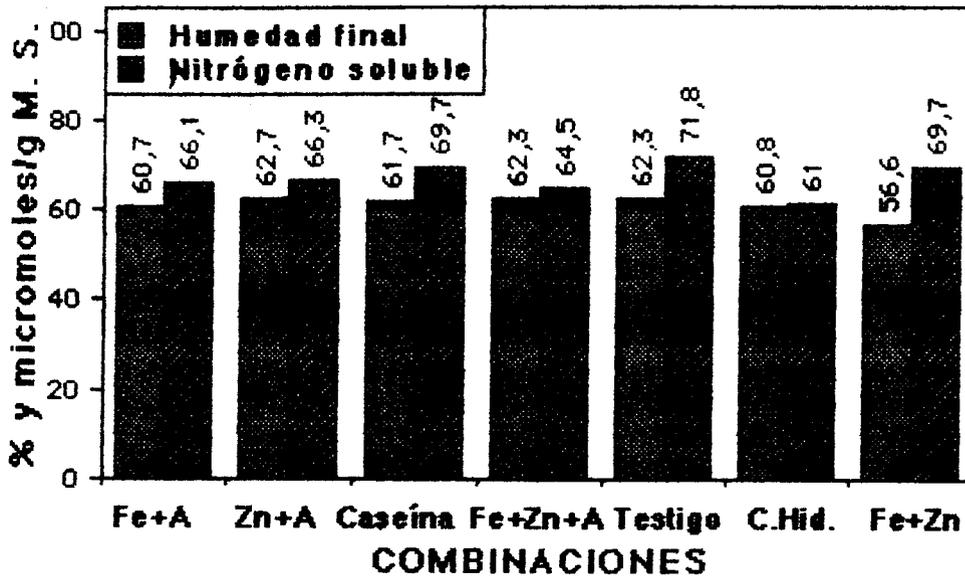
El pH final del medio de fermentación se mantuvo en un valor promedio de 6.6 para todos los componentes.



Gráfica No.46. Efecto de combinaciones de nitrógeno, fierro y zinc adicionadas al medio de fermentación sobre el porcentaje de pérdida en peso seco.

Nomenclatura: Fe-sulfato ferroso, A-cloruro de amonio, Zn-sulfato de zinc, C.Hid.-caseína hidrolizada

Los valores más altos de la pérdida en peso seco se obtuvieron con el testigo (16.8%), la caseína entera (16.4) y con la combinaciones de fierro + cloruro de amonio (17%) y fierro + zinc + cloruro de amonio (17.4%).

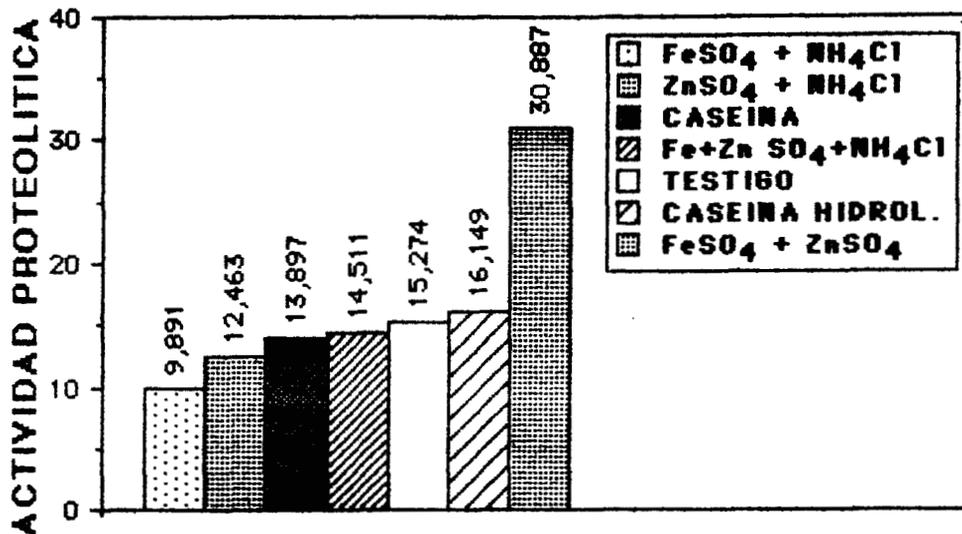


Gráfica No.47. Efecto de combinaciones de nitrógeno, fierro y zinc adicionadas al medio de fermentación sobre la humedad final y el nitrógeno soluble.

Nomenclatura: Fe-sulfato ferroso, A-cloruro de amonio, Zn-sulfato de zinc,  
C.Hid.-caseína hidrolizada

La humedad final se mantuvo en un valor promedio de 61.7% a excepción de la combinación de hierro + zinc (56.6%), el nitrógeno soluble (m moles de tirosina/g M.S.) en 61.1 unidades para la caseína hidrolizada, 65.6 unidades para las combinaciones con cloruro de amonio y 70.4 unidades para la caseína entera, el testigo y la combinación de hierro + zinc.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No.48. Efecto de combinaciones de nitrógeno, hierro y zinc adicionadas al medio de fermentación para la producción de proteasas ácidas.

Los datos se comparan con respecto al testigo obteniendo lo siguiente:

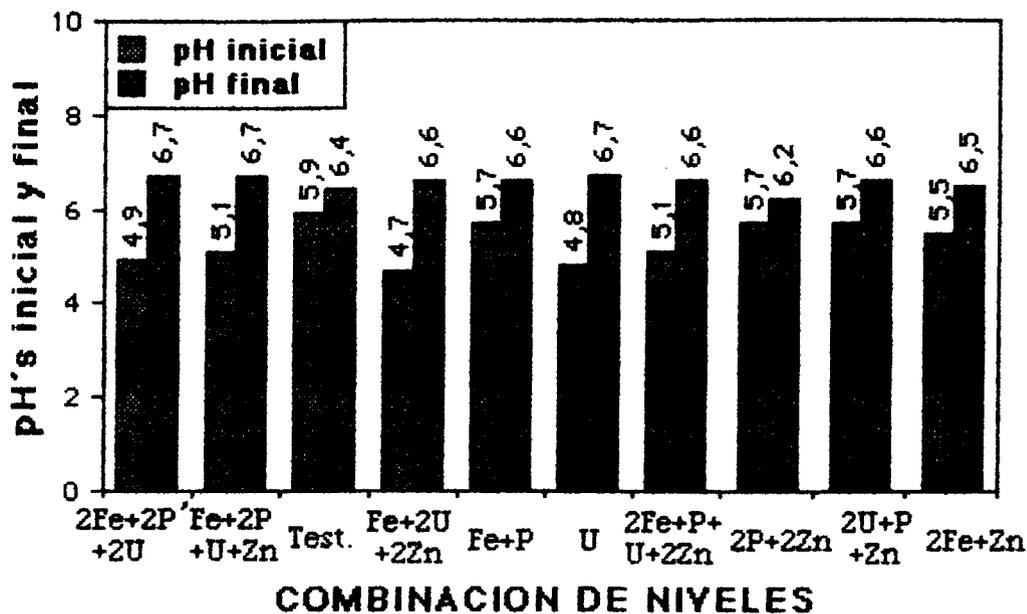
a) FeSO <sub>4</sub> +NH <sub>4</sub> Cl	X= 9,90	s=3.59	F= 3.82 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
b) ZnSO <sub>4</sub> +NH <sub>4</sub> Cl	X= 12.46	s=1.20	F= 4.22 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
c) Caseína entera	X= 13.90	s=0.39	F= 1.55 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
d) FeSO <sub>4</sub> +ZnSO <sub>4</sub> +NH <sub>4</sub> Cl	X= 14.52	s=1.97	F= 0.19 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
e) Testigo	X= 15.28	s=1.52	(testigo)
f) Caseína hidrolizada	X= 16.15	s=1.36	F= 0.37 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
g) FeSO <sub>4</sub> +ZnSO <sub>4</sub>	X= 30.89	s=1.70	F=93.94 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51

Nomenclatura: X-media, s-desviación estándar y F, F<sub>x</sub> y z-factores estadísticos.

Por los factores estadísticos se observó que la mejor combinación fue la de hierro + zinc teniendo una diferencia significativa notable.

#### a.4.5) Niveles de combinaciones de algunas fuentes de nitrógeno con microelementos de fierro y de zinc en forma de sulfatos.

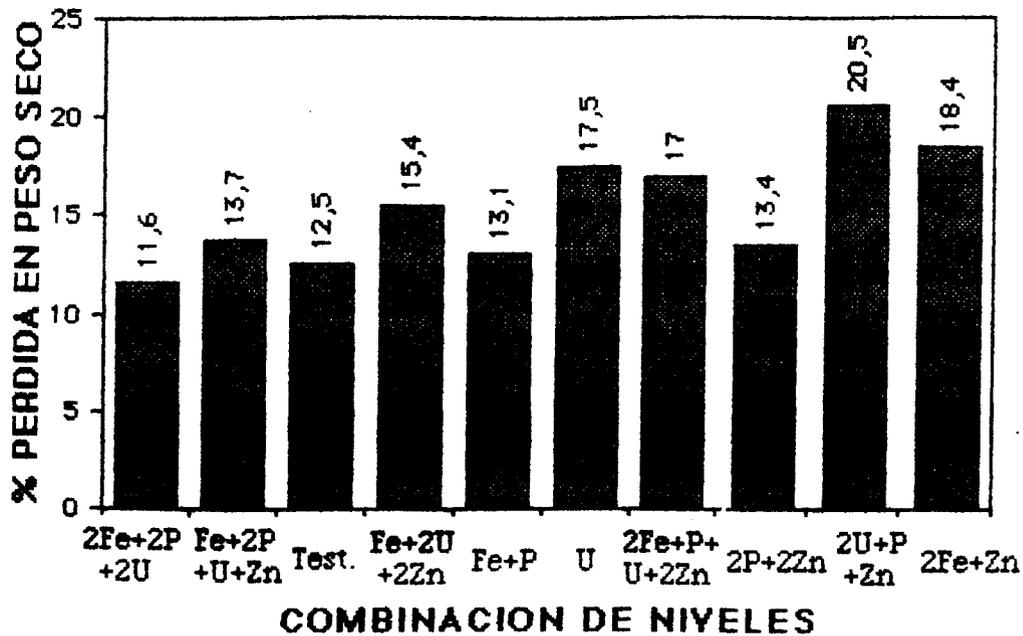
Se realizó un diseño de experimentos con los compuestos que se mencionan arriba en tres diferentes niveles, (0) para el nivel cero (el componente no se adicionó), (1) para el nivel uno (0.025 mg de  $ZnSO_4/g$  M. S., 0.1 mg de  $FeSO_4/g$  M. S., 1.64 mg de Urea/ $g$  M. S., 9.55 mg de peptona/ $g$  M. S.) y (2) para el nivel dos (0.1 mg de  $ZnSO_4/g$  M. S., 0.4 mg de  $FeSO_4/g$  M. S., 6.56 mg de Urea/ $g$  M. S., 38.2 mg de peptona/ $g$  M. S.), a un pH y una humedad promedio de 5.3 y 50.6% respectivamente, a 33°C, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula promedio de 1.455 y 0.47 mm para salvado (60%) y soya (40%) respectivamente y un tamaño de inoculo de  $2 \cdot 10^8$  esp/10 g de SIS durante 36 horas de fermentación. Los resultados se dan a continuación en las gráficas No.49-52.



**Gráfica No.49.** Efecto de la combinación de niveles de nitrógeno, fierro y zinc adicionadas al medio de fermentación sobre los pH's.

**Nomenclatura:** Fe-sulfato ferroso, P-peptona, Zn-sulfato de zinc, U-urea y Test.-testigo.

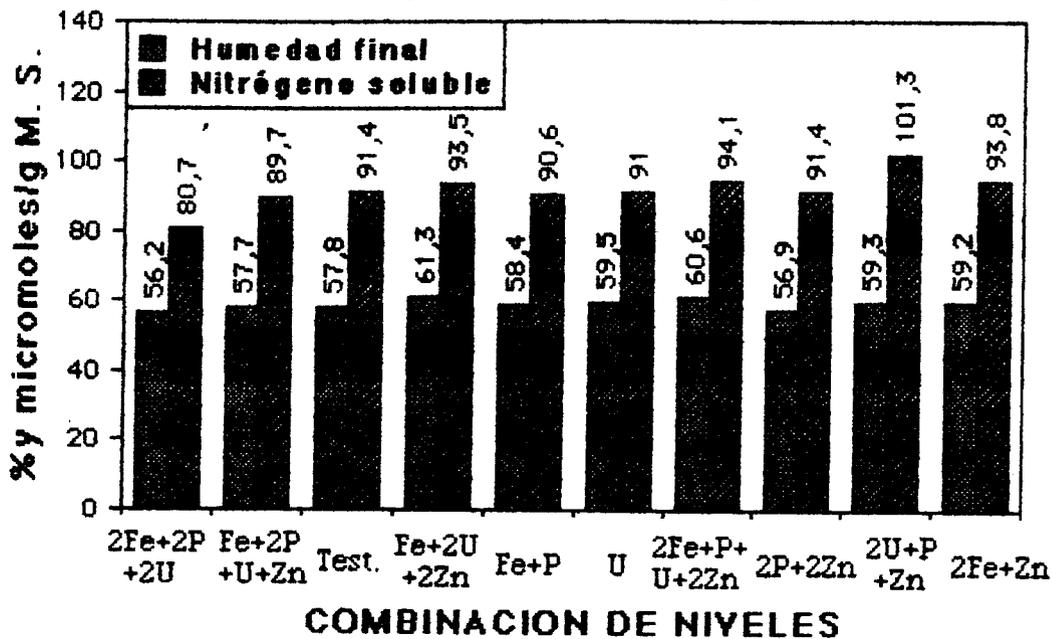
El pH final del medio de fermentación se mantuvo en un valor promedio de 6.6 a excepción de la combinación de (2) de peptona + (2) de zinc que fue 6.2.



**Gráfica No.50.** Efecto de la combinación de niveles de nitrógeno, fierro y zinc adicionadas al medio de fermentación sobre el porciento de pérdida en peso seco.

**Nomenclatura:** Fe-sulfato ferroso, P-peptona, Zn-sulfato de zinc, U-urea y Test.-testigo.

Los valores más altos de la pérdida en peso seco se obtuvieron con las combinaciones de (2) de fierro + (1) de peptona + (1) de urea + (2) de zinc (17%), (1) de urea (17.5%), (2) de fierro + (1) de zinc (18.4%) y (2) de urea + (1) de peptona + (1) de zinc (20.5%).

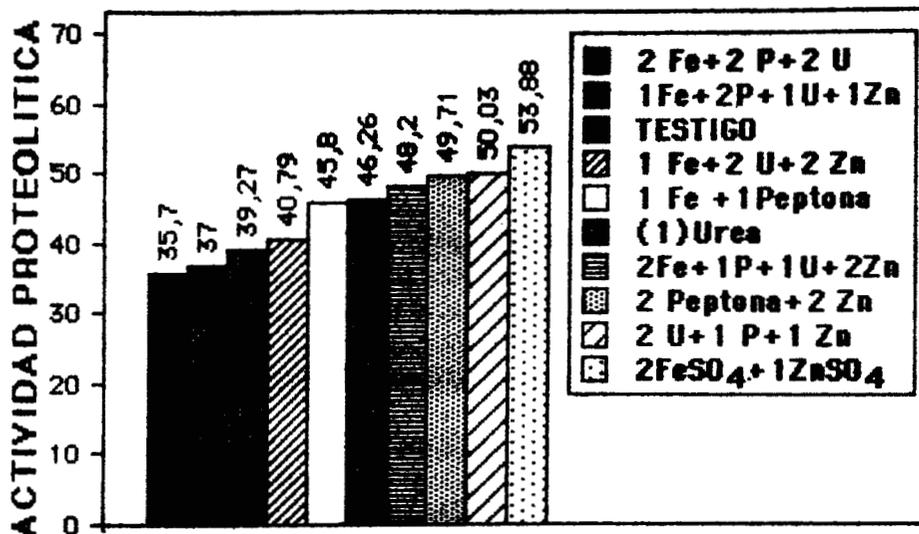


**Gráfica No.51.** Efecto de la combinación de niveles de nitrógeno, fierro y zinc adicionadas al medio de fermentación sobre la humedad final y el nitrógeno soluble.

**Nomenclatura:** Fe-sulfato ferroso, P-peptona, Z n-sulfato de zinc, U-urea y Test.-testigo.

La humedad final se mantuvo en un valor promedio de 58.7% y el nitrógeno soluble (m moles de tirosina/g M.S.) en 80.7 unidades para la combinación de (2) de hierro + (2)peptona + (2) de urea y de 91.9 unidades para las demás combinaciones a excepción de la de (2) de urea + (1) de peptona + (1) de zinc que fue de 101.3 unidades.

La actividad proteolítica en m moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No.52. Efecto de combinaciones de nitrógeno, hierro y zinc al medio de fermentación en tres niveles para la producción de proteasas ácidas

Los datos se comparan con respecto al testigo obteniendo lo siguiente:

a) (2)FeSO <sub>4</sub> +(2)Peptona+(2)Urea	X= 35.70	s=2.69	F= 2.79 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
b) (1)FeSO <sub>4</sub> +(2)Peptona+(1)Urea+(1)ZnSO <sub>4</sub>	X= 37.01	s=2.88	F= 1.01 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
c) Testigo	X= 39.27	s=1.39	(testigo)
d) (1)FeSO <sub>4</sub> +(2)Urea+(2)ZnSO <sub>4</sub>	X= 40.79	s=3.75	F= 0.29 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
e) (1)FeSO <sub>4</sub> +(1)Peptona	X= 45.80	s=2.17	F=12.84 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
f) (1)Urea	X= 46.26	s=4.24	F= 4.41 < F <sub>1 2 05</sub> =18.51
g) (2)FeSO <sub>4</sub> +(1)Peptona+(1)Urea+(2)ZnSO <sub>4</sub>	X= 48.20	s=0.21	F=81.13 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51
h) (2)Peptona+(2)ZnSO <sub>4</sub>	X= 49.71	s=1.58	F=49.21 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51
i) (2)Urea+(1)Peptona+(1)ZnSO <sub>4</sub>	X= 50.03	s=0.74	F=93.58 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51
j) (2)FeSO <sub>4</sub> +(1)ZnSO <sub>4</sub>	X= 53.88	s=2.95	F=40.19 > F <sub>1 2 05</sub> =18.51

**Nomenclatura:** X-media, s-desviación estándar y F, F<sub>x</sub> y z-factores estadísticos.

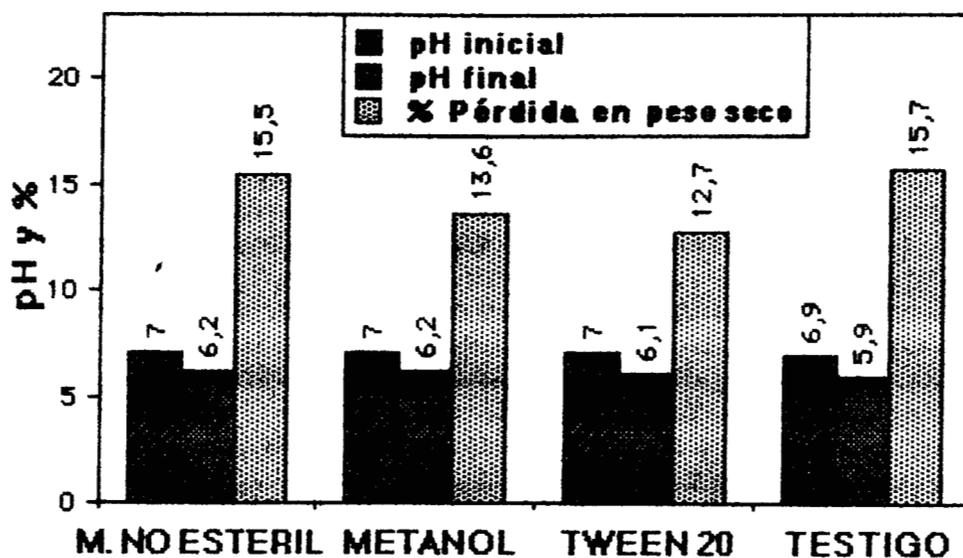
Por los factores estadísticos y la media más alta se observa que la mejor combinación

fué con el nivel (1) y (2) para zinc y fierro respectivamente, la cual se utilizó para las cinéticas de crecimiento posteriores.

Las mayores producciones de proteasas ácidas se obtuvieron con las combinaciones que presentaron los valores más altos de la pérdida en peso seco, (1) de urea (46.3 unidades), (2) de fierro + (1) de peptona + (1) de urea + (2) de zinc (48.2 unidades), (2) de urea + (1) de peptona + (1) de zinc (50 unidades) y (2) de fierro + (1) de zinc (53.9 unidades) a excepción de la combinación de (2) de peptona + (2) de zinc que tuvo una pérdida en peso seco baja en relación con los demás experimentos (13.4%) obteniendo 49.7 unidades de actividad proteolítica.

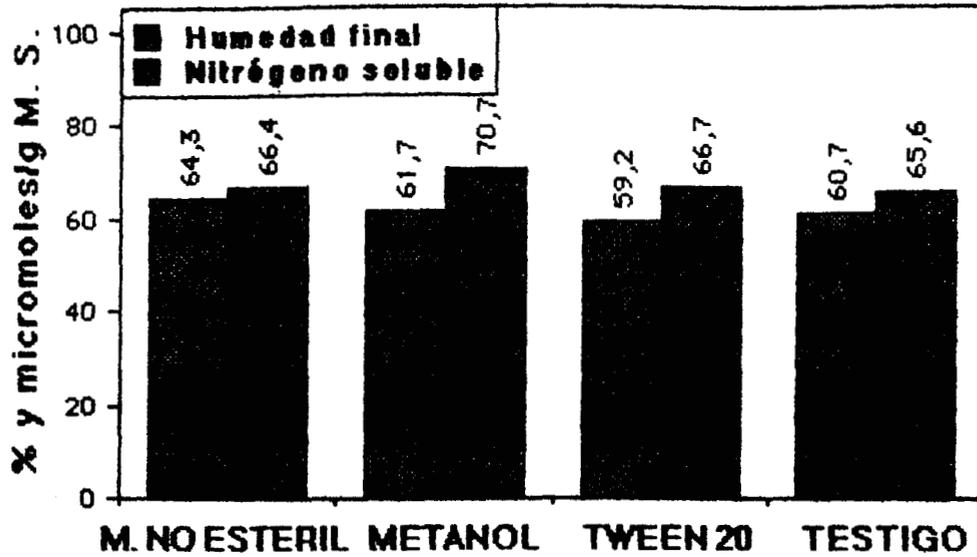
#### a.5) Efecto de sustancias que inducen la permeabilidad de la membrana celular.

Se adicionaron sustancias al medio de cultivo que facilitaran la excreción de las enzimas a través de la membrana celular de los hongos, las sustancias probadas fueron metanol y tween 20 al 1% y al 0.1% en fase líquida respectivamente. Además se realizó un experimento con medio de cultivo no estéril para observar su efecto; se utilizó un pH y una humedad promedio de 7.0 y 51.9% respectivamente, a 33°C, un flujo de aire de 0.0133 VGM, un tamaño de partícula promedio de 1.455 y 0.47 mm para salvado (60%) y soya (40%) respectivamente, y un tamaño de inóculo de  $2 \times 10^8$  esp/10 g de SIS durante 36 horas de fermentación. Los resultados se muestran en las gráficas No. 53-55.



Gráfica No.53. Efecto de la adición de sustancias que inducen la permeabilidad de la membrana celular sobre el pH final y sobre el porcentaje de pérdida en peso seco.

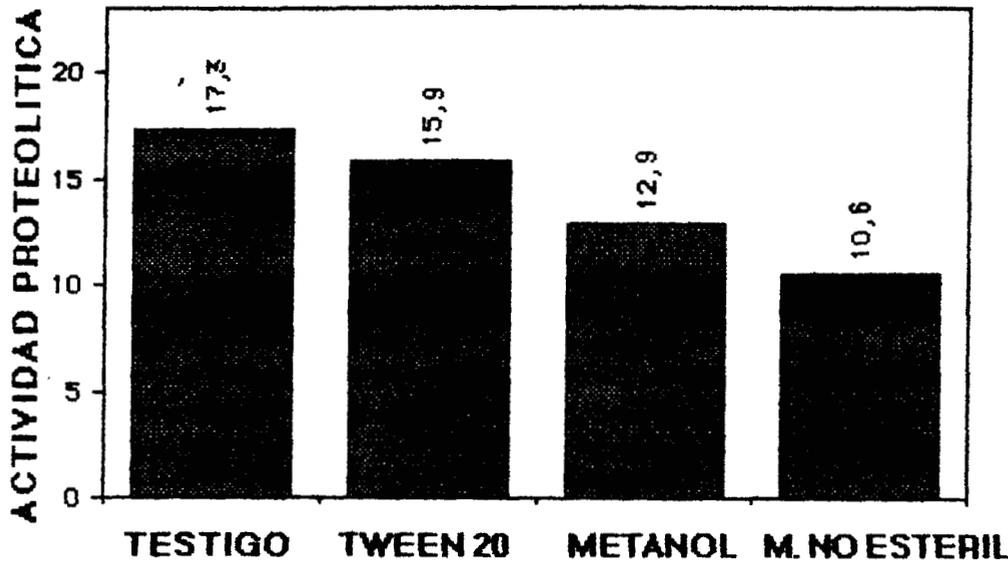
El pH final del medio de fermentación se mantuvo en un valor promedio de 6.1 a excepción del medio no estéril que fue de 5.6. Los valores más altos de la pérdida en peso seco se obtuvieron con el testigo y con el medio no estéril con un valor promedio de 15.6%.



Gráfica No.54. Efecto de la adición de sustancias que inducen la permeabilidad de la membrana celular sobre la humedad final y sobre el nitrógeno soluble.

La humedad final del medio de fermentación se mantuvo en un valor promedio de 60.5% a excepción del medio no estéril que fue de 64.3, el nitrógeno soluble se mantuvo en 66.2 unidades en promedio a excepción del medio que contiene metanol que fue de 70.7 unidades.

La actividad proteolítica en  $\mu$  moles de tirosina/g M.S.-min tiene el siguiente comportamiento:



Gráfica No.55. Efecto de la adición de sustancias que inducen la permeabilidad de la membrana de la membrana celular para la excreción de proteasas ácidas.

Los datos se comparan con respecto al testigo obteniendo lo siguiente:

a) Medio no estéril	X= 9,90	s=3.59	F= 3.82 > $F_{1,405}=7.71$
b) Metanol	X= 12.86	s=1.37	F=14.11 > $F_{1,405}=7.71$
c) Tween 20	X= 15.88	s=1.69	F= 1.20 < $F_{1,405}=7.71$
e) Testigo	X= 17.32	s=1.53	(testigo)

Por los factores estadísticos se observó que ninguno de los inductores de la permeabilidad de la membrana dieron resultados satisfactorios, teniendo medias más bajas que el testigo. También se observó que el medio no estéril disminuyó el rendimiento de la producción de proteasas ácidas probablemente por tener un sistema de varios microorganismos.

#### Discusión general.

Las condiciones óptimas obtenidas para la producción de proteasas ácidas consistieron de una combinación de 60% de salvado de trigo y 40% de soya al 50% de humedad inicial, con un flujo de aire de 0.0133 VGM, una temperatura de 33°C, un pH de 5.5, un tamaño de partícula de 1.455 mm para el salvado y 0.47 mm para la soya, un tamaño de inóculo de  $2 \cdot 10^8$  esporas por 10 gramos de sustrato inicial seco, una densidad de empaque de  $0.27 \text{ g cm}^3$  y la adición de 0.4 y 0.025 mg de sulfatos ferroso y de zinc por gramo de materia seca respectivamente.

1. En otros sistemas para la producción enzimática se tiene lo siguiente:

a) Narahara y col. (1982) obtuvieron proteasas y amilasas con arroz como medio de cultivo a humedades iniciales del 35% o menos, un tamaño de inóculo de  $5 \cdot 10^7$  esp/ml, fermentado con el hongo *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* W03 durante 72 hr y a 30°C.

b) Deschamps y Huej (1984) obtuvieron  $\beta$ -glucosidasa con materiales agrícolas como sustrato, a 30°C, con un flujo de aire de 0.0133-0.0167 VGM, a una humedad inicial del 70%, un inóculo de  $10^7$  esp/g de sustrato durante 4 días con el hongo *Aspergillus phoenicis*.

c) Deschamps (1985) obtuvo celulasas con 80% de bagazo de trigo y 20% de trigo como sustrato al 74% de humedad inicial, a un pH de 5.8, con un flujo de aire de 0.0233 VGM, a 30°C, con un tamaño de inóculo de  $3 \cdot 10^7$  esp/ml, un tamaño de partícula de 0.5 mm durante 66hr de fermentación con el hongo *Trichoderma harzianum*.

No coinciden las humedades iniciales utilizadas en otros sistemas para la producción de enzimas con la obtenida en este trabajo, pues se utilizaron valores del 35% o menos y del 70% o más, tamaños de inóculo de 10 órdenes de magnitud menores, tiempos de fermentación del doble y un tamaño de partícula tres veces mayor, lo anterior disminuiría los rendimientos de las proteasas ácidas si se acoplaran estas condiciones a nuestro sistema experimental.

Sólamente los flujos de aire y la temperatura de fermentación reportados en otros sistemas son los que se podrían utilizar para la producción de proteasas ácidas

2. Con respecto al crecimiento en otros sistemas se tiene lo siguiente:

a) Abdullah y col. (1985) utilizaron trigo como medio de cultivo tamizado en malla No. 20, con un tamaño de inóculo del 2% en base seca, a 37 °C, a un flujo de aire de 0.002 VGM, durante tres días de fermentación en un fermentador empacado de plástico de 16 cm de diámetro con el hongo *Chaetomium celluloliticum*.

b) Narahara y col. (1982) utilizaron las características descritas en la sección 1 para la producción de enzimas pero a una temperatura de fermentación de 38°C.

c) Raimbault (1980) utilizó harina de yuca como medio de cultivo al 50% de humedad, a un pH de 4.5, un inóculo de  $2 \cdot 10^7$  esp/g de harina de yuca, a un flujo de aire de 0.0133 VGM durante 62 hr de fermentación con el hongo *Aspergillus niger*, los mejores rendimientos se obtuvieron con una temperatura entre 35 y 40°C.

En cuanto al crecimiento se observó que las condiciones óptimas obtenidas en otros sistemas involucran temperaturas entre 35 y 40°C, que es el rango en donde la actividad proteolítica disminuyó considerablemente con el sistema experimental utilizado en este trabajo, por lo que probablemente no se tuvieron las mejores condiciones para el crecimiento óptimo, pues las condiciones de la mayor producción de enzimas y del crecimiento reportadas en otros sistemas son diferentes.

b) Cinéticas de crecimiento utilizando las condiciones óptimas.

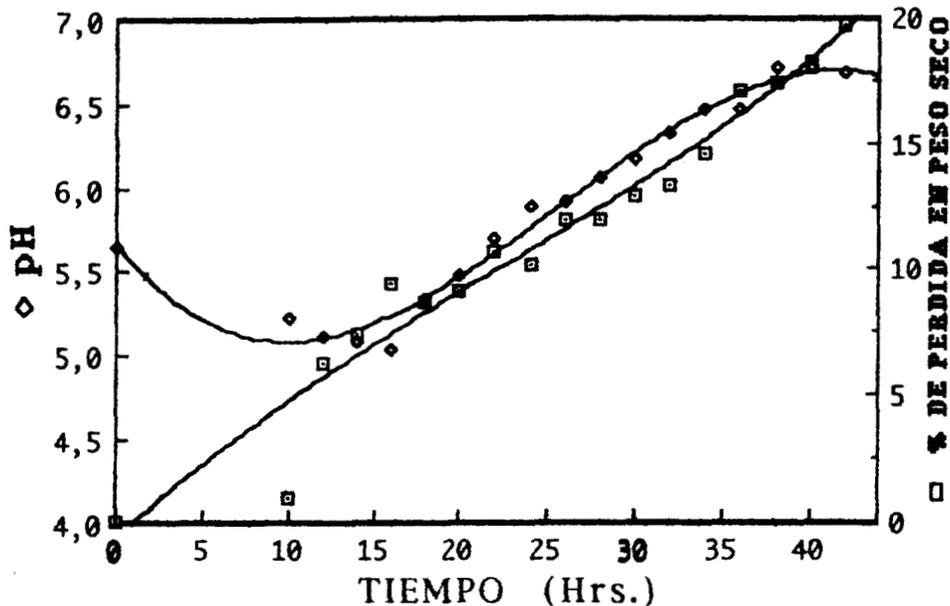
b.1) Cinética con fermentadores diferenciales.

Se montó una fermentación de acuerdo con las características expuestas en la sección a.1 del capítulo V, teniendo las siguientes etapas:

i) Se tomaron muestras cada dos horas a partir de las 10 hr de haber iniciado y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de analizarlas.

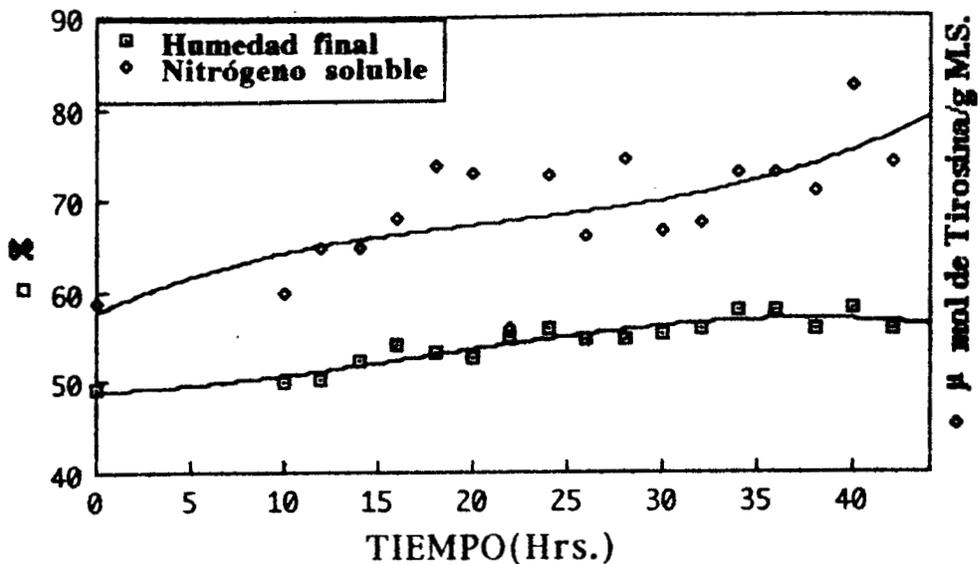
ii) A uno de los fermentadores diferenciales se le acopló una conexión especial que permitió monitorear la cantidad de oxígeno consumido y de bióxido de carbono producido. Las muestras se tomaron en tiempos análogos al punto anterior y se analizaron en un cromatógrafo de gases, el cual tiene una malla molecular y una columna concéntrica CT-R1 que separaron los gases utilizando helio como gas acarreador.

iii) Después de 42 hr de fermentación se analizaron las muestras teniendo los resultados de las gráficas 56-67.



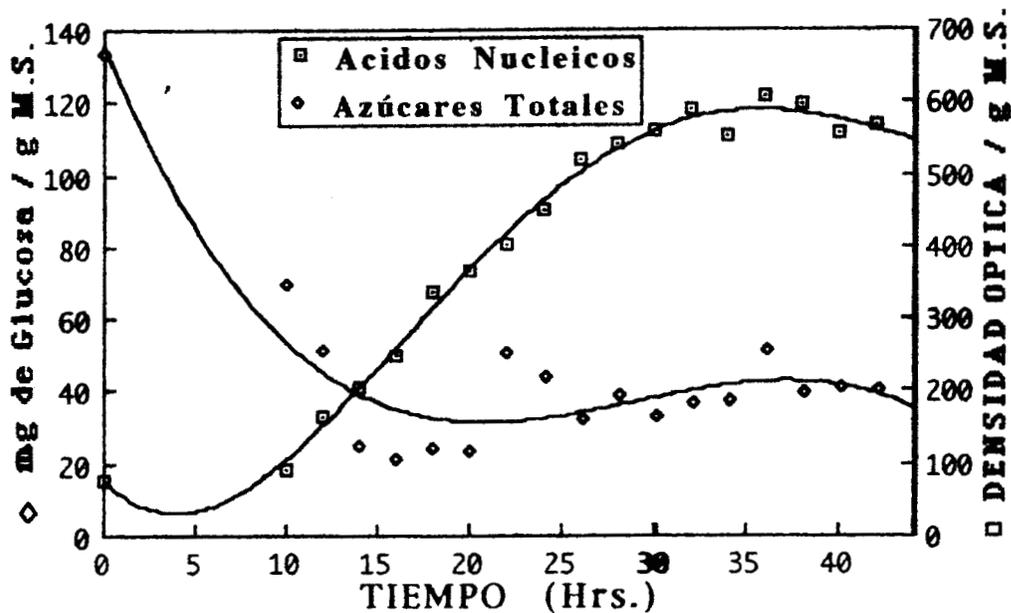
Gráfica No.56. Evolución del pH y del porcentaje de pérdida en peso seco durante 42 horas de fermentación.

Se observó un descenso en el pH hasta un valor de 5.0 a las 16 hr aumentando posteriormente hasta estabilizarse después de las 36 hr hasta un valor de 6.7. El porcentaje de pérdida en peso seco tuvo su variación mayor de 10 a 16 horas que corresponde al mayor descenso en el pH, aumentando después en forma aproximadamente constante hasta un valor de 19.7 % a las 42 horas.



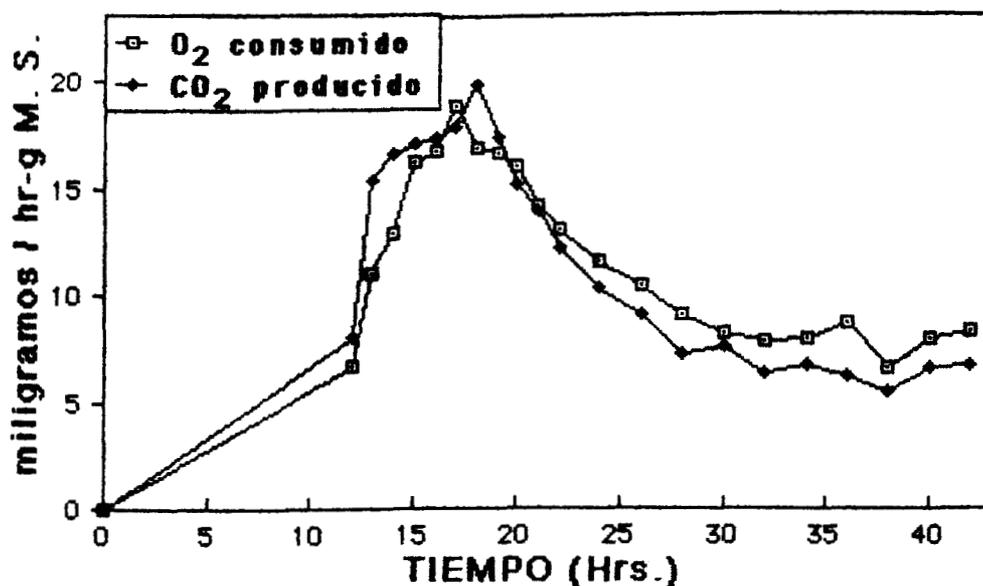
Gráfica No.57. Evolución de la de la humedad final y del nitrógeno soluble durante 42 horas de fermentación.

Se observó que el nitrógeno soluble y la humedad final del medio de fermentación aumentaron con una tendencia similar hasta las 18 y 24 hr y después oscilaron alrededor de un valor promedio de 71.9 unidades y 55.8% respectivamente.



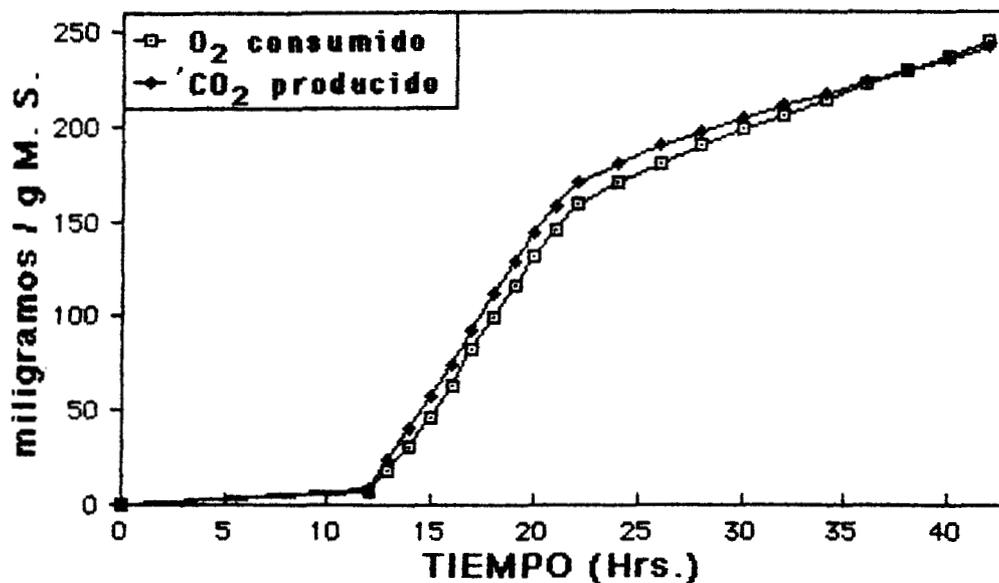
Gráfica No.58. Evolución del consumo de azúcares totales y de ácidos nucleicos durante 42 horas de fermentación.

Los ácidos nucleicos aumentaron durante la fermentación hasta las 32 hr y después tendieron a estabilizarse en un valor promedio de 579.2 unidades, mientras que los azúcares totales tuvieron su mayor consumo hasta las 20 hr y después se mantuvieron en un valor promedio de 40.8 unidades.



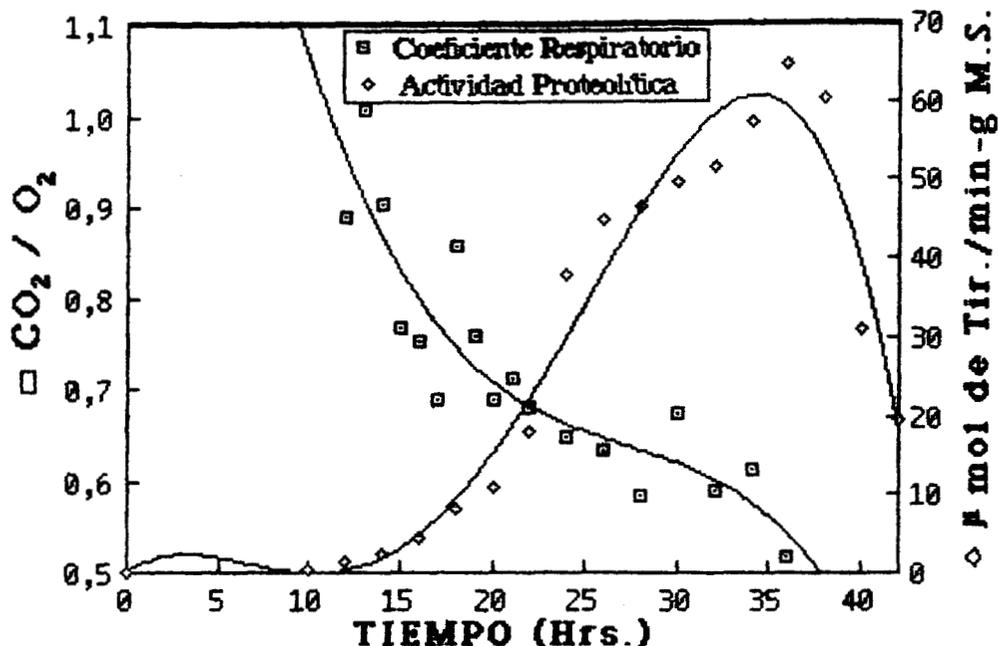
Gráfica No.59. Evolución de oxígeno y bióxido de carbono durante 36 horas de fermentación.

En las tasas de consumo de oxígeno y de producción de bióxido de carbono se observó que éstas fueron aproximadamente iguales, teniendo sus valores mayores de 18.8 y de 19.7 unidades a las 17 y a las 18hr respectivamente.



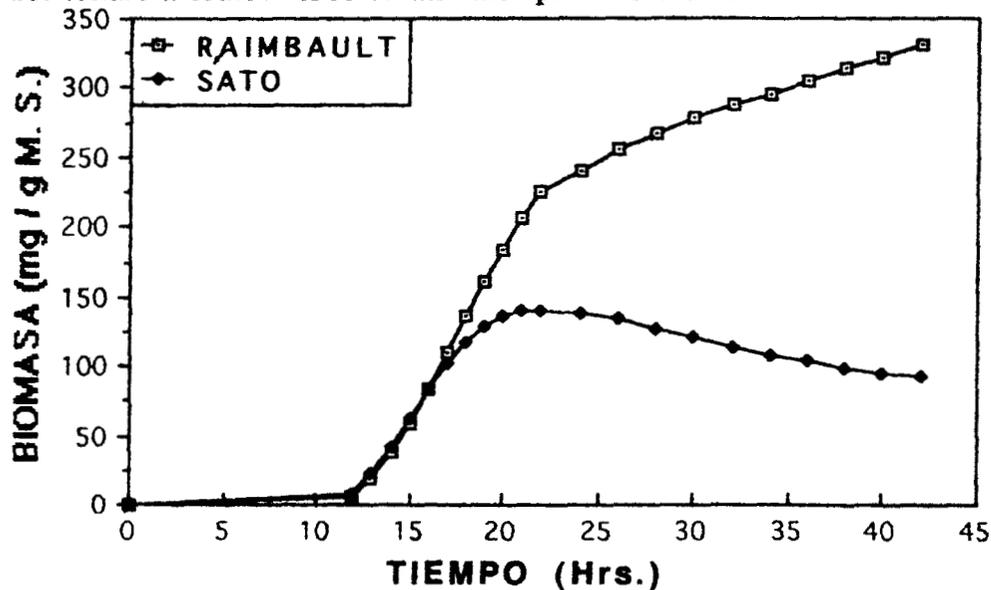
Gráfica No.60. Cantidad de oxígeno consumido y de bióxido de carbono producido total durante 36 horas de fermentación.

El consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono total en la forma integral fueron aproximadamente iguales obteniendo valores de 244.8 y 242.1 unidades respectivamente.



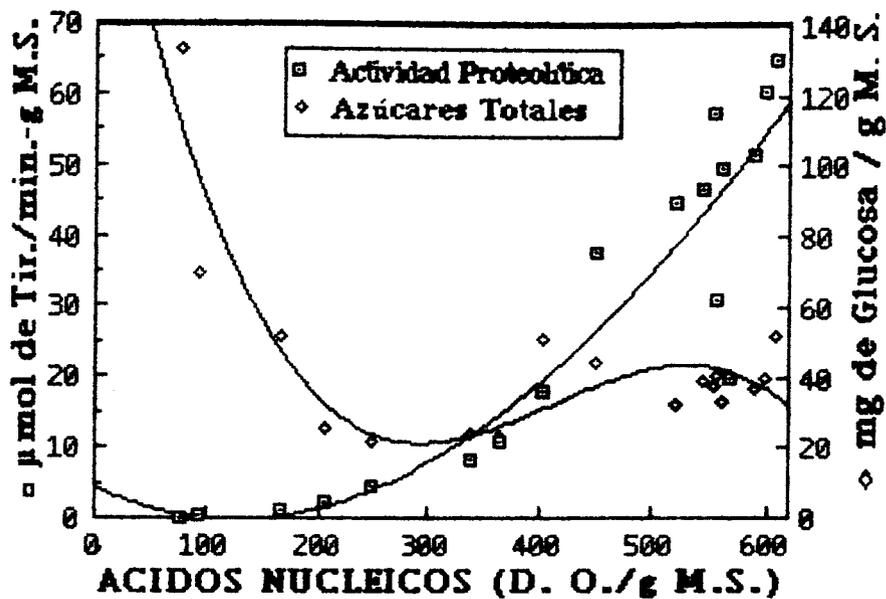
Gráfica No.61. Evolución del coeficiente respiratorio y de la producción de proteasas ácidas durante 36 horas de fermentación.

Se observó que las proteasas ácidas ( $\mu$  moles de tirocina/g M.S.-min) tuvieron su mayor velocidad de producción de 20 a 26 hr, después siguió aumentando en forma gradual a las 36 horas hasta un valor de 64.7 unidades y luego disminuyó. El coeficiente respiratorio tuvo sus variaciones más significativas de 14 a 24 horas y después tendió a estabilizarse en un valor promedio de 0.61.



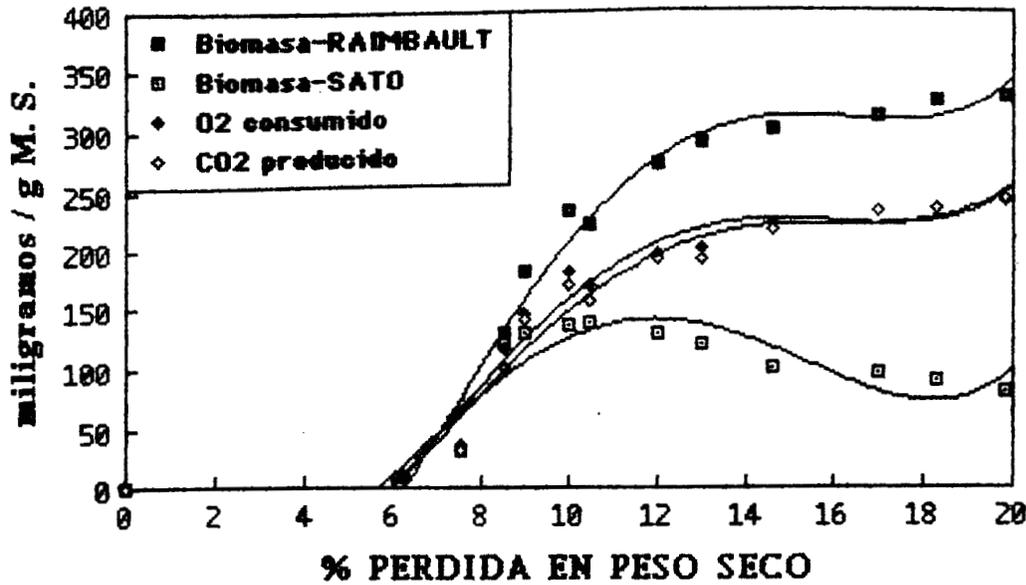
Gráfica No.62. Cinética de crecimiento utilizando datos de oxígeno consumido con el de Sato y col.(1983) descrito en la sección c.7 del capítulo V.

Las cinéticas de crecimiento fueron determinadas con datos de rendimiento y de mantenimiento reportados por Sato y col.(1983),  $Y_{x/o}=2.17$  gramos de biomasa/g de oxígeno (g B/g  $O_2$ ) y  $m=0.096$  g  $O_2$ /g B-hr para *Aspergillus oryzae* y por Raimbault (1980)  $Y_{x/o}=1.55$  g B/g  $O_2$  y  $m=0.007$  g  $O_2$ /g B-hr para *Aspergillus niger* cepa 10. En ambos casos se observó que el mayor crecimiento se obtuvo a las 22 horas y después continuó aumentando la biomasa con los datos reportados por Raimbault hasta un valor de 330.6 unidades, mientras que con los datos reportados por Sato del valor máximo de 140.3 unidades disminuyendo y estabilizándose después de las 32 hr en un valor promedio de 101.5 unidades, éste comportamiento se pudo deber al término que involucra al mantenimiento en la ecuación 10 de la sección c.9 del capítulo V que es negativo.



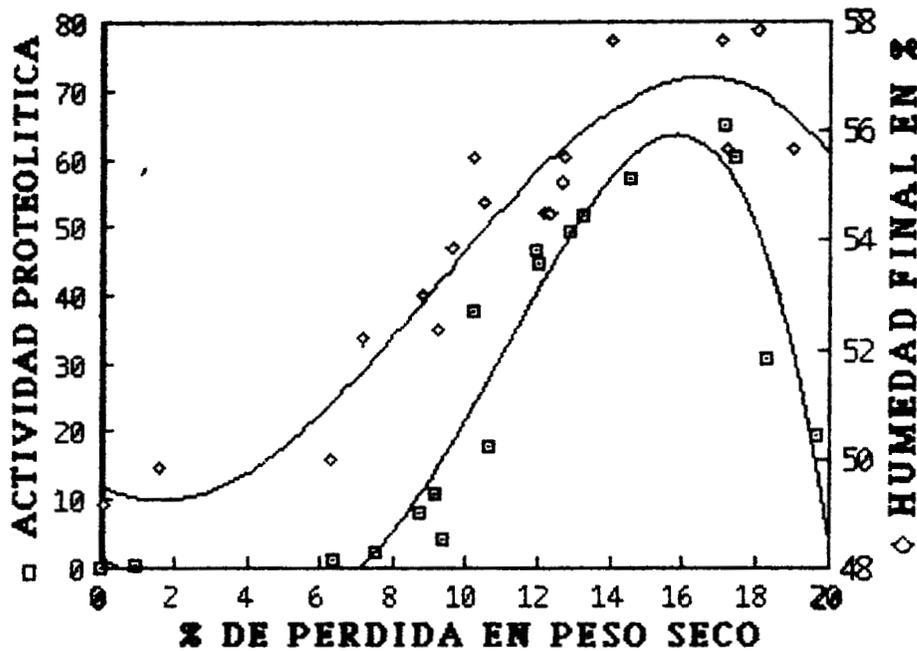
Gráfica No.63. Variación de la producción de proteasas ácidas y del consumo de los azúcares totales con la producción de ácidos nucleicos durante 36 horas de fermentación.

Conforme aumentó la cantidad de ácidos nucleicos el consumo de los azúcares totales fue mayor hasta que tendió a estabilizarse después de las 365 unidades a un valor promedio de 40.8 unidades. La actividad proteolítica se incrementó con los ácidos nucleicos hasta los valores finales de éstos en el intervalo de 598-568 unidades en donde disminuyó hasta un valor de 19.6 unidades.



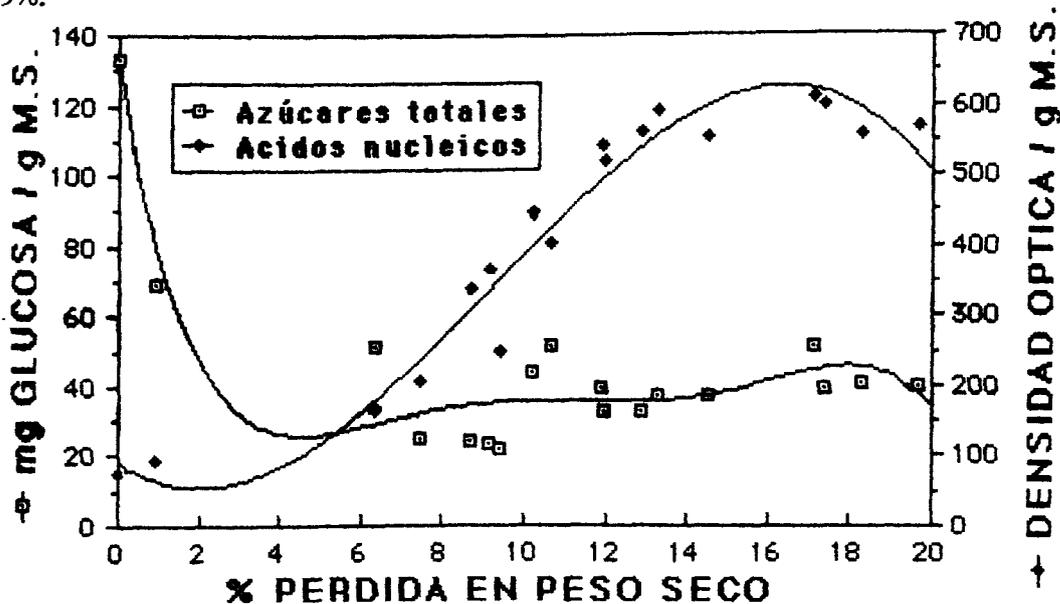
Gráfica No.64. Variación de la biomasa y del oxígeno y bióxido de carbono total con el porcentaje de pérdida en peso seco.

En general al aumentar el porcentaje de pérdida en peso seco todas las variables se incrementaron y tendieron a estabilizarse, a excepción de la biomasa evaluada con los datos reportados por Sato que disminuyó después del 10% de PPS y tendió a estabilizarse.



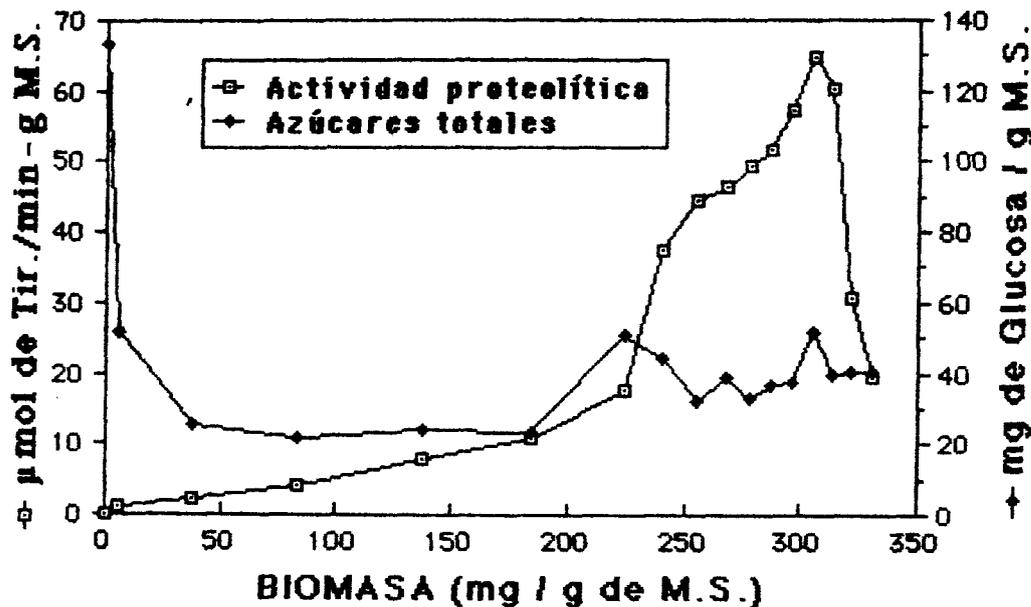
Gráfica No.65. Variación de la producción de proteasas ácidas y de la humedad final con el porcentaje de pérdida en peso seco.

Al incrementarse el porcentaje de pérdida en peso seco la actividad proteolítica ( $\mu$  moles de tirosina/g M.S.-min) y la humedad final aumentaron hasta 17% de PPS, en donde la primera disminuyó y la segunda se mantuvo oscilando alrededor de un valor de 56.9%.



Gráfica No.66. Variación de los azúcares totales y de los ácidos nucleicos con el porcentaje de pérdida en peso seco.

Al aumentar el porcentaje de pérdida en peso seco se incrementaron los ácidos nucleicos hasta 17% de PPS en donde se estabilizó en un valor promedio de 579.2 unidades, mientras que los azúcares totales disminuyeron y se tendieron a estabilizar después del 10% de PPS.



Gráfica No.67. Variación de la actividad proteolítica y del consumo de los azúcares totales con la biomasa evaluada con los datos reportados por Raimbault (1980).

Al aumentar la biomasa se incrementó la actividad proteolítica, obteniendo la mayor producción de proteasas ácidas en el intervalo de 224.2 a 305.4 unidades de biomasa y disminuir posteriormente. El consumo de los azúcares totales aumentó al incrementarse la biomasa y después tendió a estabilizarse después de las 200 unidades de biomasa.

### Discusión.

Los ácidos nucleicos (AN) y el porcentaje de pérdida en peso seco (%PPS) están ligados con el crecimiento, de este modo se observó que cuando estas variables aumentaron la actividad proteolítica se incrementó pero tuvo algunas variaciones intermedias y al final, por lo que la producción de proteasas ácidas está parcialmente ligada al crecimiento.

El mayor %PPS correspondió a una estabilización de los AN en sus valores finales teniendo una tendencia de incremento, por lo que la producción de ácidos nucleicos está ligada con el crecimiento.

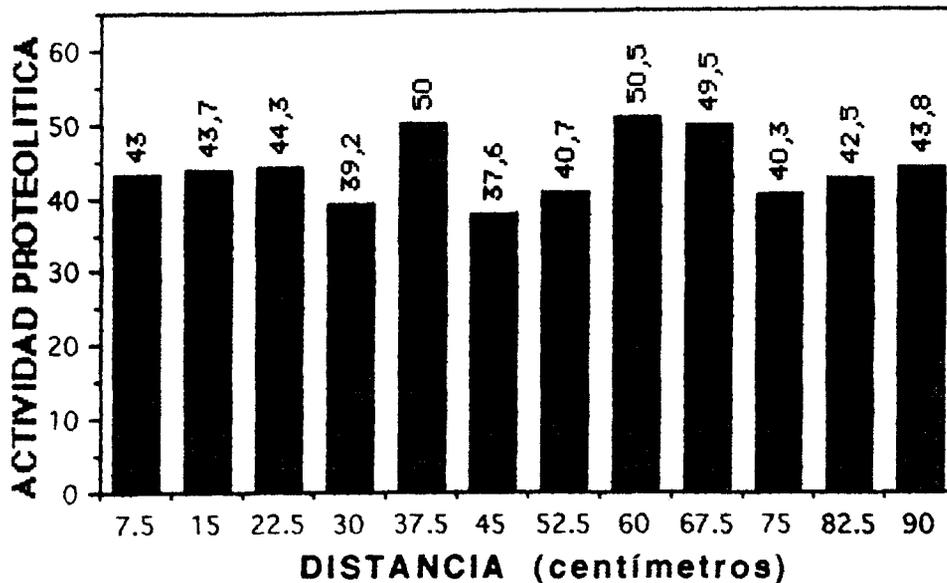
Los azúcares totales siempre tuvieron una tendencia de disminuir cuando aumentaron los AN y el %PPS, por lo que el consumo de los azúcares totales está en función del crecimiento.

Al incrementarse el %PPS se observó que la biomasa evaluada por el modelo descrito aumentó hasta tender a una estabilización en los valores finales, por lo que el %PPS puede reflejar una idea del crecimiento. Por otra parte tanto el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono total tuvieron un comportamiento similar a la biomasa evaluada con los datos reportados por Raimbault, lo cual está asociado con la respiración por medio de la cantidad de materia seca que se transforma en bióxido de carbono, por lo que es de esperarse que al aumentar el %PPS también se incrementen las cantidades de los gases de la respiración.

La humedad final aumentó con el %PPS y por lo tanto está ligada al crecimiento, esto es debido a que el agua es un producto final del metabolismo.

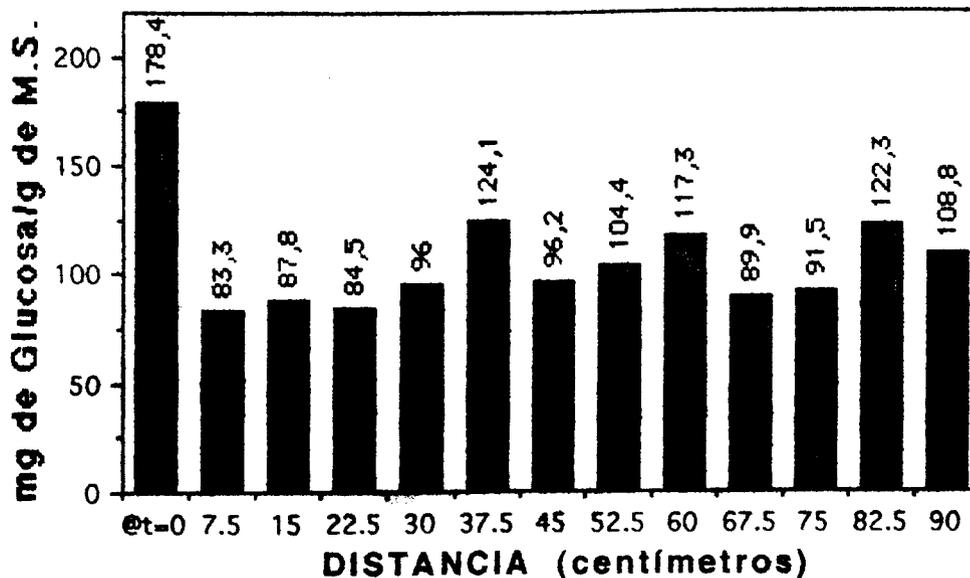
**b.2) Cinética con un fermentador tubular.**

Se montó una fermentación utilizando el fermentador descrito en la figura No.3 de la sección a.2.2 del capítulo V, el proceso de fermentación tuvo una duración de 36 horas obteniendo los resultados en las gráficas No.68-74.



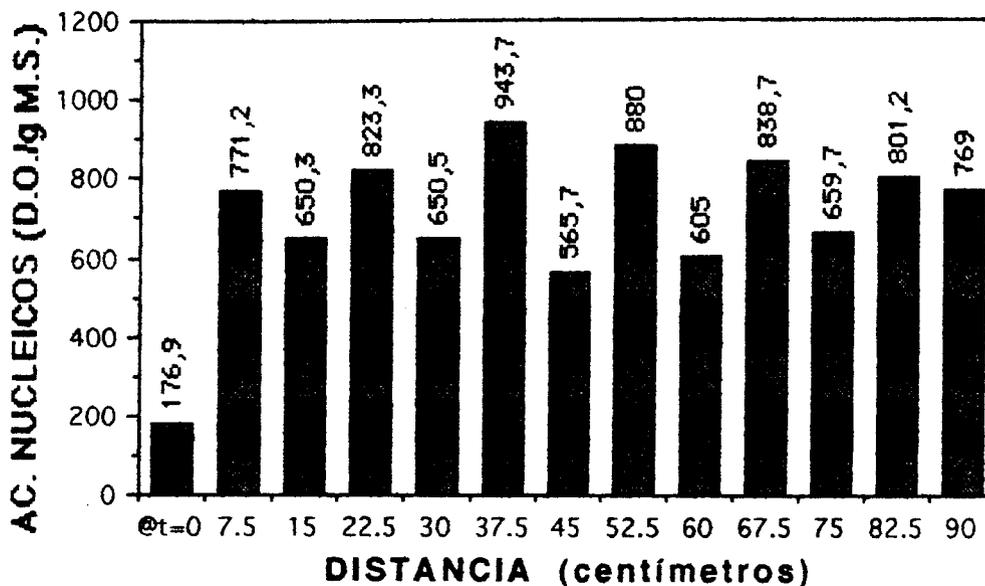
**Gráfica No.68.** Comparación de la actividad proteolítica evaluada a diferentes distancias del fermentador.

Se observó que en las uniones de los módulos probablemente hubo puentes térmicos que bajaron los rendimientos de producción de las proteasas ácidas (m moles de tirosina/g M.S.-min) a excepción de la unión de 60 cm, teniendo un valor promedio del fermentador de 43.75 unidades.



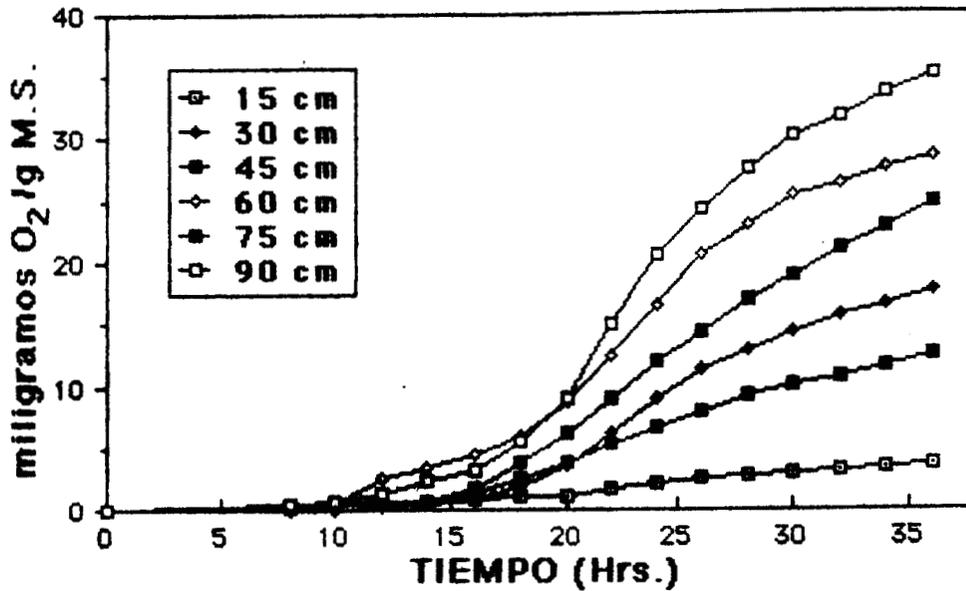
Gráfica No.69. Comparación de los azúcares totales consumidos evaluados a diferentes distancias del fermentador.

Se observó que el consumo de los azúcares totales fue aproximadamente uniforme a excepción de las distancias de 37.5, 60 y 82.5 cm, teniendo un valor promedio en el fermentador de 108.8 unidades.



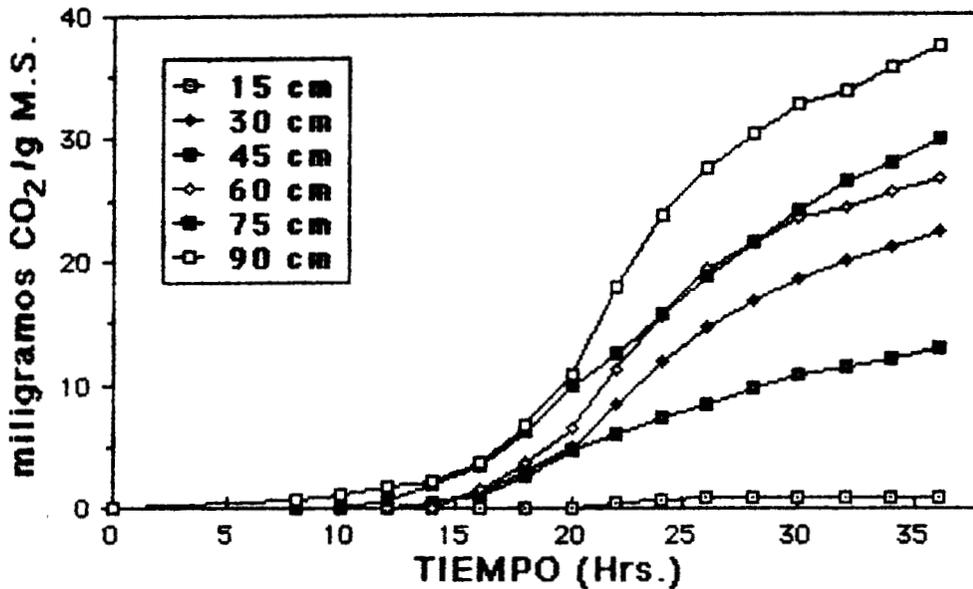
Gráfica No.70. Comparación de los ácidos nucleicos generados evaluados a diferentes distancias del fermentador.

Se observó que la producción de ácidos nucleicos en todas las uniones de los módulos (15, 30, 45, 60 y 75 cm) disminuyó, lo cual probablemente se deba a los puentes térmicos generados en esas zonas.



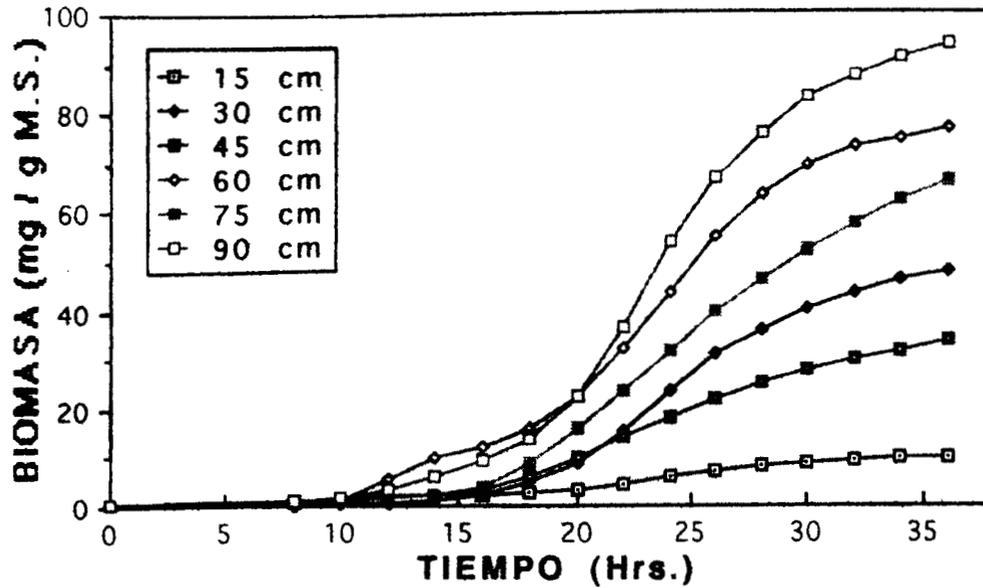
Gráfica No.71. Comparación del consumo de oxígeno total evaluado a diferentes distancias del fermentador.

En el consumo de oxígeno total se observó que los mayores valores de éste se tuvieron a 60 y 90 cm y disminuyó en 45 y 75 cm con respecto a las distancias de 30 y 60 respectivamente.



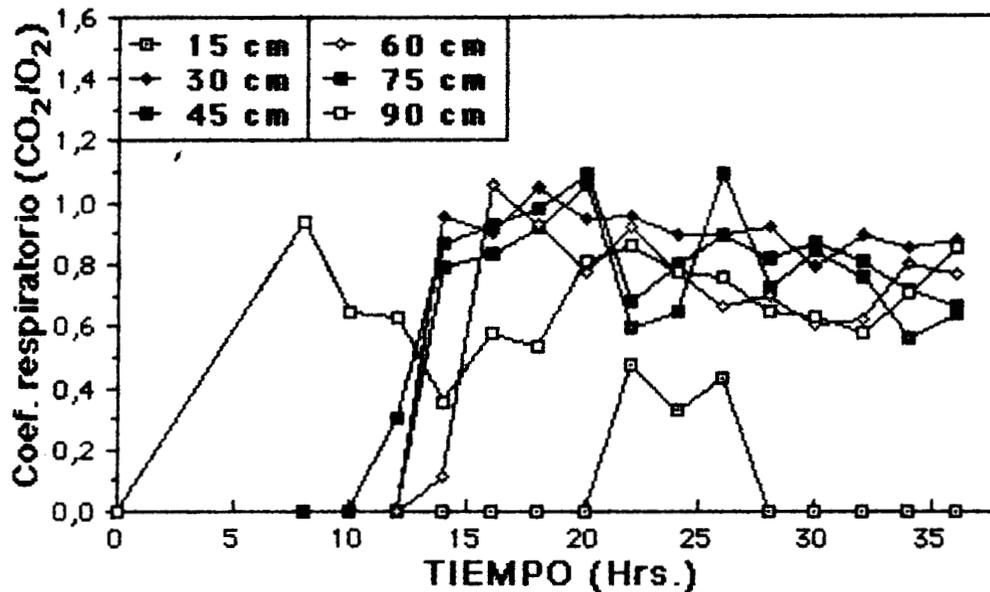
Gráfica No.72. Comparación de la producción de bióxido de carbono total evaluada a diferentes distancias del fermentador.

El comportamiento de la producción de bióxido de carbono total fue similar al del consumo de oxígeno total, a diferencia de que las tendencias en las distancias de 60 y 75 cm son aproximadamente equivalentes.



Gráfica No.73. Cinética de crecimiento utilizando datos de oxígeno consumido y el modelo de Sato y col. (1983) a diferentes distancias del fermentador con los datos reportados por Raimbault.

La producción de biomasa mayor se obtuvo con las distancias de 60 y 90 cm siendo menor en los módulos inferiores. El comportamiento anterior correspondió con los datos de las gráficas No. 71 y 72 en donde el oxígeno total consumido no tuvo un orden ascendente en las distancias de la parte central del fermentador tubular.



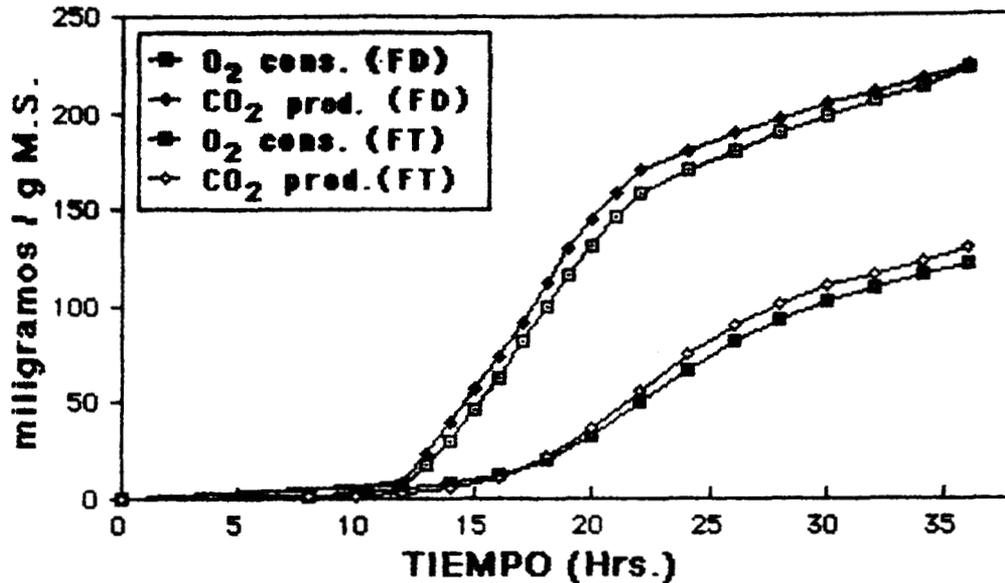
Gráfica No.74. Comparación de los coeficientes respiratorios a diferentes distancias del fermentador.

Se tuvieron comportamientos similares de los coeficientes respiratorios para las distancias intermedias del fermentador y tendieron a estabilizarse después de las 20

hr, en cambio en la distancia de 15 cm se obtuvo bióxido de carbono hasta las 20 hr y a 90 cm a partir de las 8 hr.

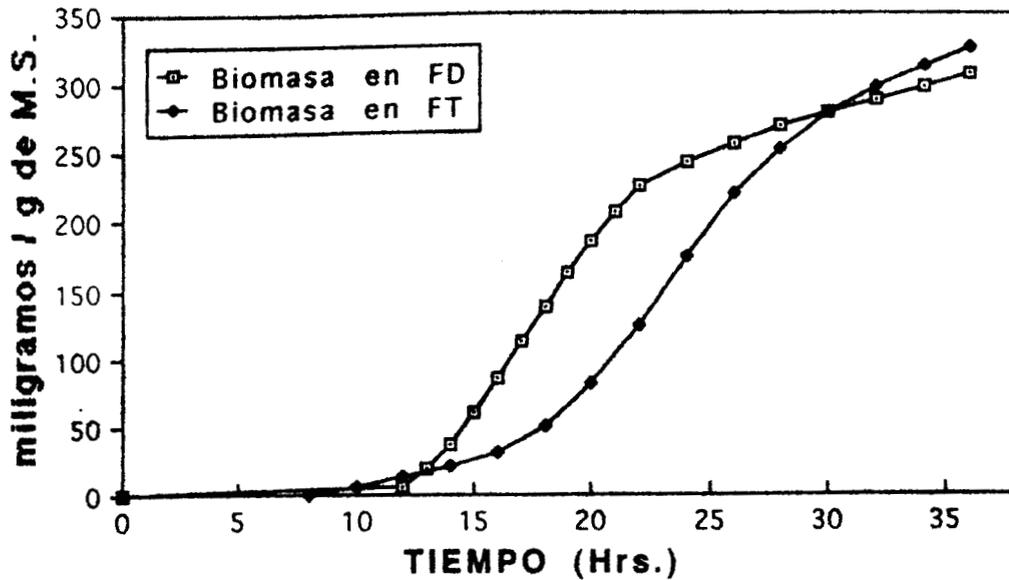
### b.3) Comparación de las cinéticas b.1 y b.2.

Se comparó el consumo y la producción de oxígeno y de bióxido de carbono total respectivamente (gráfica No. 75), el crecimiento microbiano (gráfica No. 76) en los fermentadores diferenciales (FD) y en el fermentador tubular (FT) y los coeficientes respiratorios en ambos (gráfica No.77).



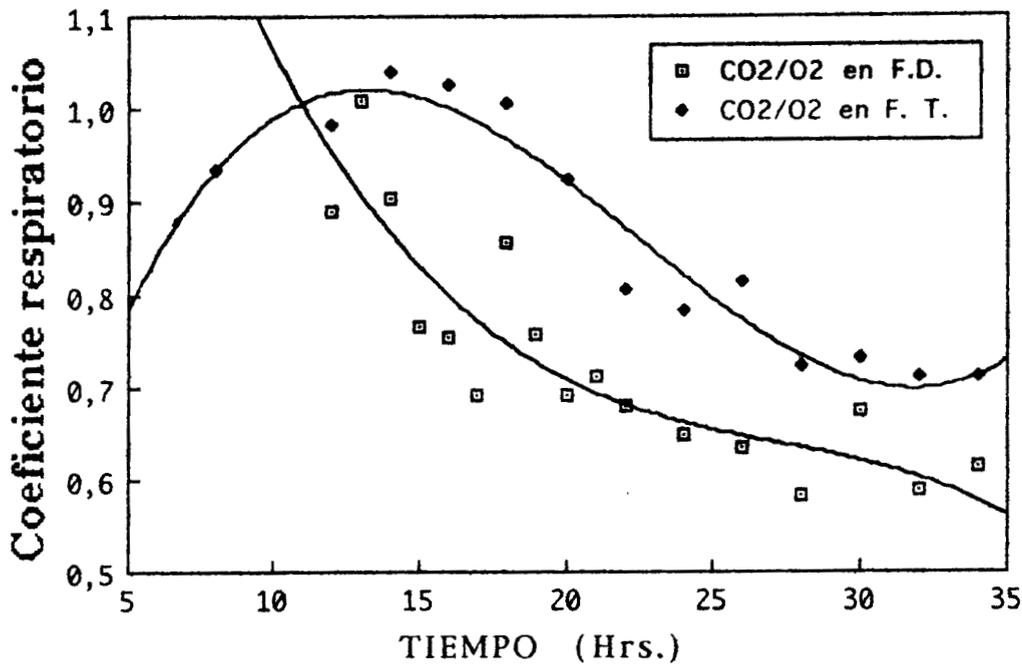
Gráfica No.75. Comparación del consumo de oxígeno en los fermentadores , diferenciales y en el fermentador tubular.

Se observó que en los FD se tienen valores mayores que en el FT del consumo de oxígeno y de la producción de bióxido de carbono total.



Gráfica No.76. Comparación del crecimiento microbiano en los fermentadores diferenciales y en el fermentador tubular.

En los FD el crecimiento microbiano se lleva a cabo más rápido que en el FT en la fase exponencial, aunque al final tendieron aproximadamente al mismo valor.



Gráfica No.77. Comparación de los coeficientes respiratorios en los fermentadores diferenciales y en el fermentador tubular.

En ambos casos se tuvo un comportamiento similar de disminuir aunque en los FD

fue más rápido que en el FT y después tendieron a estabilizarse.

En conclusión se obtuvieron mejores rendimientos en los FD que en el FT utilizado, se tendría que trabajar a fondo con éste para determinar las condiciones que mejoren el crecimiento, posiblemente solucionando los puentes térmicos producidos entre las uniones de los módulos, una eliminación eficiente del calor metabólico generado, la temperatura de fermentación, etc. Aún cuando en el crecimiento se tendió a un valor final aproximadamente igual se podría esperar que la biomasa fuera menor debido a que se tuvo un consumo oxígeno y una producción de bióxido de carbono en el FT menor que en los FD, pues el modelo utilizado está en función de la tasa de consumo de oxígeno, por lo que probablemente no sea el más apropiado.

En cuanto a la actividad proteolítica se tiene un valor promedio de 43.8 unidades en el FT, sin embargo se obtuvo un valor de 50.5 unidades en uno de los módulos (60 cm), aunque no es comparable con las 66 unidades que se obtuvieron en los FD se puede optimizar si se solucionan los problemas del FT o se mejora éste.

## VII.- CONCLUSIONES.

La cepa A.M. -UAMI fue adecuada para para producción de proteasas ácidas. Algunos parámetros se deben de fijar al inicio de la fermentación como el pH, la humedad, el tamaño de inóculo y de partícula y otros se controlan durante el proceso como la temperatura y el flujo de aire.

En el proceso de fermentación algunas variables tuvieron efectos más notables que otras sobre la obtención de proteasas ácidas, en las cuales se observaron máximos de producción permitiendo establecer las condiciones que mejoraron el medio de cultivo y las de operación, obteniendo proteasas ácidas en un orden de magnitud de seis veces lo que se producía al principio.

En general la mayor producción de proteasas ácidas se obtuvo cuando disminuyó la cantidad de nitrógeno soluble, al estabilizarse el pH y cuando aumentó la humedad final durante el proceso de fermentación.

La actividad proteolítica está parcialmente ligada al crecimiento microbiano pues hay una parte en la producción asociada a éste y después se tuvieron fenómenos de degradación de la enzima.

Las condiciones óptimas de producción de proteasas ácidas son diferentes de las que se tienen para el crecimiento, pues con diferentes sistemas y obtención de otras enzimas éste tiene su óptimo en la región en la que la actividad proteolítica disminuyó enérgicamente.

En el escalamiento con el fermentador tubular se observó que se tuvieron condiciones menos favorables que con los fermentadores diferenciales, sin embargo se puede mejorar y optimizar resolviendo los problemas que presentó.

En general la producción de proteasas ácidas por FES ofrece una alternativa interesante para su explotación comercial, pues los resultados obtenidos en este trabajo mejoraron los rendimientos en una proporción importante como para considerar su industrialización.

## VIII.-B I B L I O G R A F I A .

- 1.-Abdullah A., Tengerdy R. (1985) "Optimization of SSF of Wheat Straw", en *Biotechnology and Bioengineering*, John Wiley and Sons Inc., XXVII: 20-27 pp.
- 2.-Aidoo K., Hendry R., Wood J. (1982). "Solid State Fermentations" en *Adv. Appl. Microbiol.*, 28: 201-237 pp.
- 3.-Bailey J., Ollis D. (1986) Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd. edition, McGraw-Hill Internacional Editions, Kiran Verma y Cydney C. Martin Eds., Singapore, 89-4.-Barford H. (1981). "Production of Enzymes by Fermentation" en *Essays in Applied Microbiology*, Norris, J. y Richmond, M. eds., John Wiley and Sons, 2-31 pp.
- 4.-Barford H. (1981) "Production of Enzymes by Fermentation" en Essays in Applied Microbiology, Norris J. y Richmond M. Eds., John Wiley and Sons, 2-3 pp.
- 5.-Blakeman J., McCracken R. y Seaby D. (1988) "Changes Brought about in Solid Substrates After Fermentations of Mixtures of Cereals and Pulses With *Rhizopus oryzae* ", en *J. Sci. Food Agric., Society of Chemical Industry*, Great Britain, 45: 109-118 pp.
- 6.-Bocquet J. (1985). "Generalidades sobre los microorganismos" en Biología, coordinador René Scriban, Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., 8-12 pp.
- 7.-Bond J. y Butler E., (1987). "Intracellular Proteases" en *Ann. Rev. Biochem.*, Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, University of Richmond, Virginia, U.S.A., 56: 333-364 pp.
- 8.-Bowker A. y Lieberman G. (1981). Estadística Para Ingenieros, 1a. edición en español, Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., México, D.F., 263-271 y 620-626 pp.
- 9.-Boyce C. Ed. (1986). Novo's Handbook of Practical Biotechnology, 2nd. edition, a Publication of the Bioindustrial Group Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark, 1-7, 51-57 y 63-69 pp.
- 10.-Calam C. (1986). "Shake-Flask Fermentation" en Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Arnold L. Demain y Nadine A. Solomon Eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A., 59-64 pp.
- 11.-Cannel E. y Moo-Young M. (1980). "SSF Systems" en *Process Biochemistry*, June/July, Ontario, Canadá, 2-7 pp.
- 12.-Cervera U., Villégas E. y Revah S. (1989). "Optimización del Medio del Cultivo y Extracción de Proteasas Acidas Obtenidas Mediante Fermentación en Estado Sólido", en el X Encuentro Nacional del AMIDIQ en Guadalajara, Jalisco, México.
- 13.-Cervera U. y Revah S. (1991). "Efecto de la Composición del Medio de Cultivo Sobre la Producción de Proteasas Acidas por Fermentación en Estado Sólido", en el XII Encuentro Nacional del AMIDIQ en Jalapa, Veracruz, México.
- 14.-Clarke P. (1971). " " en *Methods in Microbiology*, J. R. Norris and D. W. Ribbons, eds., Academic Press, 6A: 269-326 pp.
- 15.- Chahal D. (1985). "SSF by *Trichoderma reesei* for Cellulase Production" en *Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, 49, 1: 205-210 pp.
- 16.-Demain A. (1972). *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 3:21
- 17.-Deschamps F. y Huet M. (1984). "b-glucosidase Production by *Aspergillus phoenicis* in SSF" en *Biotechnology Letters*, 6, 1: 55-60 pp.
- 18.-Deschamps F., Giuliano C., Asther M., Huet M. y Roussos S. (1985). "Cellulase Production by *Trichoderma Harzianum* in Static and Mixed SSF Reactors Under non-aseptic conditions" en *Biotechnology and Bioengineering*, John Wiley and Sons Inc., XXVII: 1381-1388 pp.

- 19.-Doelle H. (1983). "Biotechnology of Solid Substrate Fermentation in the Production of Food" en thirth taller ASEAN in Solid Substrate Fermentation, Cebu, Phillippines, 1-5 pp.
- 20.-Duana R., Rodriguez M., Yee M., Yescas, A. y Revah S. (1990). "Producción de una bebida alcohólica tipo Sake a partir de arroz y plátano" en Ingeniería Bioquímica II de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F., 1-4 pp.
- 21.-Elder A. ed. (1970). "The History of Penicillin Production" en American Institute of Chemical Engineers, Simposium Series 100, vol. 66.
- 22.-Fukushima D. (1982). "Koji as an Important Source of Enzyme in the Oriental and its Unique Composite Systems of Proteinases and Peptidases" en Use of the Enzyme in Food Technology, Proc. Symp. Int., Dupuy Ed., Lavoisier, París.
- 23.-Gibbons W. y Westby C. (1988). "Technology and Economics of Ethanol Production from Fodder Beets via Solid-Phase Fermentation" en Biotechnology Letters, U.S.A., 10, 9: 665-670.
- 24.-Godfrey A. (1985). "Production of Industrial Enzymes and Some Applications in Fermented Foods" en Microbiology of Fermented Foods, J. B. Wood ed., 345-371 pp.
- 25.-Grajek W. (1988). "Production of Protein by Thermophilic Fungi from Sugar-Beet Pulp in SSF" en Biotech. and Bioeng., John Wiley and Sons Inc., 32: 255-260.
- 26.-Hankin L. (1975). "The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi" en Micología, 67: 597-607 pp.
- 27.-Hecht V., Rosen W. y Schügerl K. (1985). "Conversion of Cellulose Into Fungal Cell Mass in SSC" en Appl. Microbiol. Biotech. Universidad de Hannover, Federal Republic of Germany, 21: 189-191pp.
- 28.-Hesseltine C. (1965). "A Millenium of Fungi, Food and Fermentation" en Micología, LVII, 2:149-197 pp.
- 29.-Hesseltine C. (1977). "Solid State Fermentation" en Process Biochem., 12: 24-32 pp.
- 30.-Hewlett-Packard HP-41C, Conjunto Estadístico, printed in Singapore, 18-21 pp.
- 31.-Hours R., Voget C. y Ertola R. (1988). "Apple Pomace as Raw Material for Pectinases Production" en SSC in Biological Wastes, Great Britain, 23: 221-228.
- 32.-Hubert R. (1985). "Enzimología y Biocatálisis" en Biotecnología, coordinador René Scriban, Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., 242-281 pp.
- 33.-Ichísima E. (1971). "Purification and Mode of Assay for Acid Proteinase of *Aspergillus saitoi*" en Methods in Enzymology, Gertrude E. y Laszlo L. Eds., Academic Press, N.Y., U.S.A., 19: 397-406 pp.
- 34.-Johnson N. (1977). Statistics and Experimental Design in Engineering and Physical Sciences, 2nd. edition, John Wiley and Sons, U.S.A., 11: 599-613 pp.
- 35.-Klibanov A. (1983). "Stabilization of Enzymes Against Thermal inactivation" en Advances Applied Microbiology, Academic Press Inc., 29: 1-28 pp.
- 36.-Kubiak C. y Dubuis T. (1985). "Valoración de los Desechos y de los Afluentes Agrícolas" en Biotecnología, coordinador René Scriban, Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., 543-582 pp.
- 37.-Leveau J. y Bouix M. (1985). "Bioingeniería" en Biotecnología, coordinador René Scriban, Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., 166-239 pp.
- 38.-Levonen E. y Bone D. (1985) "Effect of Different Gas Environments on Bench-Scale SSF of Oat Straw by White-rot Fungi", en Biotechnology and Bioengineering, John Wiley and Sons Inc., XXVII: 382-387 pp.
- 39.-Lilly M. (1979). "Production of Intracellular Microbial Enzymes" en Applied Biochemistry and Bioengineering, Academic Press Inc., 2: 1-25 pp.

- 40.-Löffler A. (1986). "Proteolytic Enzymes: Sources and Applications" en Food Technology, **40**, 1: 63-70 pp.
- 41.-Lonsane B. y Ghildyal N. (1985). "Review: Engineering Aspects of SSF" en Enzyme Microbiol. Technol., **7**: 258-265 pp.
- 42.-Macris B., Kekos D., Evangelidou X., Galiotou M. y Rodis P. (1987). "SSF of Straw with *Neurospora crassa* for CM case and b-glucosidase Production" en Biotechnology Letters, **9**, 9: 661-664 pp.
- 43.-Melling J. (1977). "Topics in Enzyme and Fermentation Technology", A. Wiseman ed., Ellis Horwood, Chichester, 10-42 pp.
- 44.-Miall L. (1975). "Historical Development of the Fungal Fermentation Industry" en The Filamentous Fungi, vol. I, John E. Smith y David R. Berry eds., London, 193-209.
- 45.-Mudgett R. (1986). "Solid State Fermentations" en Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Arnold L. Demain y Nadine A. Solomon Eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A., 66-81 pp.
- 46.-Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Pichangkura S., Ueda R. y Taguchi H. (1982). "Growth and Enzyme Production in a SSC of *Aspergillus oryzae*" en Ferment Technol., **60**, 4: 311-319 pp.
- 47.-Olmos A. (1987) Reportes de Biotecnología, ORSTOM, Ediciones UAM, México, D.F., **5**: 14-16 pp.
- 48.-Oriol, E. (1987) "Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activite de l'eau" en Theses en Biotechnologie, ORSTOM-UAM, 41-42 pp.
- 49.-Pourquie J. y Vandecasteele J. (1985). "Conversión de Compuestos Lignocelulósicos por Hidrólisis Enzimática y Fermentación acetona-butanol" en Biotecnología, coordinador René Scriban, Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., 583-600 pp.
- 50.-Priest F. (1977). "Extracellular Enzymes synthesis in the *Genus Bacillus*" en Bacteriological Reviews, American Society for Microbiology, U.S.A., **41**, 3: 711-753 pp.
- 51.-Quintero R. (1987). Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones. Ed. Alhambra Mexicana, S.A. de C.V., México, D.F., 15-25 pp.
- 52.-Raimbault M. (1980). "Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation" en European J. of Appl. Microb. and Biotech., **9**: 199-209 pp.
- 53.-Raimbault M. (1981) Fermentation in milieu solide: Croissance de champignons filamentueux sur substrat amyloce. Orstom, 123-233pp.
- 54.-Raimbault M., Revah S., Pina F. y Villalobos P. (1985). "Protein Enrichment of Cassava by SSF Using Molds Isolated from Traditional Foods" en J. Ferment. Technol. México, D.F., **63**, 4: 395-399.
- 55.-Raimbault M. (1988). "Enzymes Production by SSF" en Conférence Presented at the Seminar on Solid State Fermentation in Bioconversion of Agro-industrial Raw Materials, Centre ORSTOM, Montpellier, France, July, 25-27 pp.
- 56.-Ramaley R. (1979). "Molecular Biological Extracelular Enzymes" en Advances in Applied Microbiology, Academic Press Inc., **25**: 37-54 pp.
- 57.-Ryu S. and Lee J. (1983). "Bioconversion of Waste Cellulose by Using an Attrition Bioreactor" en Biotech. and Bioeng., John Wiley and Sons Inc., **XXV**: 53-65.
- 58.-Sato K., Nagatani M., Nakamura K. y Sato S. (1983) "Growth Estimation of *Candida lipolytica* from oxygen Uptake in a Solid Culture With Forced Aeration", en J. Fermented. Technol., Japan, **61**, 6: 623-629 pp.
- 59.-Sauer F. (1972). "Fungi and Foods" en Proceedings of seventh Annual Simposium, N.Y., U.S.A., 22-24 pp.

- 60.-Scriban R. (1985). "Producción de Enzimas" en Biotecnología, coordinador René Scriban, Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., 282-321 pp.
- 61.-Schwimer S. (1981). Source Book of Food Enzimology. The AVI publishing Company inc., Westport, Connecticut, U.S.A. 1-24, 27-48 Y 87-104 pp.
- 62.-Silman R. (1980). "Enzyme Formation During SSF in Rotating Vessels" en Biotech. and Bioeng., XXII: 411-420 pp.
- 63.-Stanbury P. y Whitaker A. (1987) Microbial Enzymes in Principles of Fermentation Technology, Pergamon Press, Great Britain, 2-5 pp.
- 64.-Steinkraus K. (1980/81). "The Indigenous Fermented Foods" en Publisher Nestlé Products Technical, Suiza, 23-28 pp.
- 65.-Tengerdy R. (1985). Solid Substrate Fermentation, Department of Microbiology, Colorado State University, U.S.A., 96-99 pp.
- 66.-Ward O. (1985). "Proteolytic Enzymes" en Biotech. and Bioeng., M. Moo-Young Ed., Pergamon Press, III: 789-818 pp.
- 67.-Windish W. y Mhatre N. (1965) "Microbial Amylases" en Advances in Applied Microbiology, 7: 273-304 pp.  
91, 157-193 y 378-381 pp.
- 68.-Yamada K. (1977). "Bioengineering Report, Recent Advances in Industrial Fermentation in Japan" en Biotechnology and Bioengineering, XIX:1563-1621 pp.
- 69.-Zetelaki K. y Horváth B. (1984). "Cellulase Production of *Phanerochete Chrysosporium* on a solid substrate column" en Process Biochemistry, april: 65-66 pp.