

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

CBS

Producción de Invertasa por *Aspergillus niger*  
en Fermentación Líquida y Fermentación Sólida

TESIS

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA

Sergio de Jesús Romero Gómez

 COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

Abril de 2001

---

El jurado designado por las  
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Sergio de Jesús Romero Gómez

El día 02 de Abril de 2001

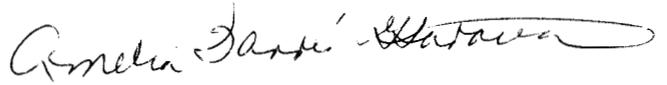
225707

Comité Tutorial:

Tutor: Dr. Gustavo Viniegra González



Asesor: Dra. Amelia Farrés González-Sarabia



Asesor: Dr. Christopher Augur



Sinodal: Dr. Ernesto Favela Torres



Sinodal: Dr. Sergio Huerta Ochoa



El jurado designado por las  
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Sergio de Jesús Romero Gómez

El día 02 de Abril de 2001

Comité Tutorial:

Tutor: Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dra. Amelia Farrés González-Sarabia

Asesor: Dr. Christopher Augur

Sinodal: Dr. Ernesto Favela Torres

Sinodal: Dr. Sergio Huerta Ochoa

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

A las mujeres de mi vida en  
estricto orden de aparición:  
Mi madre, mi tía Ruth, Georgina,  
Tatiana y mi pequeña Ruth Guadalupe

---

## Índice

Índice .....	I
Resumen.....	III
Abstract.....	VI
1. Introducción.....	1
Hongos filamentosos.....	1
<i>Aspergillus niger</i> .....	4
Regulación de la síntesis de enzimas en hongos filamentosos.....	6
Metabolismo aeróbico.....	10
Transferencia de oxígeno.....	11
Fermentación líquida.....	16
Fermentación sólida.....	18
Diferencias entre fermentación sólida y fermentación líquida.....	21
Poliuretano.....	23
Sacarosa.....	25
Invertasa.....	26
Proteasas.....	29
Antecedentes.....	30
Justificación.....	34
Objetivos.....	36

Hipótesis.....	37
2. Material y Métodos.....	38
3. Resultados.....	45
Efecto de la concentración inicial de sacarosa sobre la producción de invertasa por <i>Aspergillus niger</i> en fermentación sólida y líquida.....	45
Estudio de la producción de invertasa por 3 cepas de <i>Aspergillus niger</i> en fermentación sólida y líquida con 100 g/l de sacarosa inicial.....	70
Estudio de la secreción de invertasa por <i>Aspergillus niger</i> C28B25 en fermentación sólida y líquida con 100 g/l de sacarosa inicial.....	76
Estudio de la morfología de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en fermentación sólida y líquida.....	90
4. Discusión general.....	99
5. Conclusiones.....	107
Propuestas.....	108
6. Bibliografía.....	111
7 Anexo 1	124

## Resumen

En este estudio se comparó la producción de la enzima invertasa (sacarasa o  $\beta$  fructo-furanosidasa EC3.2.1.26) por una cepa silvestre de *Aspergillus niger* C28B25 usando medio líquido y sólido. Se utilizó espuma de poliuretano como soporte inerte para fermentación sólida y se propone como un sistema modelo para el estudio de las diferencias entre fermentación sólida y líquida. El objetivo principal fue la evaluación del efecto de la adición de cantidades crecientes de sacarosa que actuase, simultáneamente como inductor de ésta enzima y única fuente de carbono. Se midieron los siguientes parámetros fisiológicos: la velocidad específica de crecimiento del organismo ( $\mu$ ), el nivel máximo de la biomasa ( $X_{max}$ ), el rendimiento de biomasa por gramo de substrato consumido ( $Y_{X/S}$ ), el rendimiento enzimático por gramo de biomasa producida ( $Y_{E/X}$ ) y la productividad de la enzima enzimática (P). Con la comparación de estos índices se pretende demostrar si la mayor productividad enzimática del medio sólido se debe a la mayor producción de biomasa o a una mayor producción enzimática por gramo de biomasa y si esto se puede relacionar con la forma de crecimiento del micelio dentro de cada medio de fermentación.

Los resultados obtenidos indicaron que, en fermentación sólida, la biomasa producida fue mayor que en fermentación líquida, aunque el consumo de substrato fue muy similar en ambos medios. Esto fue más notable cuando se usaron altos niveles de sacarosa ( $S_0 > 50$  g/L). Es decir, los valores de  $Y_{X/S}$ , como función de  $S_0$ , fueron mayores para la fermentación sólida que para la líquida con todos los niveles

de sacarosa. Además, las tendencias de la  $\mu$  fueron diferentes entre los dos tipos de fermentación (mayor para el medio sólido). Los niveles máximos de la invertasa fueron mucho mayores en fermentación sólida que los obtenidos por fermentación líquida, con sacarosa inicial mayor a 25 g/l. La productividad de la enzima pasó de ser casi igual con 6.25 g/l de sacarosa inicial para ambos tipos de cultivo, a ser 5 veces mayor en fermentación sólida, cuando se añadieron 100 g/l de sacarosa inicial. El rendimiento de la enzima por gramo de biomasa ( $Y_{E/X}$ ) fue mayor en medio sólido que en medio líquido. Todas estas diferencias fisiológicas se acentuaron cuando los niveles de sacarosa fueron altos.

Al estudiarse la composición de azúcares del caldo de cultivo con 100 g/l de sacarosa inicial, se encontró que en el medio líquido se acumulaban más la glucosa y la fructosa, que en el medio sólido. Esto indica una velocidad de hidrólisis mayor a la capacidad de producción de biomasa en el medio líquido durante las primeras horas del cultivo.

Por otra parte, se midieron los niveles de actividad de proteasa para comparar el efecto del sistema de cultivo sobre la estabilidad de la invertasa, la actividad proteolítica fue 6.5 veces menor en la fermentación sólida que en la fermentación líquida.

Los cultivos de *Aspergillus niger* en medio líquido produjeron agregados esféricos o "pelotitas" ("pellets") que son la forma macroscópica característica en este medio. Pero en medio sólido, este organismo creció en forma de un micelio disperso adherido en parte a las trabéculas del polímero y en parte en forma de micelio aéreo en contacto directo con la fase gaseosa. La observación microscópica de poliuretano

mezclado con el medio líquido mostró que ésta formaba meniscos con un espesor cercano a 60  $\mu\text{m}$  y que esta medida corresponde a la dispersión de 25 ml de agua en un gramo de poliuretano, en una superficie de aproximadamente 4,000  $\text{cm}^2$ . Es decir que el cociente de la superficie sobre el volumen fue de  $A/V = 160 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ . En cambio, la medición del área de contacto del medio en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio indicó una relación  $A/V = 1.0 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ . Es decir, la superficie de transferencia de gases en el medio sólido fue dos órdenes de magnitud mayor que en el medio líquido.

De acuerdo con estos resultados, es posible apoyar las siguientes conclusiones:

1. *Aspergillus niger* crece más rápidamente, con una mayor biomasa máxima y con un mayor rendimiento de biomasa por gramo de substrato consumido en fermentación sólida que en fermentación líquida.
2. La producción de invertasa está al menos parcialmente asociada a la producción de biomasa en ambos tipos de cultivo. Por lo tanto, la mayor productividad de los cultivos de fermentación sólida se debe, a la mayor y más rápida producción de biomasa en este tipo de fermentación.
3. Los cultivos de fermentación sólida en poliuretano, presentan crecimiento en forma de micelio disperso con un gran espacio aéreo y una superficie de intercambio gaseoso 160 veces mayor que en líquido. los cultivos de fermentación líquida presentan pellets con centros muy densos. De manera que las condiciones de cultivo y el tipo de crecimiento favorecen la transferencia de oxígeno al interior de la biomasa en fermentación sólida y la dificultan en fermentación líquida.

#### 4. ABSTRACT:

The purpose of the present study was to compare the productivity of a fungal enzyme, invertase (sucrase or  $\beta$  fructo-furanosidase EC3.2.1.26) of *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). Poliurethane foam was used as inert support in SSF experiments.

One of the objectives was to evaluate the effect of increasing initial sucrose concentrations as invertase inducer and sole carbon source. The following physiological parameters were evaluated: specific growth rate ( $\mu$ ), maximal biomass ( $X_{max}$ ), biomass yields per substrate gram ( $Y_{X/S}$ ), enzyme yields per gram biomass ( $Y_{E/X}$ ) and culture productivity ( $P$ ) from solid and submerged fermentations. A comparison of the above parameters was done to evaluate whether the higher productivity of SSF cultures is related to one or several of the growth and production parameters.

The obtained results shown that in solid fermentation, biomass production was much higher than in liquid fermentation even when substrate consumption was comparable in both fermentation systems. This result was much more notable for higher substrate concentrations (higher than 50 g/l). Biomass yields were much higher in solid than in liquid state fermentation with a decreasing tendency as the substrate concentration was increased. Specific speed growth ( $\mu$ ) was higher to solid than in liquid fermentation at all sucrose concentrations tested. Invertase titers were higher in SSF than in SmF as well. At low sucrose concentrations (between 6.25 to 25 g/l) invertase productivity was comparable in both fermentation systems. However, at high initial

sucrose concentration (100 g/l) invertase productivity was 5 times higher in SSF than in SmF. Enzyme yield per gram of biomass ( $Y_{E/X}$ ) was much higher in SSF than in SmF.

When sugar composition of the culture broth was analyzed, glucose and fructose were found to accumulate at higher concentrations in SmF than in SSF cultures. This can be related to slower growth in SmF cultures. Extracellular protease levels were measured in order to assert its effect on the stability of invertase activity in the cultures. Proteolytic activity was 6.5 times lower in SSF than in SmF. However these differences could not directly related to differences in invertase stability in the cultures.

In liquid cultures, *Aspergillus niger* grew in the form of pellets. In SSF *Aspergillus niger* grew as disperse mycelia adhering in part to the polyurethane foam and growing in part as aerial mycelia. Microscopic observation of liquid media within polyurethane cubes showed a liquid layer with thickness of 60  $\mu\text{m}$  within the holes of polyurethane cubes. Knowing that the amount of liquid added per gram of polyurethane was 25 ml, a surface area of 4000  $\text{cm}^2$  could be calculated. This means that in SSF the surface volume relation was 160  $\text{cm}^2/\text{cm}^3$ , meanwhile in SmF this relation was 1.0  $\text{cm}^2/\text{cm}^3$ . This represents a surface interchange 300 times bigger for SSF than for SmF cultures.

According to these results, the following conclusions were supported:

1. *Aspergillus niger* grows faster, with higher biomass maximal and higher biomass yields in SSF than SmF.

2. Invertase production is at least partially associated to biomass production in both culture systems. Therefore the higher enzyme productivity of SSF is related to the higher and faster biomass production.
3. SSF cultures on PUF grows as dispersed mycelia with a big air space and a gas interchange space 160 times bigger in SSF than in SmF, meanwhile SmF cultures grows as pellets with a very dense center. Therefore culture conditions and growth type uphold and difficult oxygen transfer in SSF and SmF respectively.

## **Introducción**

El mercado de enzimas utilizadas en procesos industriales representa alrededor de mil millones de dólares anuales y los hongos filamentosos contribuyen con el 40% del total, se trata de un mercado en expansión, sobre todo por el desarrollo de nuevos procesos que utilizan enzimas conocidas y por la aplicación de enzimas nuevas en procesos conocidos (Archer y Peberdy, 1997).

La mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales se producen por fermentación líquida (FL), pero en los últimos años se han desarrollado sistemas alternativos para la producción de enzimas por hongos filamentosos, como la fermentación sólida (FS). Este sistema de cultivo es más productivo que la FL, e imparte características interesantes al cultivo y a las enzimas producidas (Pandey y col., 1999).

En este trabajo se trata de aclarar a qué se debe que los cultivos de hongos Deuteromicetos (mohos) por FS tengan, usualmente, mayor productividad para la síntesis de enzimas excretadas al medio que los cultivos de FL

## **Hongos filamentosos**

Los hongos son organismos eucariontes, que se caracterizan por ser inmóviles, presentar talos, que pueden ser estructuras ramificadas llamadas micelios o cuerpos más compactos denominados basidiocarpos, en lugar de tejidos. Los hongos no realizan la fotosíntesis pues son heterótrofos que viven a partir de la materia orgánica producida por otros organismos. Pueden reproducirse por esporas o por medio de la

ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas. Una hifa es una estructura cilíndrica que consta de una pared celular que recubre a una membrana en cuyo interior pueden existir uno o varios núcleos. Además, pueden tener septos que son paredes internas que cortan la continuidad del citoplasma dentro de la hifa y en algunos casos estos septos pueden presentar poros que permiten el paso del citoplasma, incluyendo a sus organelos, estableciendo así, la continuidad citoplásmica dentro de la hifa. Las hifas crecen por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación. En los extremos de estas células es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de substratos complejos (Herrera y Ulloa, 1990).

Los hongos filamentosos son comúnmente conocidos como el crecimiento que aparece frecuentemente sobre las frutas y los alimentos donde se les da el nombre de moho. El término moho es un nombre común que carece de significación taxonómica y se aplica a una variedad de hongos que crecen como organismos semi-microscópicos, cuyo micelio tiende a formar una red suelta en lugar de un tejido denso. Es en esto en que los mohos u hongos filamentosos se distinguen de los grandes hongos carnosos, como las setas comestibles o los champiñones. Los mohos pueden pertenecer a cualquier clase de hongo, pero la mayoría de las especies son Ficomietos u hongos imperfectos (Deuteromicetos). Los mohos más comunes pertenecen a las especies de *Aspergillus* o *Penicillium*.

Los hongos filamentosos se reproducen por esporas o conidias y se distinguen por las características de los tallos que soportan las esporas y los conidióforos. En los

*Aspergilli* el conidióforo se eleva a partir de una célula del micelio vegetativo, llamada célula pie, que tiene una pared más gruesa que la del micelio vegetativo, y cuando las esporas se esparcen comúnmente se mantiene vacío, es decir no contiene protoplasma. El tallo del conidióforo no está septado y termina en una parte hinchada llamada la vesícula. A partir de esta expansión las conidias se forman en cadenas de esporas cuyo segmento inicial se denomina *sterigmata*. En ocasiones la *sterigmata* está ramificada y las esporas que se alzan a partir de las ramificaciones se denominan *sterigmata* secundarias. Las esporas maduras se dispersan en el ambiente y en condiciones adecuadas dan origen a otra colonia de hongos (Herrera y Ulloa, 1990).

Taxonómicamente los hongos están agrupados en el reino Fungi, la clasificación dentro del reino es complicada y se basa principalmente en el tipo de estructuras reproductoras que se forman tanto en los ciclos sexuales como asexuales. En forma más precisa: la presencia de ciclo sexual, el tipo de estructuras reproductoras, el número de grupos de complementación y la presencia o ausencia de septos, son los principales caracteres para clasificar a los hongos en tres grandes grupos, a saber: *Myxomycota* (hongos mucilaginosos), *Eumycota* (hongos verdaderos) y *Lichens* (hongos simbiotes). El grupo *Eumycota* se divide a su vez en cuatro grupos que son *Ascomicetos*, *Basidiomicetos*, *Ficomicetos* y *Deuteromicetos* (Herrera y Ulloa, 1990). Los Deuteromicetos y los Ascomicetos son hongos filamentosos, de los cuales el género más abundante es *Aspergillus*. En su mayoría no forman cuerpos fructificantes o basidiocarpos, sino que crecen exclusivamente en forma de micelios. Han sido considerados por largo tiempo organismos ideales para el estudio de las

características fisiológicas y genéticas de los eucariontes debido a su fácil manipulación en laboratorio, su capacidad para crecer en medios químicamente definidos de bajo costo y a su rapidez de crecimiento que permite obtener varias generaciones en poco tiempo. Además de que, tradicionalmente, se han utilizado a algunos de estos microorganismos para fermentar alimentos y como productores de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Wessels, 1999).

### ***Aspergillus niger***

Las especies de *Aspergillus* están distribuidas a escala mundial. Se encuentran en el suelo y entre la materia vegetal, siendo *Aspergillus niger* la especie más común. Este organismo es el contaminante más frecuente en los laboratorios de microbiología. Es un hongo filamentoso perteneciente al grupo de los Deuteromicetos, familia *Eurotium*, y se caracteriza por presentar: hifas septadas, esporas asexuales llamadas conidiosporas, las cuales se encuentran en una estructura llamada conidióforo que al llegar a la madurez adquiere la forma de un hisopo, aspensor o regadera, la cual origina el nombre del género. Este organismo no presenta ciclo sexual, por lo que se le incluye entre los llamados hongos imperfectos junto con otros *Aspergilli* y algunas especies de los géneros *Mucor* y *Penicillium*. La forma vegetativa o micelio de *A niger* es de color blanco o amarillento, al llegar a la madurez se producen estructuras reproductoras llamadas conidióforos que dan origen, en el tipo silvestre, a esporas negras, lo que da el nombre de la especie. Cuando a algún representante de este grupo se le observa ciclo sexual se le traslada al grupo Ascomiceto y el nombre se cambia de *Aspergillus* a *Emericela*. Tal es el caso de *Aspergillus nidulans* que

presenta ciclo sexual por lo que sería más adecuado llamarle *Emericela nidulans*. Sin embargo, la mayoría de las personas lo conocen y citan con su primer nombre por lo cual se ha conservado (Herrera y Ulloa, 1990).

La clasificación del género *Aspergillus* es complicada principalmente porque los requisitos que debe cumplir un hongo para ser considerado como un *Aspergillus niger* son vagos: presentar esporas de color negro, no tener ciclo sexual conocido y no pertenecer a otro género. Este sistema de clasificación deja muchos organismos parecidos dentro de la misma especie, sin que obligatoriamente lo sean. Últimamente, se ha desarrollado una nueva serie de sistemas de clasificación molecular por medio de análisis de fragmentos de restricción o expresión de genes específicos. La clasificación de *Aspergillus niger*, es por lo tanto propia de un complejo taxonómico más que de una especie, por ejemplo: de acuerdo con los últimos hallazgos se debe utilizar el nombre *Aspergillus niger* variedad *awamori* en lugar de identificar a la especie *Aspergillus awamori* (Kuster-van Someren y col., 1990).

Se denomina aspergilosis a una serie de enfermedades causadas por *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus* y que resultan en reacciones de tipo alérgico o, para el caso de personas con deficiencias inmunitarias, verdaderas infecciones, pues generalmente el sistema inmunitario puede combatir la invasión por *Aspergilli*.

## **Regulación de la síntesis de enzimas por hongos**

Los hongos filamentosos como *A. niger* son organismos saprófitos, por lo que secretan una gran variedad de enzimas que les permiten la asimilación de polímeros complejos de tejidos animales y vegetales, que utilizan como fuentes de carbono y nitrógeno. Sin embargo no sería eficiente para un hongo sintetizar continuamente todas las enzimas hidrolíticas de que es capaz. En cambio los hongos filamentosos sintetizan y secretan en grandes cantidades sólo las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar el medio en el cual se desarrollan, a esta característica se le llama control de la expresión genética (MacKenzie y col., 1993; Ruijter y Visser, 1997; Ronne, 1995).

El esquema actual de la regulación de la síntesis de proteínas en hongos, está basado en tres elementos genéticos básicos:

- a) Gen regulador. Gen que puede localizarse antes o después del gen estructural, así como en alguna otra región de DNA, y codifica para un producto que regula la transcripción del gen estructural.
- b) Promotor. Es un sitio de fijación de represores o activadores, es donde inicia la lectura del gen estructural. Esta formado por varias secuencias como son la caja TATA, CAT, CG, las cuales son responsables de los niveles basales de transcripción de los genes. La unión del represor al operador evita la transcripción de los genes estructurales, mientras que la unión de un activador aumenta la transcripción del gen estructural.

c) Gen estructural Es la región de DNA que codifica para una macromolécula (tRNA, mRNA o proteína) y que puede tener una función estructural o catalítica.

**REGULACIÓN NEGATIVA:** En condiciones normales, la unión continua del represor con el promotor impide la transcripción del gen estructural, cuando el inductor se halla presente se une al represor, impidiéndole que se una al promotor, lo que permite la transcripción de los genes estructurales. Solo algunos genes de *Aspergillus* se han reportado con este sistema de regulación (Mackenzie y col. 1993).

**REGULACIÓN POSITIVA:** Se han localizado varias proteínas que se unen a los promotores en presencia del inductor aumentando los niveles de transcripción del gen estructural. Estas proteínas se denominan factores de transcripción. Varias hipótesis se han formulado para explicar la regulación de estas proteínas: En la primera se propone que la presencia del inductor modifica estructuralmente a las proteínas habilitándolas para unirse a la región del promotor, la segunda hipótesis propone que la presencia de glucosa promueve la fosforilación de los factores de transcripción permitiendo la unión de estas proteínas a las regiones promotoras aumentando la transcripción del gen estructural. También se han localizado promotores sensibles a nitrógeno, azufre y fósforo, incluso el gen *pacc* de *A. nidulans* el cual modifica la expresión genética positiva o negativamente dependiendo del pH extracelular (Mackenzie y col., 1993; Ronne, 1995).

En el caso de los hongos filamentosos la regulación de la síntesis proteica se realiza a diferentes niveles (MacKenzie y col., 1993; Ronne, 1995).

a) Secuencias promotoras en la región reguladora de cada uno de los genes. Este tipo de regulación de la expresión genética en los hongos filamentosos se realiza por la actuación de varias secuencias nucleotídicas, anteriores al gen estructural, que regulan la transcripción del gen al que pertenecen. Se piensa que estas secuencias son responsables de los niveles basales de la expresión enzimática.

b) Secuencias de DNA responsables del control genético por inducción. A estas secuencias es donde se unen las proteínas represoras o activadoras, las cuales actúan como reguladores de la respuesta de inducción y represión.

c) Retroalimentación de una ruta metabólica específica. Dentro de la regulación por retroalimentación se ha identificado una serie de proteínas activadoras que se unen al DNA en regiones de control. Además, se han ido encontrando un número creciente de represores. Estos activadores o represores actúan no sólo sobre un gen, sino sobre un grupo de genes involucrados en una ruta metabólica, como es el caso del gen *alc* de *A. nidulans* que promueve la expresión de los genes inducibles *alcA*, *alcR*, *aldA* involucrados en el metabolismo del etanol (Kulmburg y col., 1992; Ruijter y Visser, 1997).

d) Regulación global que depende de los niveles de carbono, nitrógeno, fósforo y oxígeno. La expresión de muchos genes esta regulada además por controles globales, que son mediados por un número relativamente pequeño de proteínas reguladoras, de modo que los niveles de carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno o azufre, detienen o aumentan la expresión de algunas enzimas o de vías metabólicas completas. Se ha encontrado que las proteínas responsables de la regulación

enzimática son frecuentemente similares entre grupos afines (Mackenzie y col., 1993; Ruijter y Visser, 1997).

Es de especial interés la regulación catabólica por carbono en la cual la expresión de un determinado grupo enzimático no sólo está dictado por la presencia del inductor, sino principalmente por la ausencia de glucosa o de algún otro azúcar de asimilación sencilla en cantidades apreciables. En *A. nidulans* se han localizado 3 genes involucrados en la represión catabólica por carbono llamados: *creA*, *creB* y *creC*. El gene *creA* es un inhibidor que actúa uniéndose al DNA en múltiples zonas capaces de aceptarlo. Este gene se ha identificado en *A. nidulans*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma viridae*. La deleción o mutación de los sitios de unión a *creA* en el DNA impide la represión por glucosa del gen en cuestión, sin afectar la regulación de los demás, pero la mutación del gen *creA* produce mutantes catabólicamente desreprimidas para la síntesis de una amplia variedad de enzimas (Mackenzie y col., 1993).

La evidencia acumulada sugiere que los sitios de regulación por unión de proteínas disponibles pueden sobreponerse o ser adyacentes unos a otros indicando una competencia por unión al DNA, de tal modo que la expresión de una proteína específica sería el resultado de la suma de efectos causados por esta competencia (Mackenzie y col., 1993). Otra regulación se localiza a nivel postranscripcional en el lumen del retículo endoplásmico; donde se modifican las proteínas a secretarse principalmente por el proceso de glucosilación. De este modo la regulación de la expresión enzimática en hongos filamentosos queda ordenada de la siguiente manera:

Las enzimas se mantienen expresándose, de manera constitutiva en cantidades basales muy pequeñas; debido a la presencia de secuencias promotoras en las inmediaciones del gen estructural. Además, en presencia del inductor, el represor se une a éste y libera el sitio de unión del gen regulador, pero en la presencia de concentraciones altas de glucosa los sitios de unión a proteína son ocupados por inhibidores de tipo *creA*. Al disminuir la concentración de glucosa en el medio se inicia la liberación de los sitios de regulación, al separarse el inhibidor del sitio de unión, es sustituido por factores específicos de transcripción, de tal modo que, las enzimas empiezan a secretarse dando origen a más inductor llevando entonces a un control por retroalimentación con el sustrato. Además las condiciones prevalentes en el medio promueven modificaciones postranscripcionales en las proteínas (MacKenzie y col., 1993; Acuña-Argüelles y col., 1995; Minjares-Carranco y col., 1997). Dentro de las modificaciones postranscripcionales más importantes, se ha estudiado la glucosilación de las proteínas en relación con la eficiencia de la secreción en el caso de la quimosina en *Aspergillus niger* var. *awamori* (Dunn-Coleman y col., 1991).

### **Metabolismo aeróbico**

En base a sus requerimientos o sensibilidad al oxígeno los microorganismos pueden ser clasificados como anaerobios, aerobios estrictos y aerobios facultativos.

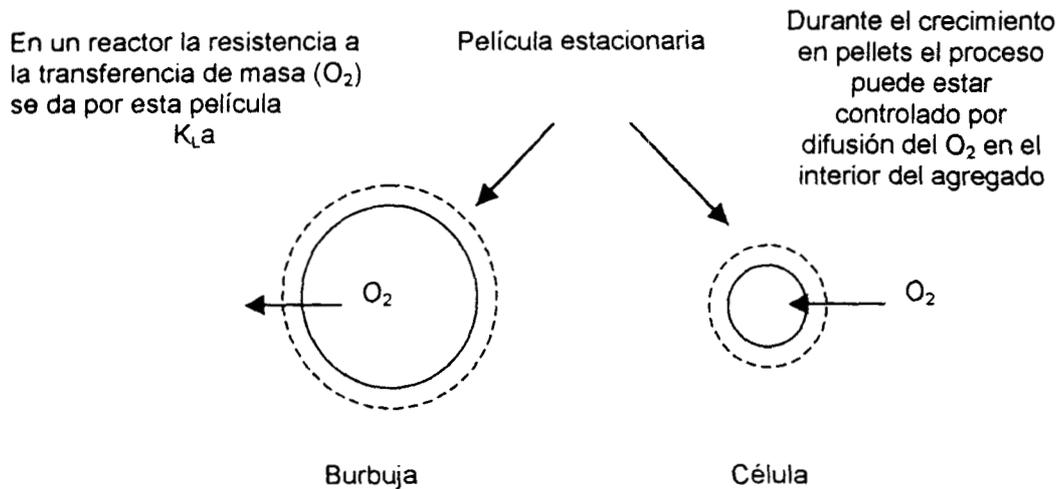
Para los microorganismos aeróbicos, la presencia del oxígeno juega un papel muy importante en la regulación de sus actividades metabólicas.

Los microorganismos aeróbicos necesitan oxígeno para obtener la energía de los alimentos, y la concentración del oxígeno en el medio de cultivo juega un papel central en la regulación metabólica. Por ello, en el cultivo de este tipo de microorganismos, el aire debe ser distribuido al interior del líquido de fermentación para pasar al interior de las células por difusión simple, tras esto debe cruzar el citoplasma hasta el lumen mitocondrial. De este modo, el oxígeno consumido por los microorganismos debe pasar a través de varias barreras antes de alcanzar la matriz mitocondrial donde se usará como aceptor de protones al final de la fosforilación oxidativa. La concentración de  $O_2$  que es ligeramente superior al 21% en el aire llega a ser casi nula en la matriz de la mitocondria, el proceso de transferencia de oxígeno se debe a su gradiente de concentración entre las diferentes fases del cultivo. La concentración y la velocidad de transporte del oxígeno del aire a la biomasa puede modificar de manera importante el comportamiento del microorganismo en el cultivo al controlar la producción de ATP y con ello todo la producción energética de los microorganismos (Pirt, 1975; Righelato, 1975).

### **Transferencia de oxígeno**

Existen varios modelos para explicar la transferencia del oxígeno del aire a los microorganismos, uno de los más sencillos y completos es la teoría de película estacionaria de líquido que se presenta en la figura 1, según el cual la principal resistencia al transporte del oxígeno entre las fases gas-líquido-biomasa se presenta

en la película estacionaria de líquido que se encuentra en el límite entre las diferentes fases. La velocidad de difusión del oxígeno entre las fases es directamente proporcional a la superficie del área de intercambio, del gradiente de concentración del oxígeno y del grosor de la capa estacionaria de líquido que rodea a la biomasa.



**Figura 1: Representación gráfica de la teoría de película estacionaria, modificado de Pirt (1975).**

En un diseño de reactor dado, el grosor de la capa estacionaria de líquido en el cultivo que puede ser disminuida por medio de la agitación del medio de cultivo, lo que permite un mejor crecimiento del hongo.

Las otras fuerzas que rigen la transferencia de oxígeno en cultivos líquidos se describen en una serie de ecuaciones y leyes que se presentan a continuación.

La solubilidad del oxígeno en el medio acuoso es de sólo  $7 \text{ mgL}^{-1}$  a una atmósfera de presión y  $20^\circ\text{C}$ . Esto es poco comparado con la cantidad de oxígeno que puede consumir un cultivo. Como se verá más adelante, un cultivo denso puede necesitar hasta  $50 \text{ g de oxígeno L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , equivalentes a cerca de  $3 \text{ L de aire por L de líquido por minuto (VVM)}$ . Por lo tanto es necesario renovar el oxígeno disuelto transfiriendo oxígeno desde el aire al medio líquido. En general, si el volumen del líquido está muy extendido, y por ello, forma una lámina delgada, el gradiente de difusión será más elevado pues este proceso está gobernado por la ley de Fick que sigue la siguiente ecuación empírica.

$$\text{Flujo Total} = -AD(\text{Ce} - \text{Ci})/h$$

Dónde,  $A \text{ (cm}^2\text{)}$ , es el área de la interface;  $D \text{ (cm}^2\text{h}^{-1}\text{)}$ , la constante de difusión del soluto;  $\text{Ce (gcm}^{-3}\text{)}$ , la concentración externa;  $\text{Ci (gcm}^{-3}\text{)}$ , la concentración interna y,  $h \text{ (cm)}$ , el espesor de la lámina de la interfase. De esa forma, el flujo total de oxígeno será más grande cuando la lámina sea muy extensa ( $A$ , muy grande) y muy delgada ( $h$ , muy pequeña).

En los cultivos en matraz agitado, desarrollado por Kluyver y Perkin, (1933), se aumenta el área de la interfase y se promueve el transporte de oxígeno en el seno del líquido, mediante el movimiento del mismo, pero se sigue dependiendo de la relación  $r = AV \text{ (cm}^2 \text{ de superficie/cm}^3 \text{ de volumen)}$ . Por eso se recomienda usar volúmenes pequeños de líquido dentro de ese tipo de matraces, de forma que éste se extienda en la parte baja y ancha del recipiente.

Como un cultivo aeróbico está regulado por el balance entre la transferencia de oxígeno y su consumo o Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), este proceso puede describirse por el siguiente balance de O<sub>2</sub>.

$$dC/dt = k_L a(C_e - C^*) - (Y_{O_2/S})q_S X$$

El coeficiente  $K_L a$  se puede medir en forma sencilla, viendo la dinámica de transferencia del oxígeno a un recipiente agitado. Sus unidades son hora<sup>-1</sup>, pues corresponden a un coeficiente que, multiplicado por las diferencias de concentración del oxígeno, resulta en la velocidad neta de transferencia del O<sub>2</sub> al líquido. El segundo término, corresponde a la velocidad de consumo de oxígeno (DBO) que está regulada por el coeficiente,  $Y_{O_2/S}$  (gO<sub>2</sub>/gS), correspondiente a la demanda unitaria de oxígeno por el metabolismo, que en el caso de la respiración aeróbica es de 1.05 gO<sub>2</sub>/gS, según se puede derivar de la estequiometría del proceso. Y, por la ecuación de Monod, según se indica a continuación.

$$q_S = (\mu_{\max}/Y_{X/S}) S/(K_S + S)$$

Siendo:  $\mu_{\max}$  (hora<sup>-1</sup>), la velocidad específica máxima de crecimiento,  $Y_{X/S}$  (gX/gS), el coeficiente de rendimiento de la biomasa en función del substrato consumido;  $S$  (gS/L), la concentración del substrato y,  $K_S$ , la constante de saturación del proceso. Según, (Righelato, 1975) un cultivo de *A. niger*, tiene en medio líquido una velocidad

de crecimiento máximo cercana a,  $\mu_{\max} = 0.3\text{h}^{-1}$ , un  $K_S = 50\text{ mgL}^{-1}$  y  $Y_{X/S} = 0.4\text{ gX/gS}$ <sup>1</sup>. Por lo tanto, para que el cultivo pueda crecer a esa velocidad, requiere satisfacer una DBO calculada como sigue.

$$\text{DBO}(\text{gO}_2/\text{Lh}) = \approx 0.785(\text{gO}_2/\text{gXh})X(\text{gX/L}); \quad (\text{S} \gg K_S)$$

Cuando la densidad de la biomasa es alta (60 g/L), el consumo neto de aire (DBO) con 21% de oxígeno, a una presión de 1 atm, y a la temperatura de 25° C. equivale a por lo menos a 2.9 VVM (litros de aire por litro de líquido por minuto). pero la demanda bruta (sin descontar las pérdidas de aire) dependerá de la capacidad de transferencia de oxígeno al líquido ( $k_La$ ) y este factor a su vez, dependerá del diseño y de las condiciones de operación del reactor. En consecuencia, cuando la concentración del substrato es alta, la DBO estará gobernada por la densidad de la biomasa, X, y ésta, a su vez, estará controlada por el valor de  $k_La$ . Por lo tanto, el crecimiento de la biomasa dependerá crucialmente del coeficiente de transferencia del oxígeno al medio de cultivo.

Los valores de,  $k_La$  pueden ser obtenidos de la literatura para diferentes tipos de dispositivos.

En la tabla 1 se muestran algunos datos conocidos que comparan como varia este coeficiente con la geometría del reactor. Los matraces Erlenmeyer sin deflectores (baffles) son los más utilizados para experimentos de laboratorio, tiene valores de  $K_La$  más bajos normalmente inferiores a 200, esto producirá que la concentración de

biomasa en cultivos dentro de este tipo de matraces esté limitada. Este antecedente técnico es de gran importancia para comparar los datos de cultivos de *A. niger* en matraces agitados y en un medio sólido poroso (Henzler y Schedel, 1991).

Fermentador	$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )
Matraz agitado	80-200
Fermentador agitado	325-2650
Columna con burbujeo	140
Reactor con ciclo de presión	400
Filtro de burbujeo	350
Reactor de Air lift	350
Reactor de plato de corte	< 1000
Reactor con cuchillas	1000

**Tabla 1. Valores de  $K_{La}$  experimentales reportados para diferentes tipos de reactor (Mavituna y Sinclair, 1985).**

### Fermentación líquida

Se puede definir a la fermentación líquida (FL) o sumergida (abreviada en inglés como SmF) como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede o no ser aireado por medios mecánicos. La forma de fermentación líquida más utilizada en los laboratorios de investigación es el matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad

moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, pues no es raro ver fermentadores con volúmenes superiores a 10 mil litros, en los cuales se producen todo tipo compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: 1) Dispersa el gas en burbujas más pequeñas incrementando el área de interfase gas-líquido. 2) Incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas. 3) Disminuye el grueso de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia del cultivo. Además, la agitación mezcla el cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto es particularmente importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Henzler y Schedel, 1991). Los productos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente, por lo que, no son un factor limitante para el crecimiento del microorganismo. La barrera principal de transferencia del O<sub>2</sub> en la FL, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar, aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético que debe realizarse en la FL está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos, esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger*, que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento y producir muchos de los metabolitos de interés (Righelato, 1975; Solomon, 1975; Raimbault, 1998).

## **Fermentación sólida.**

La fermentación sólida puede ser definida como un cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido poroso y humedecido en el cual el medio líquido está extendido en una capa muy fina en contacto con una interfase aérea. Las bacterias, levaduras y hongos son los microorganismos que pueden crecer en fermentación sólida, pero la mayoría de las investigaciones se llevan a cabo con hongos filamentosos. El crecimiento en forma de micelio y su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad hacen que los hongos sean la microflora natural más adecuada para la fermentación sólida.

El modelo de crecimiento miceliar da una ventaja adicional a los hongos filamentosos sobre los microorganismos unicelulares en la colonización de la matriz sólida y en la utilización de los nutrientes del medio de cultivo. El modelo básico de crecimiento de los hongos es una combinación del crecimiento apical con la generación de nuevas hifas por ramificación. Mientras que el crecimiento apical se lleva a cabo de manera lineal, la ramificación se lleva a cabo de manera exponencial y como resultado se logra una alta velocidad de crecimiento y una gran capacidad de cubrir eficientemente la superficie de cultivo.

La estructura de la pared celular unida al crecimiento por las puntas y la ramificación da a los hongos una estructura sólida y firme que les permite penetrar en el interior de la matriz sólida. Las enzimas hidrolíticas son excretadas por las puntas de las hifas sin que se diluyan como en el caso de la fermentación líquida lo que hace la acción de las enzimas hidrolíticas muy eficiente y les permite penetrar en la mayoría

de los substratos sólidos, lo que aumenta la disponibilidad de los nutrientes del interior de los substratos (Raimbault, 1998)

Existe un gran interés en la utilización de *A. niger* para transformar desechos agroindustriales en productos bioquímicos de valor comercial, por medio de la fermentación sólida (FS), porque se ha encontrado que durante la FS se manifiestan características fisiológicas diferentes en los microorganismos en comparación con la FL. Entre los productos comerciales más importantes, se encuentran algunas enzimas que son excretadas al medio y cuya producción por FL se presenta en forma muy disminuida debido a los fenómenos de represión catabólica (Ramesh y Lonsane, 1991a; Solís-Pereira y col., 1993). A veces, las enzimas producidas por FS tienen características modificadas, como un aumento en su termorresistencia, menores tiempos de producción y mayor actividad (Hesseltine, 1972; Moo-Young y col., 1983; Tengerdy, 1985; Grajek y Gervais, 1987; Pandey, 1992; Shankaranand y col., 1992; Solís-Pereira y col., 1996; Acuña-Argüelles y col., 1995).

Los efectos que se derivan de la utilización de FS sobre los microorganismos son múltiples como modificaciones en el transporte de azúcares, la composición de la pared, la membrana celular y en la actividad enzimática (Grajek y Gervais, 1987; Pandey, 1992). Mientras que las bacterias y las levaduras requieren de alta actividad de agua ( $A_w > 0.98$ ), los hongos filamentosos pueden crecer con valores de  $A_w$  tan bajos como 0.85, y por esta razón, son microorganismos muy bien adaptados para la fermentación sólida. Pandey (1992) sugiere incluso que un bajo nivel de  $A_w$  favorece la germinación y el crecimiento micelial de los hongos (Pandey, 1992; Raimbault, 1998)

De acuerdo con Raimbault (1998) el soporte de la fermentación sólida debe cumplir con varios requerimientos como son:

Poseer una matriz porosa que puede ser biodegradable o inerte, y requiere presentar una gran superficie de área por volumen dentro del rango de  $10^3$  o  $10^6$   $\text{cm}^2/\text{cm}^3$  que permita el crecimiento microbiano en la interfase sólido-líquido. Debe absorber agua en una o varias veces su propio peso con una actividad de agua relativamente grande en la interfase sólido-líquido para poder permitir una alta velocidad de los procesos bioquímicos.

La mezcla de oxígeno con otros gases y aerosoles deben pasar a través del cultivo con relativa facilidad, la superficie sólido-líquido debe ser un buen hábitat para permitir el crecimiento de microorganismos que crecen rápidamente como bacterias y hongos. La matriz sólida debe resistir la compresión y un mezclado suave que podría requerir cada tipo de fermentación. Esto requiere partículas pequeñas y granulosas que no tiendan a unirse unas a otras.

La matriz sólida debe estar libre de contaminantes y de inhibidores del crecimiento de los microorganismos y debe ser capaz de absorber o contener substratos para el crecimiento microbiano como carbohidratos, fuentes de nitrógeno y sales minerales.

Estas condiciones son cumplidas por la mayoría de los soportes naturales utilizados en la fermentación sólida como el bagazo de caña, el salvado de trigo, etc

Existen también soportes inertes que cumplen con estos requerimientos y que se han utilizado para la fermentación sólida como la amberlita y, especialmente, el poliuretano.

### **Diferencias entre fermentación sólida y fermentación líquida.**

A partir del conocimiento de las diferencias físicas existentes entre ambos sistemas de fermentación, es posible definir algunas diferencias entre ambos tipos de cultivo y su papel sobre la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger*.

- a) Los coeficientes de difusión efectivos pueden ser muy diferentes entre fermentación líquida y fermentación sólida, porque la relación área/volumen del medio líquido generalmente es varios órdenes de magnitud menor que en la delgada capa de agua extendida en soporte poroso que se da en la fermentación sólida. En un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de líquido, la relación  $a/v$  en la interfase es del orden de  $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ . En cambio si tal líquido se extiende en una capa delgada y uniforme de un espesor cercano a las 50 micras, el cociente  $a/v = 200 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ . Debido a que el transporte de oxígeno depende de este cociente, se puede inferir que será más rápido para la fermentación sólida que para la fermentación líquida.
- b) Los tiempos de mezclado serán mucho menores en el medio líquido que en el líquido agitado. En forma típica, un matraz Erlenmeyer agitado a 200 r.p.m. tendrá un tiempo de mezclado de unos pocos segundos, mientras que en una lámina de líquido no agitado, el tiempo de mezclado depende de la difusión de los solutos y típicamente está dada por el cociente,  $L^2/D_{\text{H}_2\text{O}}$ , siendo L la distancia promedio, entre los cúmulos de esporas sembradas, que en el medio de cultivo podrían estar separadas en forma típica, por distancias aproximadas de 100 a 1000 micras. El coeficiente de difusión de la glucosa en agua es  $D = 6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$ . El tiempo de mezclado resultante estaría en el intervalo de  $10^2$  a  $10^3$

seg. Esta diferencia física indica que sería más fácil formar microgradientes de solutos en la FS que en la FL, como, por ejemplo, gradientes de concentración de substratos, productos, enzimas excretadas al medio. Esta propiedad es muy usada para medir la potencia de excreción de productos en pruebas de halos de inhibición por antibióticos y halos de actividad enzimática.

- c) La forma de crecimiento típica para cada sistema de fermentación es muy diferente en FL y FS. En forma típica *Aspergillus niger* produce pellets cuando se cultiva en FL con substratos de fácil asimilación, en cambio, en FS, típicamente crece como micelio disperso con una apreciable proporción de la biomasa de tipo aéreo. Estas diferencias, conocidas desde hace mucho, sugieren que la fisiología de crecimiento y metabolismo entre fermentación sólida y líquida pueden ser muy grandes para cada uno de los sistemas de cultivo. Además, es sabido que los pellets de varios mm de diámetro sólo tienen una delgada capa de biomasa activa debido a los problemas difusionales en su interior (Pirt, 1975), lo que podría resultar en aún mayores diferencias fisiológicas entre ambos sistemas de cultivo.

Por lo tanto, en este estudio comparativo de la producción de enzimas de *Aspergillus niger* entre FL y FS deben de tomarse en cuenta estas diferencias para poder analizar y en su caso, explicar las posibles variaciones de productividad enzimática en cada medio de cultivo, y es importante estudiar dichas diferencias fisiológicas, usando coeficientes cinéticos de comparación relacionándolos con observaciones microscópicas del crecimiento del micelio.

## **Poliuretano**

Un novedoso método de fermentación en estado sólido se ha desarrollado utilizando espumas de poliuretano (PUF) como soporte inerte impregnando sobre él un medio de cultivo líquido sintético, donde se simula la composición nutricional y condiciones de cultivo que anteriormente se llevaba a cabo en salvado de trigo. Con este sistema, la biomasa, que es un parámetro importante para la evaluación de la fermentación en estado sólido puede ser medido directamente (Zhu y col., 1994). El PUF anteriormente fue utilizado por Fujishima en 1972, para la producción enzimática de varias especies de hongos. En 1994 Zhu y col., utilizaron PUF para producir nucleasa P1 de *Penicillium citrinum*. Desde entonces el PUF ha sido utilizado más como un proceso de inmovilización celular que como un proceso limpio de producción enzimática para la búsqueda de diseño de reactores más eficientes (inmovilización, detoxificación, obtención de metabolitos).

La composición del medio de cultivo es factor importante ya que influye sobre la diversidad y la calidad de las enzimas. La producción de enzimas en medio sólido con medios de cultivo sintéticos impregnados sobre soporte inerte, permite estudiar el comportamiento de los hongos filamentosos con relación a la composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad del agua, la liberación de calor, así como la influencia de la transferencia de gases. La recuperación de metabolitos en éstas condiciones se realiza por prensado lo que permite obtener un producto concentrado. En cultivos sólidos en los cuales el soporte es también el substrato, es difícil evaluar la influencia de un solo factor sobre el comportamiento de un microorganismo ya que en gran parte, estos substratos son muy complejos y dada su

composición se dificulta la determinación de los diferentes parámetros importantes en cultivos sólidos (Oriol y col., 1988).

La composición del poliuretano lo convierte en un medio ideal para el cultivo de hongos al permitir el crecimiento del hongo sobre las trabéculas que se forman en la espuma, además el poliuretano no atrapa el agua, por lo que no disminuye la  $A_w$  del medio de cultivo y no compite con el organismo por el agua libre.

La espuma atrapa una gran cantidad de aire lo que permite al hongo crecer en un medio rico en oxígeno. Al no ser biodegradable no produce efectos secundarios sobre la inducción o secreción de las enzimas y permite determinar de manera adecuada la biomasa producida por el microorganismo.

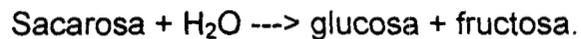
Nosotros usamos poliuretano como soporte inerte a fin de poder medir lo que realmente está pasando durante el cultivo de *Aspergillus niger* en fermentación sólida. El uso de este soporte permite regular perfectamente la presencia de inductores que determinan la producción de enzimas. Otra ventaja es que el poliuretano es no biodegradable, lo que permite llevar a cabo la determinación del peso seco real del hongo por gravimetría. La tercera ventaja está en la porosidad del material, que permite que los espacios del poliuretano se llenen de aire que es fácilmente utilizado por el hongo y que cumple con todas los requerimientos estipulados por Raimbault (1998) como necesarios para un soporte inerte de fermentación sólida.

Este trabajo representa un estudio sobre la metodología de cultivo de hongos filamentoso en soporte sólido inerte.

## Sacarosa

La sacarosa, comúnmente conocida como azúcar de mesa, es un disacárido compuesto por moléculas de  $\alpha$ -D-glucosa y  $\beta$ -D-fructosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídico. Cuando este enlace es roto, mediante una reacción hidrolítica, se liberan cantidades equimolares de glucosa y fructosa. Esta mezcla de monosacáridos se llama azúcar invertida, esto se deriva del hecho que la sacarosa desvía la luz polarizada hacia la derecha (dextrorrotatorio)  $+66.51^\circ$ , mientras que los productos de hidrólisis rotan la luz polarizada hacia la izquierda (levorrotación)  $-201^\circ$  para la mezcla ( $52.1^\circ$  para la D(+)-glucosa y  $92.1^\circ$  para la D(-)-fructosa). Otros disacáridos comunes son la maltosa y la lactosa.

La sacarosa es hidrolizada por la enzima invertasa o sacarasa de acuerdo con la reacción que se presenta a continuación.



Esta reacción es de gran interés para las industrias de bebidas y confites, porque el azúcar invertido es más dulce que la sacarosa, además, no se cristaliza y por ello es posible usarlo como jarabes concentrados estables, que de paso, tienen el doble de osmolaridad que los jarabes obtenidos como soluciones de sacarosa. Por esa razón, la hidrólisis de la sacarosa ha sido estudiada desde hace mucho tiempo y en especial, desde principios del siglo XIX, ha servido como modelo de la catálisis mediada por la enzima sacarasa, o más comúnmente, invertasa.

## **Invertasa**

El nombre oficial de la invertasa es  $\beta$ -fructofuranosidasa (EC3.2.1.26). Esto implica que la reacción catalizada por esta enzima es la hidrólisis de residuos terminales no reductores fructofuranosidos de  $\beta$ -fructofuranosidos. Esta reacción es compartida por la  $\alpha$ -D-glucosidasa, además la sacarosa puede hidrolizarse en medio ácido sin intervención de la invertasa.

La invertasa se utiliza principalmente en la industria de alimentos (confitería) donde la fructosa es preferible a la glucosa debido a que es más dulce y no cristaliza tan fácil. Sin embargo el uso de la invertasa es limitado debido a que la glucosa isomerasa puede ser utilizada para convertir directamente la glucosa en fructosa a un costo más bajo. Para el uso de la invertasa en alimentos se requiere de una proteína altamente purificada, a fin de no alterar el sabor y preservar la salud de las personas.

La invertasa es producida por una gran variedad de organismos que pueden utilizar la sacarosa como fuente de carbono. En el ámbito comercial la invertasa se produce principalmente por cepas de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis* (Carlson, 1987). Aún dentro del mismo cultivo de levaduras existen diferentes especies de invertasa. Por ejemplo, la invertasa intracelular tiene un peso de 135 KDa, mientras que la invertasa extracelular pesa 270 KDa (Gascon y col., 1968; Gascon y Lampen, 1968; Carlson y Botstein, 1982).

Contrariamente a la mayoría de las enzimas, la invertasa es muy tolerante a los cambios de pH, presentando una actividad relativamente alta entre pH de 3.5 a 5.5 con el máximo a pH 4.5. La actividad máxima se alcanza a 55°C. Los valores de Km

varían mucho de una especie a otra pero la mayoría se encuentran entre 2 mM a 5 mM, con un valor típico de 3 mM para la enzima libre (Boddy y col., 1993; Chen-Tien y col., 1994; Chen y Lui, 1996).

La invertasa es una enzima que es producida por plantas y microorganismos, en los últimos años esta enzima ha recibido mucha atención como un buen modelo para el estudio de enzimas glucosiladas secretadas por levaduras y hongos filamentosos que tienen como inductores de la síntesis de esta enzima a los azúcares, sacarosa y la rafinosa los cuales también funcionan como substratos para la invertasa extracelular de *Aspergillus niger* (Mukherjee y Sengupta, 1985; Quiroga y col., 1995; Perez y col., 1996).

Se ha estudiado recientemente la producción de invertasa por *Aspergillus niger* y *Aspergillus nidulans* en los siguientes reportes:

- Andres y Peberdy (1974) encontraron que la invertasa de *Aspergillus nidulans* fue localizada en el medio de cultivo y en la fracción de micelio lavado. La comparación de sus constantes cinéticas les permitió determinar que se trata de la misma enzima. Al parecer la enzima está localizada en el espacio intramural, al igual que en *Neurospora crassa*. La glucosa presenta un importante papel en la represión de la producción invertasa en *A. nidulans*. El micelio crecido en medio con glucosa presentó represión catabólica y produjo 6 veces menos invertasa que el micelio crecido en sacarosa. Altas concentraciones de glucosa produjeron una dilación en el tiempo de producción de la invertasa, pero al disminuir la cantidad de glucosa en el medio de cultivo se inició la producción de la invertasa.

- Vainstein y Peberdy (1990) encontraron que aproximadamente el 50% de la invertasa total producida por *Aspergillus nidulans* en FL está asociada al micelio y parece estar localizada en el espacio periplásmico. De ésta, aproximadamente el 60% puede ser liberada por tratamiento mecánico del mismo. El resto se libera por acción de químicos como el DTT y la proteasa K. La liberación de la invertasa por acción mecánica, por la acción de agentes reductores o por la proteasa K, les permite suponer que la invertasa está físicamente confinada en el espacio periplásmico en lugar de estar asociada a la pared celular.
- Boddy y col. (1993) purificaron la invertasa de *Aspergillus niger* y localizaron dos genes de expresión de esta enzima. Encontraron que la actividad óptima de la invertasa se lleva a cabo a un pH de 5.5, y 50°C. Su peso molecular fue de 115 KDa, mientras que el peso nativo fue de 225 KDa. Al parecer el 50% de la masa molecular está formada por hidratos de carbono.
- Chen y col. (1996) purificaron dos invertasas de *Aspergillus nidulans* producidas por fermentación líquida. Estas invertasas se sintetizan al parecer del mismo gen. Las invertasas presentaron características muy parecidas y se diferenciaron por presentar un patrón de corrimiento en electroforesis muy diferente. Una pesa alrededor de 135 KDa y la otra alrededor de 250 KDa. Al parecer, la diferencia en el peso se debe la presencia de una gran cantidad de glucosilación en uno de los tipos moleculares.
- Wallis y col. (1997) reportaron que *Aspergillus niger* produce dos invertasas que se secretan y que presentan características muy semejantes, aún cuando son sintetizadas a partir de dos genes diferentes. Se les diferencia por la cantidad de

glucosilación que contienen, aunque, no queda claro si se trata de genes que responden a diferentes condiciones de cultivo.

### **Proteasas**

Los hongos filamentosos son capaces de secretar cantidades muy grandes de proteínas al medio de cultivo, pero la degradación de éstas por las proteasas secretadas al medio de cultivo disminuye en gran medida el rendimiento de los cultivos (Archer, 1994).

Se han buscado varios métodos para disminuir la secreción de proteasas en los cultivos de hongos filamentosos. Uno de ellos es la inmovilización, que ha sido utilizada para disminuir la producción de proteasas por Liu y col. (1998), quienes demostraron que al cultivar *Aspergillus niger* sobre partículas metálicas recubiertas con látex se secretaron menores cantidades de proteasas y mayores cantidades de glucoamilasa.

Desde 1993, Ramamurthy y Kothari, mostraron que al cultivar *Rhizopus sp*, en superficie se produjeron menos proteasas que en los cultivos en fermentación líquida. Por otra parte, los trabajos de Aguilar y Diaz-Godínez (comunicaciones personales), han dado indicaciones de que al cultivar a *Aspergillus niger* en fermentación sólida se secretaron menores cantidades de proteasas al medio de cultivo.

## Antecedentes.

A continuación se presenta un resumen de los trabajos que comparan la producción de metabolitos en fermentación sólida y líquida y que se han publicado durante los últimos años:

Ramesh y Lonsane, (1991a) cultivaron *Bacillus licheniformis* en fermentación líquida y sólida para producir  $\alpha$ -amilasa y compararon ambos tipos de cultivo. En FL se produjeron 480 U/ml de extracto a las 60 horas de cultivo y al añadir 1% de glucosa al medio de cultivo solo se obtuvieron 30 U/ml. Mientras que en fermentación sólida se produjeron 13860 U/ml de extracto a las 48 horas de cultivo.

El análisis de la concentración de glucosa libre en ambos medio dio un 0.2% en FL contra un 8.5% de glucosa libre en el salvado de trigo donde se llevo a cabo la FS, esto es una concentración 42 veces mas alta de glucosa libre en FS comparada con FL.

La presencia de 1% de glucosa en el medio de cultivo disminuyó en un 84 % la producción de  $\alpha$ -amilasa en FL. La producción de  $\alpha$ -amilasa fue 29 veces mas alta que en FL, la productividad enzimática de la FS fue 36 veces más alta que en la FL.

La presencia de una alta concentración de substrato sin represión catabólica, permite la producción de altos niveles de enzima y por lo tanto es la responsable de la alta productividad del medio sólido

Posteriormente Ramesh y Lonsane, (1991b) estudiaron el efecto del tipo de cultivo sobre la represión catabólica de la producción de  $\alpha$ -amilasa por *Bacillus licheniformis*. Encontraron que la presencia de mas de 1% de glucosa inhibió

totalmente la síntesis de  $\alpha$ -amilasa en FL, mientras que al añadir un 15% de glucosa se incremento en un 50% la producción de amilasa de la FS. en FS no se observó efecto de represión, y esta cantidad de glucosa acortó el tiempo de producción de 71 a 48 horas. Formulan la hipótesis que en la FS se forman gradientes en la vecindad del organismo debido a la falta de mezclado, de tal manera que la concentración local de substrato es menor a la real. Por lo que el organismo puede desarrollarse sin represión catabólica.

Solis-Pereira y col. (1993) compararon la producción de pectinasas por *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida. Añadieron concentraciones 3.5 a 10% de sacarosa, glucosa y ácido galacturónico al medio de carbono. Con la adición de 3.5% de monosacáridos se inhibió la producción de endopectinasa, pero en fermentación sólida la adición de hasta un 10% de monosacáridos resultó en el incremento de la producción de pectinasas 19 veces mas endopectinasas y 4.9 veces mas exopectinasas que en la FS control sin monosacáridos. Se acumularon azúcares reductores en FL, pero no se acumularon en FS, encontraron que la producción de pectinasas esta relacionada con la concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo. Atribuyeron estas diferencias a la falta de mezclado en FS y a problemas de difusión de los nutrientes en FL, un papel importante a la presencia de altos niveles de azúcares reductores que producen represión catabólica en FL y que no están presentes en FS.

Antier y col. (1993) obtuvieron cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de pectinasas especializadas para fermentación sólida y fermentación líquida. Las

cepas sobreproductoras en fermentación sólida resultaron productoras mediocres en fermentación líquida y viceversa. Esto sugiere la idea de la presencia de grupos genes bajo regulación pleiotrópica que le permiten a las cepas presentar resistencia a 2DG y una menor represión catabólica en la producción de pectinasa especializadas para FS y FL .

Lekha y Lonsane (1994) compararon la producción de tanasa por *Aspergillus niger* en FS sobre bagazo de caña, FL, fermentación líquida superficial. Encontraron que la producción de tanasa en FS fue de 150 U/ml a las 96 h de cultivo, mientras que en FL obtuvieron 50 U/ml a las 144 h de cultivo, la producción de tanasa fue cerca de 3 veces más grande en FS que en FL, y se necesitó menor tiempo para obtener la producción máxima, por lo que la productividad de FS fue 5 veces mayor que la de FL. La tanasa producida en fermentación sólida fue totalmente extracelular, mientras que fue totalmente intracelular en FL durante las primeras 48 horas de cultivo. La tanasa obtenida por FS presentó una mayor estabilidad a temperatura y pH extremo que la producida por FL. Atribuyeron estas diferencias a cambios en la expresión y conformación de las proteínas, así como a una secreción activa de la tanasa en FS.

Acuña-Argüelles y col., (1995) compararon la producción de pectinasas por *A. niger* en fermentación líquida y fermentación sólida sobre bagazo de caña. Los títulos enzimáticos fueron 3 a 20 veces más altos y se obtuvieron entre 24 y 72 horas y más rápido en FS que en FL, la FS resultó ser entre 6 y 51 veces más productiva que la FL, dependiendo del tipo de enzima. Atribuyen estas diferencias a la presencia de altas cantidades de azúcares reductores en la FL, que no se acumulan en la FS y por

ende suponen la existencia de represión catabólica en líquido que no se presenta en sólido.

Lapadatescu y Bonnarne, (1999) compararon la producción de aromatizantes por *Bjaerkandera adusta* en fermentación líquida y sólida sobre salvado de trigo. Obtuvieron la máxima producción con 0.34 g/Kg de materia húmeda a los 4 días en FS y 0.04 g/l de medio a los 8 días en FL. La producción resultó ser casi 10 veces mayor en FS y la productividad de los cultivos de FS fue 27 veces más alta que la de los cultivos de FL. Atribuyeron el buen comportamiento del hongo en FS a que las condiciones de cultivo son muy parecidas a las de su hábitat natural.

De los trabajos anteriores se puede extraer la siguiente información relevante:

5. La producción de metabolitos en FS es mayor y los picos se obtienen en menores tiempos de cultivo. Por lo tanto los cultivos de FS son mas productivos que los de FL, pero las razones de esto son desconocidas.
6. La menor represión catabólica en FS se asocia con la mayor productividad este tipo de fermentación. Aunque se desconoce el nivel de participación en este resultado.
7. La presencia de azúcares reductores en FL y su ausencia en FS ha sido relacionada por varios autores con las diferencias que se presentan en la represión catabólica de ambos sistemas de cultivo.
8. La formulación de la hipótesis de que las diferencias entre FS y FL podrían estar relacionadas con las formación de gradientes en FS.

9. El que todos estos trabajos han sido llevados a cabo sobre soportes biodegradables. Esto ha impedido la obtención de parámetros cinéticos de crecimiento y producción enzimática.

### **Justificación**

Las citas anteriores reportan muchas ventajas de la FS sobre la FL, pero se dan también una serie muy amplia de posibles explicaciones. De acuerdo con Pandey y col. (1999), es clara la ventaja de la FS sobre la FL, pero hasta el momento se ignora cuál es la razón exacta de esta mayor productividad de la FS. Esta diferencia puede deberse a una mayor productividad de la biomasa, a un mayor rendimiento enzimático por gramo de biomasa, a una menor desrepresión catabólica o a la combinación de varios de estos factores. Saber cuál es el origen de las diferencias más importantes entre ambos sistemas de cultivo puede ser de gran interés para el diseño, operación y mejoramiento de la producción, pero la falta de estudios básicos de la FS, como una determinación directa de los parámetros de crecimiento y producción enzimática ha impedido que se determine de manera clara cuales son las razones de la mayor producción enzimática en este sistema de cultivo. Por esto en este trabajo nos proponemos responder a cual de estas posibles razones son las principales para explicar las diferencias reportadas entre FS y FL.

La selección del sistema modelo de la producción de invertasa por *Aspergillus niger*, para el estudio de las diferencias existentes entre FL y FS, se basó en los siguientes hechos:

*Aspergillus niger* es un hongo filamentoso que se emplea ampliamente para la obtención de enzimas y ácido cítrico a nivel industrial. Además, es un organismo modelo muy utilizado para el estudio del crecimiento y la secreción de enzimas por hongos filamentosos.

La invertasa es una enzima modelo muy adecuada para el estudio de la producción y secreción enzimática. Ha sido estudiada a fondo durante los últimos años, se conoce la secuencia completa de los dos genes de invertasa de *Aspergillus niger* y se conoce que en condiciones normales solo se expresa uno de estos genes.

## Objetivos

- Describir y comparar el crecimiento, producción enzimática y consumo de sustrato en *Aspergillus niger* durante su cultivo en fermentación líquida y fermentación sólida.
- Documentar y comparar el tipo y las condiciones de cultivo de *Aspergillus niger* crecidos en fermentación líquida y fermentación sólida.

## **Hipótesis**

Se supone que la mayor productividad de la fermentación sólida sobre la fermentación líquida, es debida principalmente a una mayor y más rápida producción de biomasa en fermentación sólida, dando como resultado un mayor y mas rápida acumulación de enzimas hidrolíticas en el medio de cultivo.

## Material y Métodos

Microorganismos: Se utilizaron tres cepas de *Aspergillus niger*, C28B25 que fue recolectada de un cafetal de Chiapas y seleccionada como productora de pectinasas por Boccas y col. 1994); Aa20 proveniente del cepario UAM-IRD y la cepa silvestre N402, ampliamente utilizada como cepa modelo para estudiar la genética de *Aspergillus niger* (Bos y col., 1988). Todas las cepas fueron mantenidas en viales de resiembra con medio PDA a 4°C y se resembraron cada 4 meses. Los cultivos para inóculo se cultivaron en PDA durante las 72 horas previas a las fermentaciones.

Medios de cultivo: Se formuló el medio de cultivo en base al medio de Pontecorvo (Pontecorvo y col. 1953) modificado de la siguiente manera, NaNO<sub>3</sub> 15.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76, KCl 0.76, MgSO<sub>4</sub> 0.76, FeCl<sub>2</sub> 0.001, CuSO<sub>4</sub> 0.001, MnCl 0.001, ZnCl 0.001 en g/l. El pH del medio se ajustó a 4.5 y se añadieron 100 g/l de sacarosa, el medio completo se utilizó diluido hasta ajustar la concentración inicial de sacarosa a 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 g/l. el medio se esterilizó a 10 PSI por 15 minutos. La inoculación se realizó con  $2 \times 10^7$  esporas por gramo de fuente de carbono. El mismo medio inoculado se repartió en los cultivos líquido y sólido.

Fermentación Líquida: La fermentación líquida se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, llenos con 25 ml de medio ya inoculado. Se incubaron a 30°C en una incubadora orbital a 200 r.p.m. por el tiempo requerido

Fermentación Sólida: 25 ml de medio inoculado se mezclaron con 1 gramo de poliuretano estéril preparado como se describe más adelante dentro de un matraz de Erlenmeyer de 250 ml. Se incubaron a 30°C por el tiempo requerido antes de cosecharlos.

Preparación del Poliuretano: La espuma de poliuretano con una densidad media de 17 Kg/m<sup>3</sup>, se compró de un proveedor comercial, se cortó en cubos de 5mm por lado y se lavó dos veces con agua caliente. El poliuretano ya lavado se escurrió y se secó en un horno a 70° C durante toda la noche. Posteriormente, se introdujo 1 gramo de poliuretano seco en cada uno de los matraces Erlenmeyer y se esterilizó en autoclave a 15 psi por 15 minutos.

Determinación de la Biomasa en Fermentación Líquida: Los cultivos de fermentación líquida se retiraron en los tiempos adecuados y se filtraron a través de papel filtro Whatman No.1; la biomasa retenida se lavó con 100 ml de agua destilada y se secó en el horno a 70°C, ocasionalmente una cuarta parte de la biomasa se retiró y se utilizó para determinar la actividad de invertasa intracelular, en estos cultivos la biomasa se determinó por medio de la fracción usada para la determinación de la biomasa seca.

Determinación de la Biomasa de Fermentación Sólida: El poliuretano utilizado para el crecimiento del hongo se extrajo del matraz y se presionó para obtener el extracto de

fermentación sólida; este poliuretano lavado se secó a 70°C, para determinar la fracción de peso seco perteneciente a la biomasa. Ocasionalmente se utilizó un gramo en peso fresco del poliuretano para determinar actividad intracelular y se procedió igual que en FL.

Determinación de la Evaporación del Medio de Cultivo en fermentación sólida: Se prepararon 4 matraces de peso seco conocido con un gramo de poliuretano estéril, se les añadieron 25 ml de medio estéril a dos de ellos y 25 ml medio inoculado a otros dos. Se determinó el peso total al inicio y cada 24 horas hasta las 72 horas de cultivo. Al final se extrajo el poliuretano, se lavó con 50 ml de agua destilada y se determinó la cantidad de biomasa producida. A partir de estos datos se determinó la cantidad de agua evaporada en los matraces con y sin micelio.

#### Extracción de Enzimas:

Los extractos de fermentación líquida se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se ensayó fresco para determinar la actividad de invertasa. La enzima de FS se extrajo por presión suave del poliuretano. El líquido se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se utilizó fresco para determinar la actividad de invertasa.

Extractos Intracelulares: Los extractos intracelulares se obtuvieron congelando el micelio o el micelio más el poliuretano y moliéndolo en un mortero frío hasta obtener un polvo fino que se resuspendió en buffer frío de acetatos 0.1 M (pH 5.5), la parte

soluble se separó por filtración y se ensayó en menos de 6 horas. A la parte insoluble se le determinó la actividad de invertasa sin encontrar actividad significativa en ninguno de los dos sistemas de cultivo.

#### Ensayos Enzimáticos:

La actividad de invertasa se determinó por medio de la liberación de azúcares reductores, los cuales se determinaron por DNS (Miller, 1959). Las condiciones de ensayo fueron 30 minutos a 30°C, 0.1 M de sacarosa 0.35 ml, buffer de acetatos 0.1 M con pH 5.5, 0.5 ml y se utilizaron 0.15 ml de extracto enzimático diluido de ser necesario. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcares reductores por minuto.

Aspartato-amino-transferasa: La Aspartato-amino-transferasa se determinó por medio de un kit enzimático de Manhiem Boheringer. Esta enzima se utilizó como marcador de proteínas intracelulares en el medio extracelular.

Determinación de Actividad de Proteasas: Las proteasas se determinaron de acuerdo con el método de Chavira y col. (1984) por medio de la liberación del grupo azo del azocoll (Sigma, USA) se incubó a 30°C por 15 minutos en un mililitro de buffer de acetatos 0.1 M pH 4.5 y 50 microlitro de azocoll con 200 microlitros de extracto, una unidad se define como la proteasa necesaria para incrementar la absorbancia de la mezcla de reacción en 0.01

Determinación de Azúcares Residuales: Se utilizó un kit enzimático de Boehringer-Mannheim, No 716-260 para poder determinar los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa en los extractos de fermentación.

Cálculo de Variables de Crecimiento:

La velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) se estimó por medio de la ecuación logística:

$$X = X_{\max}/[1 + C \cdot \exp(-\mu t)]$$

Donde,  $C = (X_{\max} - X_0)/X_0$ , siendo  $X$ , el valor puntual de la biomasa,  $X_0$  (gX/l), el valor inicial de biomasa en (gX/l),  $X_{\max}$  el valor máximo de biomasa (gX/l),  $\mu$ , la velocidad específica de crecimiento (1/h) y  $t$  el tiempo de cultivo (h).

Para estimar el valor de  $\mu$  se ajustaron los datos experimentales por la minimización de la suma de los errores cuadrados usando un algoritmo Newton-Raphson de optimización presente en el programa Excel de Office Microsoft.

El rendimiento de enzima por gramo de biomasa producida ( $Y_{E/X} = U/gX$ ), se estimó considerando a  $Y_{E/X} \approx \Delta E/\Delta X$ . Donde,  $E$  es la producción enzimática en U/l y  $X$  es la producción de biomasa en gX/l. Se ajustó una recta a los datos experimentales por el método de mínimos cuadrados. Solo se consideraron adecuados los ajustes con una  $R^2$  mayor a 0.85.

La productividad enzimática ( $P=U/h$ ), fue estimada en termino del líquido empleado en el valor pico de producción enzimática en ambos tipos de cultivo para cada una de las cepas.

El rendimiento de biomasa por gramo de substrato consumido ( $Y_{X/S}=gX/gS$ ), se calculó dividiendo la biomasa máxima obtenida entre la cantidad de substrato consumido por el hongo durante la fermentación.

La tasa específica de consumo de substrato ( $q_s=gS/gXh$ ), se calculó al de dividir el valor de la  $\mu$  entre  $Y_{X/S}$  para cada uno de los cultivos analizados.

La tasa específica de producción enzimática  $q_p$  ( $U/gXh$ ), se calculó por el producto de el valor de la  $\mu$  por el valor de la  $Y_{E/X}$  para cada uno de los cultivos analizados.

Los resultados presentados en la tabla 3.2.3 se compararon por análisis de varianza de una sola vía ( prueba de F) con dos niveles de significancia estadística  $p<0.01$  \*\* muy significativa (\*\*), y  $p<0.05$  \* significativa (\*). El resto de las diferencias se consideraron no significativas.

Microfotografías: Las microfotografías se obtuvieron por medio de un fotomicroscopio NIKON modelo HFX-DX, dotado de iluminación por campo claro, interferencia de

fases e iluminación indirecta por fibra óptica. Las fotografías se tomaron con ampliaciones de 50X a 400X, tal como se indica en cada imagen.

### 3 Resultados y discusión

#### 3.1 Efecto de la concentración inicial de sacarosa sobre la producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida.

Se comparó el efecto de la cantidad inicial de sustrato sobre el crecimiento y la producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación sólida y fermentación líquida

La figura 3.1.1 se presenta la producción de biomasa por la cepa C28B25 con concentraciones que van de 6.25 a 100 g/l de sacarosa inicial en fermentación líquida.

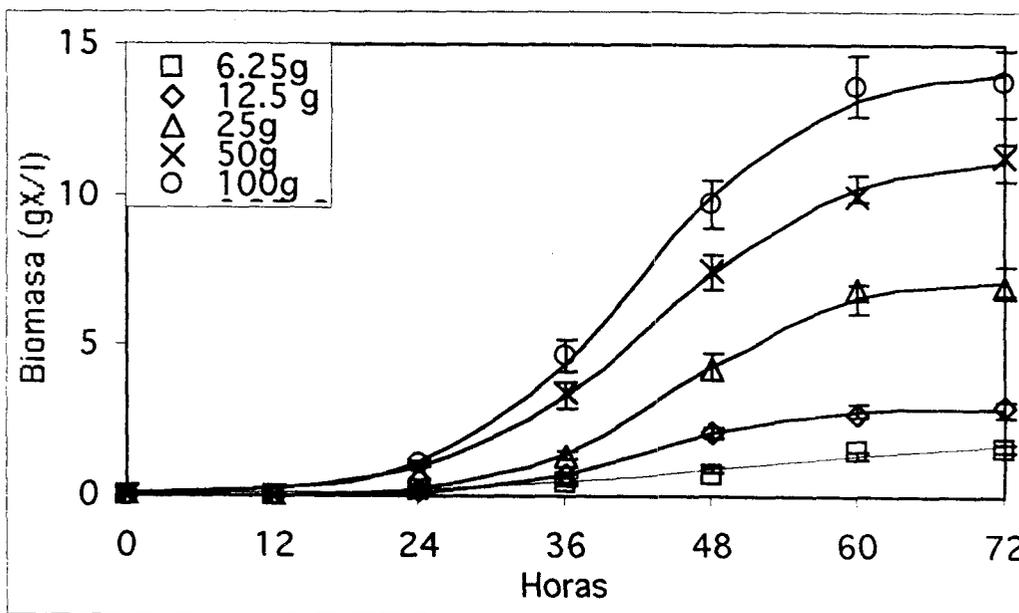


Figura 3.1.1 Biomasa producida por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida con diferentes concentraciones de sustrato inicial, los valores experimentales se representan como símbolos y los valores ajustados por la ecuación logística se representan como líneas continuas.

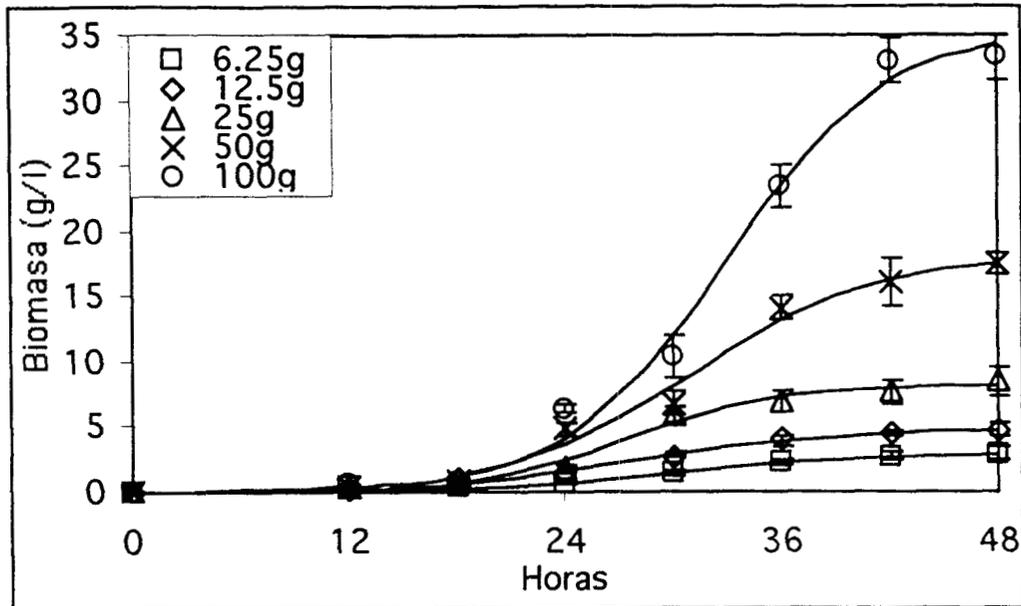
El cultivo con 6.25 g/l de sacarosa alcanzó un valor de 1.6 g/l de biomasa máxima; con 12.5 g/l de sacarosa inicial la biomasa se acumuló hasta los 2.7 g/l; al añadir 25

g/l de sacarosa el cultivo acumuló biomasa hasta 6.9 g/l; durante las primeras 60 horas de cultivo, con 50 g/l se observó que la biomasa se acumuló hasta un máximo de 11.3 g/l, con 100 g/l se obtuvieron 13 g/l de biomasa.

La biomasa se acumuló entre las 24 horas y las 60 horas en la mayoría de los cultivos y no se observaron diferencias de los tiempos de fermentación, a pesar de la utilización de altas cantidades de sacarosa inicial como sería de esperar. Esto ya ha sido reportado por Favela-Torres y col, 1996, quienes encontraron que al utilizar 50 o 100 g/l de glucosa inicial en cultivos de *Aspergillus niger* no hay efecto sobre los tiempos de germinación por la alta concentración de glucosa y solo los cultivos con 200 g/l de glucosa mostraron un retraso en los tiempos de germinación.

La figura 3.1.2 muestra la producción de biomasa de la cepa C28B25 en fermentación sólida con concentraciones de 6.25 a 100 g/l de sacarosa inicial.

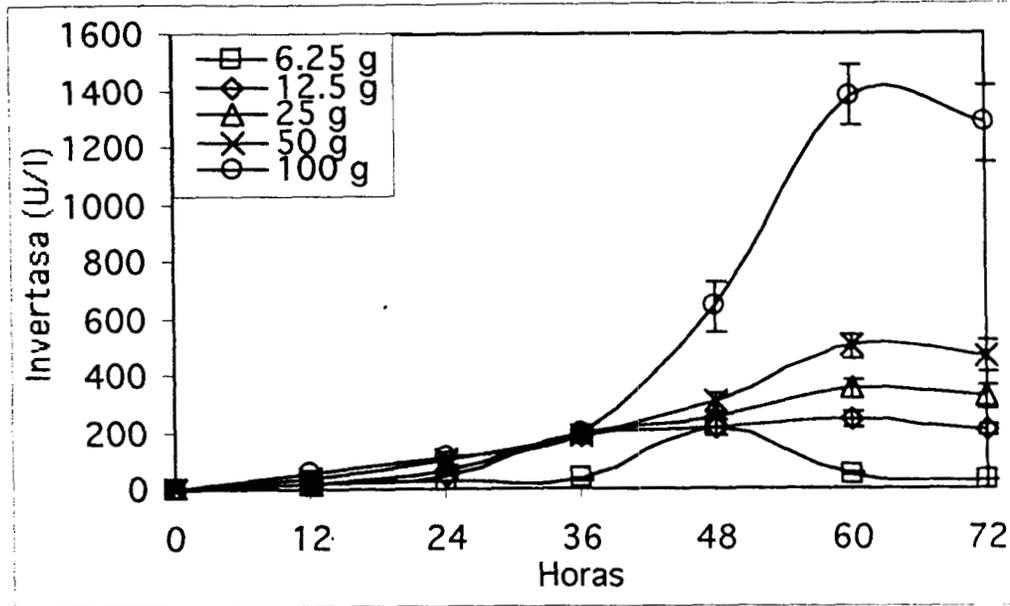
Se obtuvieron 2.7, 4.7, 8.7, 14 y 33 g/l de biomasa máxima con 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 g/l de sacarosa inicial respectivamente. Los tiempos de fermentación necesarios para alcanzar la biomasa máxima con todas las concentraciones de sacarosa fueron menores en FS (alrededor de las 42 horas) que en FL (alrededor de las 60 horas). Estos tiempos son parecidos a los reportados por Favela-Torres y col, 1996, quienes observaron que son necesarias 40 horas de cultivo en la fermentación sólida y 60 horas en la fermentación líquida para llegar a la máxima acumulación de biomasa de los cultivos utilizando 50 y 100 g/l de glucosa. Las curvas de crecimiento son también muy parecidas a las reportadas en ese trabajo.



**Figura 3.1.2** Biomasa producida por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación sólida con diferentes concentraciones de sustrato inicial, los valores experimentales se representan como símbolos y los valores ajustados por la ecuación logística se representan como líneas continuas.

En la figura 3.1.3 se presenta la producción de invertasa por *Aspergillus niger*, con 6.25 a 100 g/l de sacarosa inicial.

La actividad máxima de 215 U/l de invertasa se alcanzaron en el cultivo con 6.25 g/l de sacarosa inicial, con 12.5 g/l. Se obtuvieron 244 U/l, con 25 g/l se obtuvieron 350 U/l. Al utilizar 50 g/l de sacarosa se alcanzaron 500 U/l de invertasa y el cultivo con 100 g/l de sacarosa inicial produjo 1380U/l. El incremento con 100 g/l no corresponde a lo esperado con la hipótesis de que una alta cantidad de sacarosa en el sustrato inicial debe resultar en una baja producción enzimática debida a la represión catabólica.

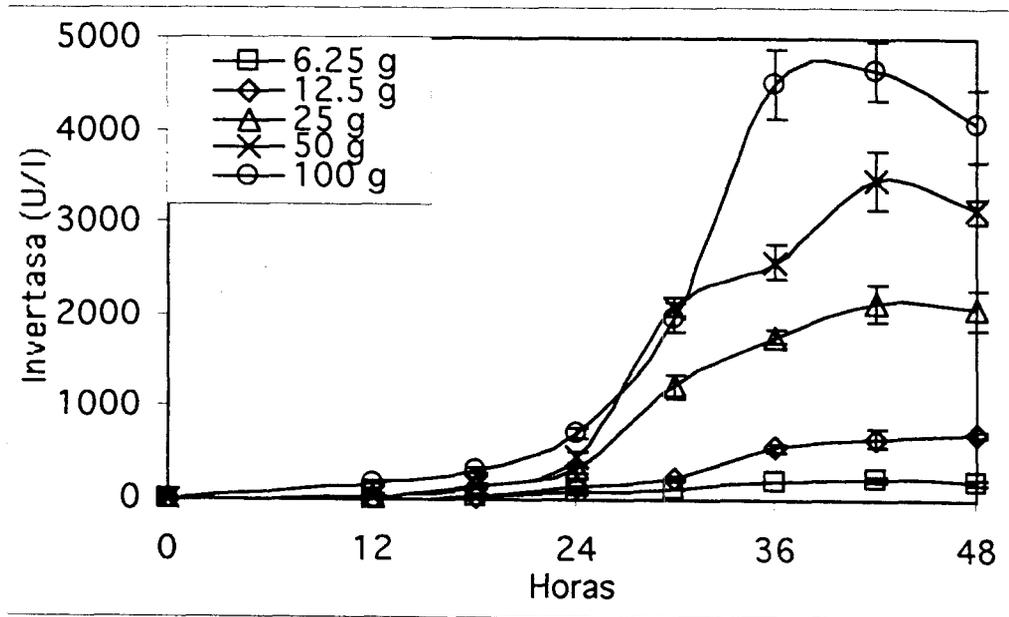


**Figura 3.1.3 Producción de invertasa por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida con diferentes cantidades de sacarosa inicial.**

Al comparar esta figura con la de crecimiento se puede observar que el aumento en la producción de invertasa con 100 g/l es mayor al aumento de la biomasa de los mismos cultivos. De hecho parece que puede dividirse en dos grupos con el de 100 g/l de sacarosa como un cultivo *sui generis*, que no parece presentar represión catabólica, pero, si muestra limitaciones en la biomasa producida por el cultivo. Esto puede explicarse de acuerdo con Xu y col. (1989) y Kubicek-Pranz y col. (1990) quienes afirman que la presencia de 50 gramos o más de una fuente de carbono de fácil asimilación como sacarosa o glucosa induce la síntesis de una alta concentración de Fru-6P. La concentración de Fru-6P regula la velocidad de la glucólisis, lo que a su vez modifica la concentración de piruvato resultante, el cual afecta la velocidad del ciclo de Krebs por medio de la regulación de la citrato sintetasa. Cuando la concentración de piruvato es muy alta, la Fru-6P se desvía

hacia el ciclo de las pentosas, y provoca la substitución del ciclo de Krebs por el ciclo anaplerótico del citrato, en el cual no se produce NADH. Todo lo anterior obliga a utilizar a la glucólisis como fuente principal de ATP, lo que obliga a un mayor consumo de glucosa y fructosa. Lo que de acuerdo con Nielsen, (1992) podría ser responsable de una producción aumentada de invertasa en cultivos líquidos con alta concentración de sacarosa o glucosa.

En la figura 3.1.4 se presentan las curvas de producción de invertasa por *Aspergillus niger* C28B25 con concentraciones crecientes de sacarosa inicial.



**Figura 3.1.4 Producción de invertasa por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación sólida con diferentes cantidades de sacarosa inicial.**

Los cultivos con 6.25 g/l de sacarosa produjeron 220 U/l de invertasa, con 12.5 g/l de sacarosa la producción máxima de invertasa se alcanzó con 713 U/l, en los cultivos con 25 g/l de sacarosa la invertasa llegó hasta 2128 U/l, con 50 g/l de sacarosa se

alcanzaron las 3460 U/l, al añadir 100 g/l de sacarosa inicial al cultivo se obtuvieron 4650 U/l de invertasa.

La figura 3.1.5 muestra la concentración de azúcares residuales en fermentación líquida.

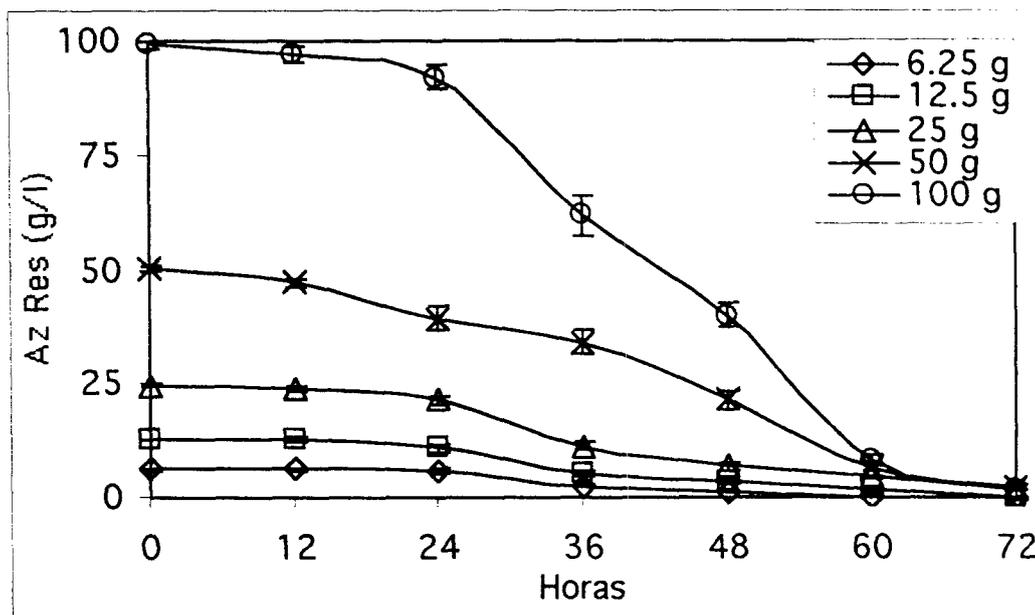


Figura 3.1.5 Concentración de azúcares residuales (Az Res) en cultivos de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida con diferentes cantidades de sacarosa inicial.

En la figura 3.1.5 se observa que durante la fase de adaptación de los cultivos (24 h) el consumo de sacarosa fue muy bajo. Después de este tiempo, la sacarosa fue consumida de manera continua y se agotó entre las 60 y las 72 horas de fermentación. Es de especial interés indicar que la sacarosa fue consumida casi totalmente en todos los cultivos, hasta en aquellos con 100 g/l de sacarosa, ya que

en este cultivo el consumo de la substrato resulta muy alto dada la baja cantidad de biomasa que se produjo.

En la figura 3.1.6 se muestra la concentración de azúcares residuales en fermentación sólida.

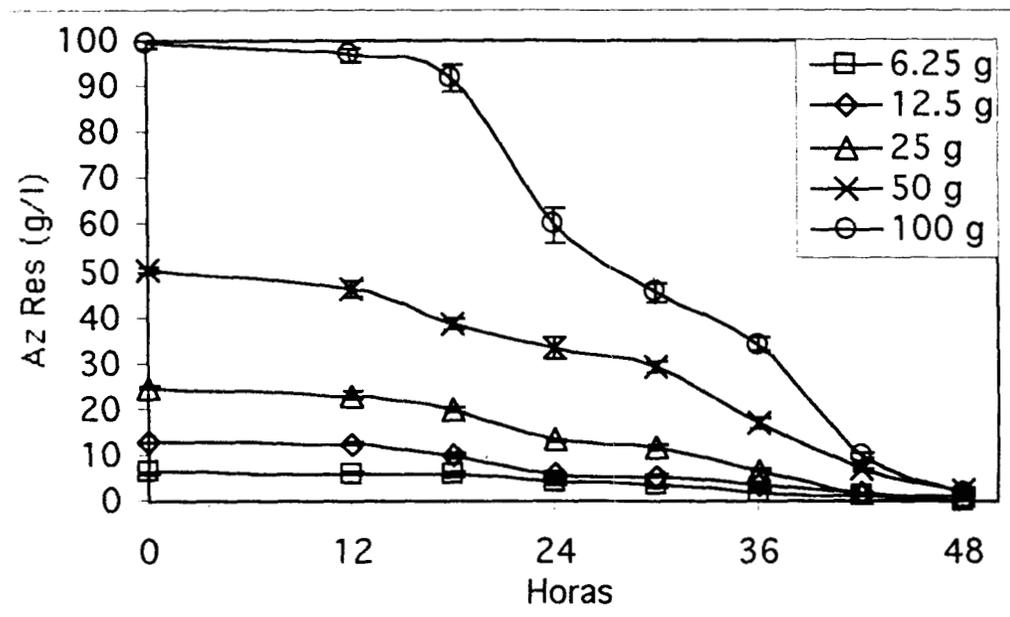


Figura 3.1.6 Concentración de azúcares residuales (Az Res) en cultivos de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación sólida con diferentes cantidades de sacarosa inicial.

El consumo de sacarosa en fermentación sólida se inició tras 12 horas, lo que podría corresponder con el tiempo de germinación de los cultivos. La sacarosa se agotó alrededor de las 42 a las 48 horas en todos los niveles de sacarosa inicial. El consumo total de sacarosa se llevo en menor tiempo en fermentación sólida que en fermentación líquida y esto se correlaciona con los resultados presentados en esta sección, donde los cultivos sólidos tienen una mayor velocidad de crecimiento y

mayores rendimientos de biomasa por g de substrato más altos que en la fermentación líquida.

La figura 3.1.7 muestra los perfiles de pH de cultivo de *Aspergillus niger* en fermentación líquida con cantidades crecientes de sacarosa inicial.

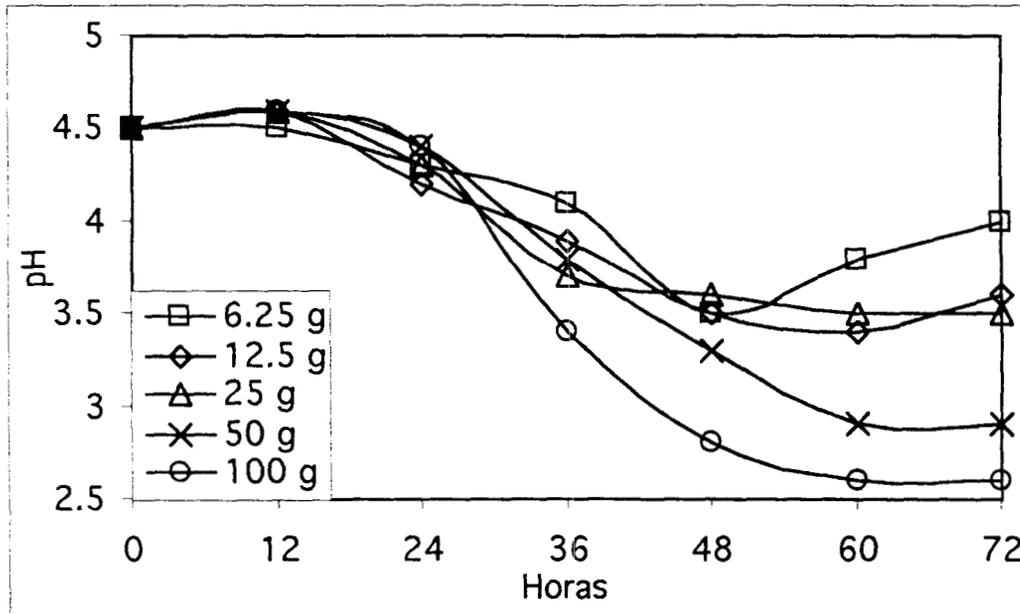


Figura 3.1.7 Perfil de pH de cultivos de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida con diferentes cantidades de sacarosa inicial.

Puede observarse que todos los cultivos presentaron un descenso en el valor de pH durante el tiempo de cultivo, y esta disminución es mayor al aumentar de la cantidad de sacarosa inicial. En especial los cultivos con 50 y 100 g/l de sacarosa inicial mostraron una mayor disminución del pH durante los tiempos finales de fermentación. Este comportamiento, unido a la baja producción de biomasa, podría atribuirse a la producción de ácidos orgánicos y polioles liberados al medio de cultivo.

En la figura 3.1.8 puede observarse que los cultivos siguieron perfiles de disminución de pH muy parecidos entre sí y que el cultivo de 6.52 g/l en medio sólido mostró un pequeño ascenso del pH al final de la fermentación, mientras que el cultivo de 100 g/l de sacarosa presentó los valores más bajos de pH de todos. Los valores de pH fueron en casi todos los casos general mayores que los obtenidos en fermentación líquida. Lo que indica una menor producción de ácidos orgánicos en fermentación sólida

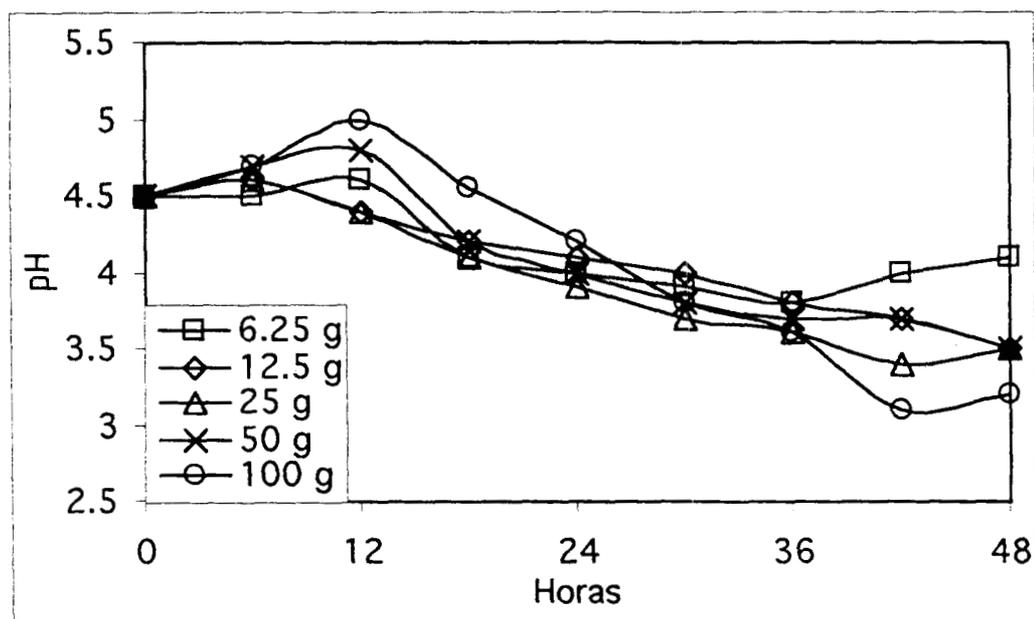


Figura 3.1.8 Perfil de pH de cultivos de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación sólida con diferentes cantidades de sacarosa inicial.

En la tabla 3.1.9 se muestran los valores obtenidos para los parámetros cinéticos de *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida con concentraciones crecientes de sacarosa inicial, como fuente de carbono.

**Tabla 3.1.9 Parámetros calculados para *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida.**

So (g/l)	$\mu$		$Y_{E/X}$		$Y_{X/S}$		$q_s$		$q_p$	
	Líquido	Sólido	Líquido o	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido
6.25	0.09	0.17	235.0	90.6	0.16	0.50	0.58	0.35	22.14	15.66
r2	0.99	0.99	0.85	0.98						
12.5	0.18	0.17	81.1	158.5	0.23	0.38	0.76	0.45	14.30	27.35
r2	0.99	0.99	0.90	0.98						
25	0.15	0.26	48.0	273.4	0.27	0.36	0.57	0.71	7.33	70.04
r2	0.99	0.99	0.94	0.99						
50	0.13	0.20	43.7	208.1	0.24	0.38	0.52	0.52	5.49	41.36
r2	0.99	0.99	0.98	0.96						
100	0.14	0.22	85.9	148.3	0.15	0.32	0.94	0.70	11.77	33.25
	0.99	99.00	0.97	0.90						

Se muestran los valores obtenidos de los ajustes de la  $\mu$ , la  $Y_{E/X}$ , junto con los valores de correlación de los valores experimentales y los valores calculados para ambos parámetros.

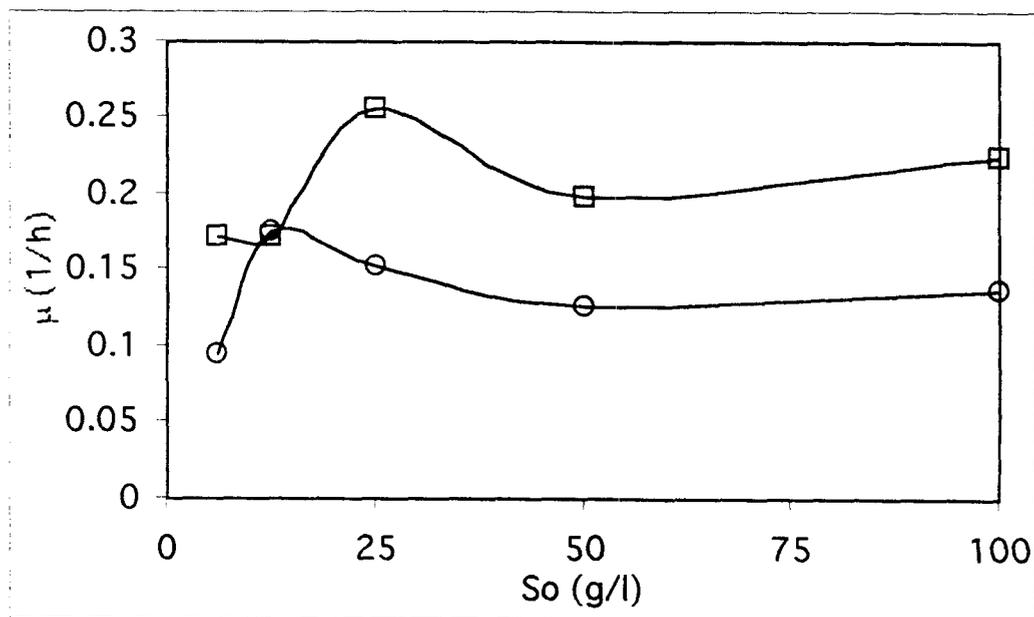
Los valores de correlación de los ajustes son altos para ambos parámetros

Es de especial importancia comentar los altos valores de correlación de los ajustes de la  $Y_{E/X}$  lo que nos permite afirmar que la producción de invertasa esta al menos parcialmente relacionada con la producción de biomasa en ambos tipos de cultivo,

sin embargo el nivel de análisis de este trabajo impide determinar el nivel exacto de relación entre ambas.

Las tendencias de los valores se presentan y analizan en las paginas siguientes.

La figura 3.1.10 muestra los valores de  $\mu$  obtenidos para los cultivos de fermentación líquida y fermentación sólida de *Aspergillus niger* con concentraciones crecientes de sacarosa inicial.

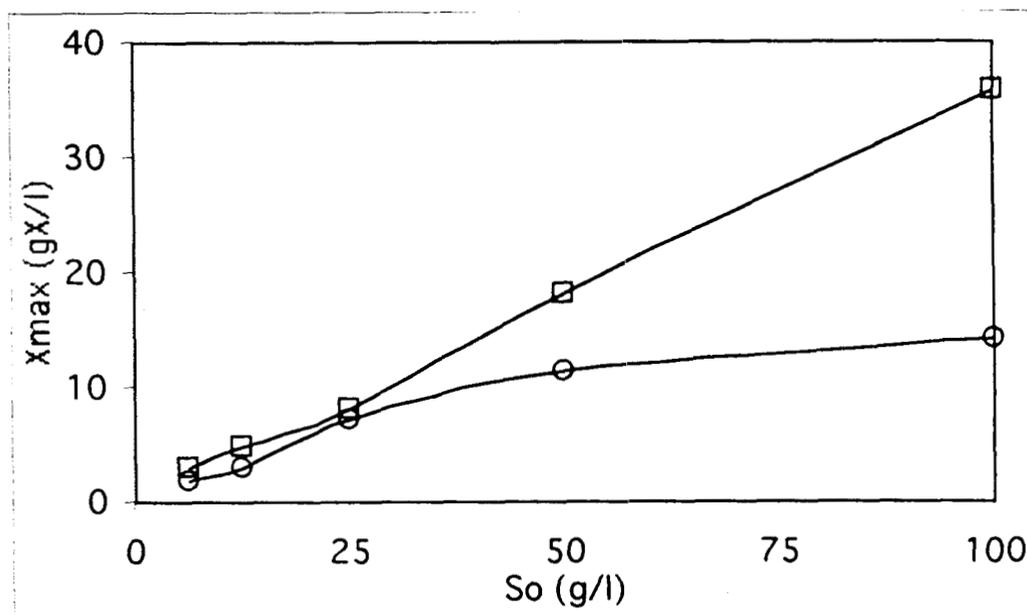


**Figura 3.1.10** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *Aspergillus niger* C28B25 con diferentes concentraciones de sustrato inicial en fermentación líquida (○) y fermentación sólida (□).

Los cultivos de fermentación líquida presentan valores de  $\mu$  entre 0.1 a 0.14 con un máximo de 0.17 a los 12.5 g/l de sacarosa inicial. Los cultivos de fermentación sólida están entre 0.15 a 0.22, con un máximo de 0.26 con 25 g/l de sacarosa inicial. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre los valores experimentales y los ajustados por la ecuación logística fueron superiores a 0.98 en todos los casos. Las curvas de  $\mu$  en sólido y en líquido siguen tendencias muy parecidas aunque los valores de

fermentación sólida son mayores que los de fermentación líquida para todos los valores de sacarosa inicial, las diferencias no son muy grandes.

En la figura 3.1.11 se muestran los valores de biomasa máxima obtenidos en cultivos de fermentación sólida y líquida.



**Figura 3.1.11 Biomasa máxima ( $X_{max}$ ) producida por *Aspergillus niger* C28B25 con diferentes concentraciones de sustrato inicial en fermentación líquida (○) y fermentación sólida (□).**

En esta figura se puede observar que en FL, la biomasa se acumuló de manera proporcional al aumento de la sacarosa inicial de 6.25 hasta 25 g/l; pero al aumentar la sacarosa, la biomasa máxima aumentó en menor medida. Los valores de biomasa máxima obtenidos en FS aumentaron con la concentración de sacarosa inicial para todas las concentraciones iniciales de sacarosa.

Los valores obtenidos para las concentraciones de 50 y 100 g/l de sacarosa en FL son parecidos a los reportados por Favela-Torres y col. (1996 y 1998), en donde se

reportaron valores de alrededor de 15 g/l de biomasa al cultivar *A. niger* con 50 y 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono. Lo mismo pasa con el valor de biomasa obtenida en fermentación sólida con 100 g/l de sacarosa, de 32 g/l, valor muy parecido al reportado en ambos trabajos de Favela-Torres y col. (1996, 1998) cultivando *A. niger* en amberlita con 100 g/l de glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, los valores reportados en 50 g/l de glucosa son de 33 g/l, mientras que en este trabajo se obtuvieron 14 g/l. Es difícil explicar esta diferencia en los valores de 50 g/l de sacarosa inicial y de hecho los valores reportados por Favela-Torres y col. (1996, 1998) están por arriba de los valores normales reportados para esta cantidad de carbono (alrededor de 20g/l). Esta diferencia puede estar relacionado al hecho de que en esos trabajos la biomasa no se determinó de manera directa, sino por medio de la determinación de las proteínas presentes en el cultivo, de manera que si por alguna causa se sobreproducen proteínas los valores de la biomasa que se obtienen serían mayores a la biomasa real obtenida.

La diferencia en la biomasa máxima se acentuó al aumentar la concentración inicial de sacarosa inicial. Esto ha sido atribuido a la limitación en la capacidad de crecimiento de *Aspergillus niger* en FL con altas concentraciones de fuente de carbono. En este caso el factor limitante obvio para el crecimiento de *A. niger* es la disponibilidad de oxígeno debido a la baja solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo, lo que ya ha sido postulado en el trabajo de Righelato (1975), quien reporta que la limitación de la cantidad de oxígeno en el medio de cultivo limita el crecimiento de los hongos filamentosos. A pesar de ser organismos aeróbicos estrictos son

capaces de crecer con concentraciones de oxígeno muy bajas, pero requieren de altas concentraciones de oxígeno en el medio para alcanzar su crecimiento máximo. Mavituna y Sinclair, (1985) puntualizaron esta limitación de la fermentación líquida con la siguiente frase: "Es posible suplementar fácilmente altas concentraciones de sustratos a los cultivos líquidos, pero algunos sólidos no solubles, líquidos que forman fases o gases poco solubles como el metanol y el oxígeno, representan un problema importante para este tipo de fermentación, de todos estos, es el oxígeno el más importante, de hecho la mayoría de los procesos microbianos que se realizan en fermentación sumergida están limitados por oxígeno".

En la figura 3.1.12 se muestra el perfil de rendimiento de biomasa por gramo de sustrato consumido ( $Y_{X/S}$ ) en fermentación sólida y líquida.

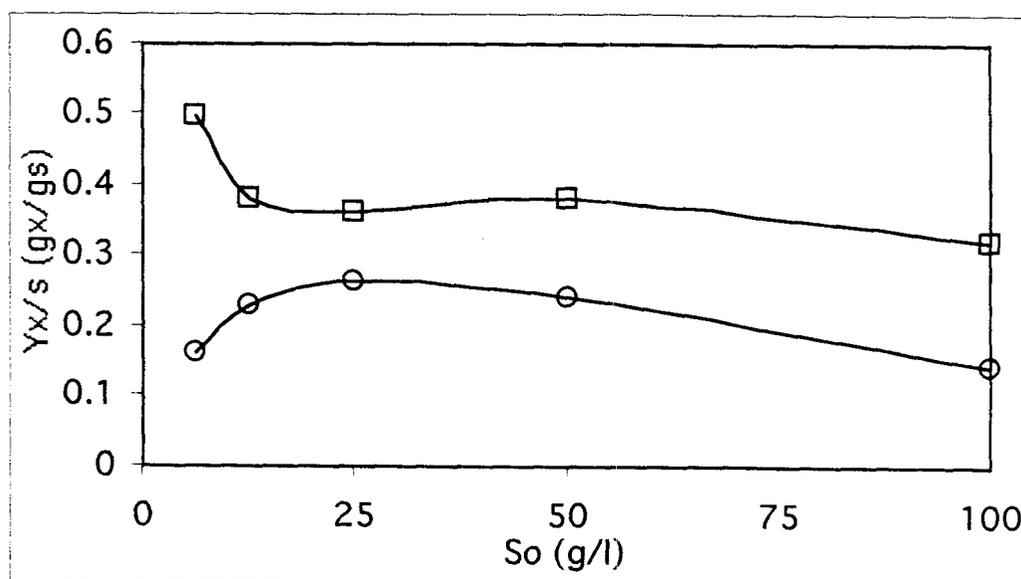


Figura 3.1.12 Rendimiento de biomasa por gramo de sustrato consumido ( $Y_{X/S}$ ) por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida (○) y fermentación sólida (□) con diferentes cantidades de sustrato inicial.

En fermentación líquida puede observarse que el  $Y_{X/S}$  aumenta hasta 25 g/l con un valor máximo 0.27. Al aumentar la concentración inicial de sacarosa hasta 100 g/l se observa una caída importante en el rendimiento del cultivo, hasta 0.15. En FS se observa una disminución del rendimiento del cultivo al aumentar la sacarosa de 6.2 a 25 g/l de 0.45 a 0.36, mientras que al incrementar la sacarosa de 50 a 100 g/l la  $Y_{X/S}$  se mantiene alrededor de 0.3, por lo que no se observan diferencias importantes en el rendimiento de la fermentación sólida con altas concentraciones de sacarosa.

Aun cuando los valores de  $Y_{X/S}$  de fermentación líquida son menores a los reportados por Favela-Torres y col. (1996) para la fermentación líquida. Los valores de biomasa obtenida son muy parecidos en ambos cultivos. Por lo cual, la diferencia en los valores de la  $Y_{X/S}$  puede deberse a que los cultivos de este trabajo consumieron más sustrato. La disminución del  $Y_{X/S}$  en los cultivos líquidos con alta concentración inicial de sacarosa podría estar relacionado con la baja velocidad de transferencia de oxígeno en este tipo de fermentación, puesto que es bien sabido que los matraces en agitación (FL) no permiten una buena transferencia de masa cuando la demanda de oxígeno es alta (Pirt, 1975). De acuerdo con la literatura esto podría resultar en la desviación del metabolismo hacia la síntesis de ácidos orgánicos y polioles. Provocando una menor conversión del carbono del sustrato en biomasa (Righelato, 1975). Por otra parte en fermentación sólida la transferencia de oxígeno podría realizarse más rápidamente debido a que existe solo una delgada capa de agua entre el aire y la biomasa, lo que puede permitir un metabolismo aeróbico con alto rendimiento de biomasa.

De acuerdo con Righelato (1975) y Favela-Torres y col. (1998), el crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación líquida está limitado por la concentración de oxígeno en los cultivos debido a la baja solubilidad de este en el medio de cultivo. Esto está de acuerdo con Berry y col. (1977) quien afirma que la baja tensión de oxígeno en los medios de cultivo induce rutas metabólicas que disminuyen la producción de biomasa y proteína en los cultivos líquidos de *Aspergillus sp.* De acuerdo con Mukhopadhyay y Ghose (1976), en muchas fermentaciones aeróbicas, el crecimiento celular varía con la capacidad de aireación del sistema. Cuando los niveles de oxígeno en el medio de cultivo se vuelven limitantes para el microorganismo, la fosforilación oxidativa se desacelera y la glucólisis se convierte en la fuente principal de ATP. De tal manera que, una disminución importante en la cantidad de oxígeno disponible representa una disminución muy grande de la cantidad de energía disponible para la célula y, por lo tanto, para su crecimiento. Se requieren experimentos adicionales para probar de manera directa esta idea, los cuales se enumeran la sección de propuestas.

La figura 3.1.13 muestra la tasa específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) de *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida, con concentraciones crecientes de sacarosa inicial.

La tasa específica de consumo de sustrato en fermentación sólida es muy parecida a la de fermentación líquida para las concentraciones de sacarosa inicial estudiadas. El valor que presenta diferencias más grandes son los de 100 g/l, con 0.7 para fermentación sólida y 0.94 para fermentación líquida. Los cercanos de los valores de

debe a que en líquido hay una menor cantidad de biomasa, pero esta consumió el substrato a una tasa mas alta.

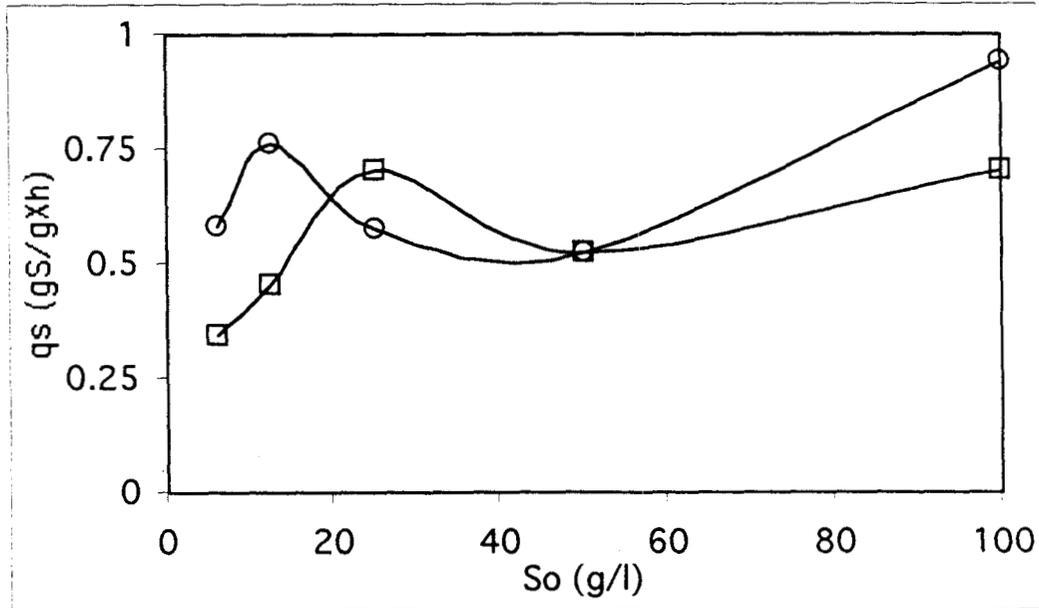


Figura 3.1.13 Tasa específica de consumo de substrato ( $q_s$ ) de cultivos de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida (○) y fermentación sólida (□) con diferentes cantidades de sacarosa inicial.

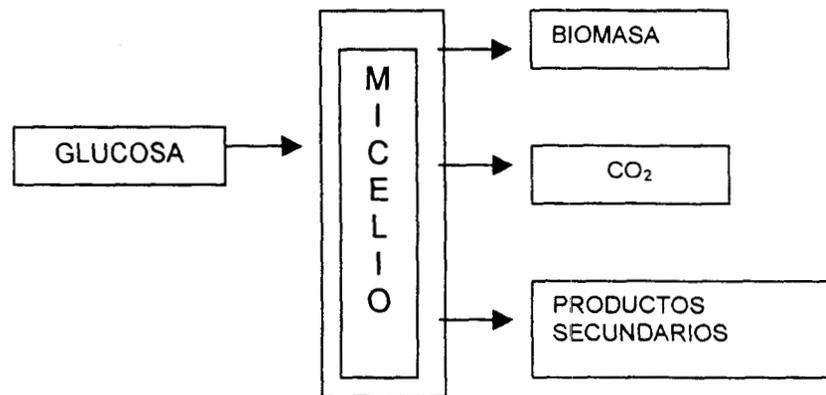
Los resultados presentados en esta figura coinciden con los resultados presentados con anterioridad en esta sección y muestran de manera congruente que los cultivos de fermentación sólida parecen necesitar una menor cantidad de substrato para crecer en fermentación sólida que en fermentación líquida. Esto podría estar relacionado con un metabolismo aeróbico de alta eficiencia en fermentación sólida y el metabolismo micro o anaeróbico en fermentación líquida. Este metabolismo requiere de un mayor consumo de substrato que no es completamente oxidado y por lo tanto rinde una menor cantidad de ATP. Esto junto con la inducción de rutas metabólicas de formación de productos secundarios en los cultivos líquidos,

disminuye la cantidad de carbono que puede ser asimilado para la formación de biomasa. Estos procesos pueden ser representados de manera simple por el siguiente esquema, adaptado de Pirt (1975):

De acuerdo al balance propuesto por Pirt (1975):

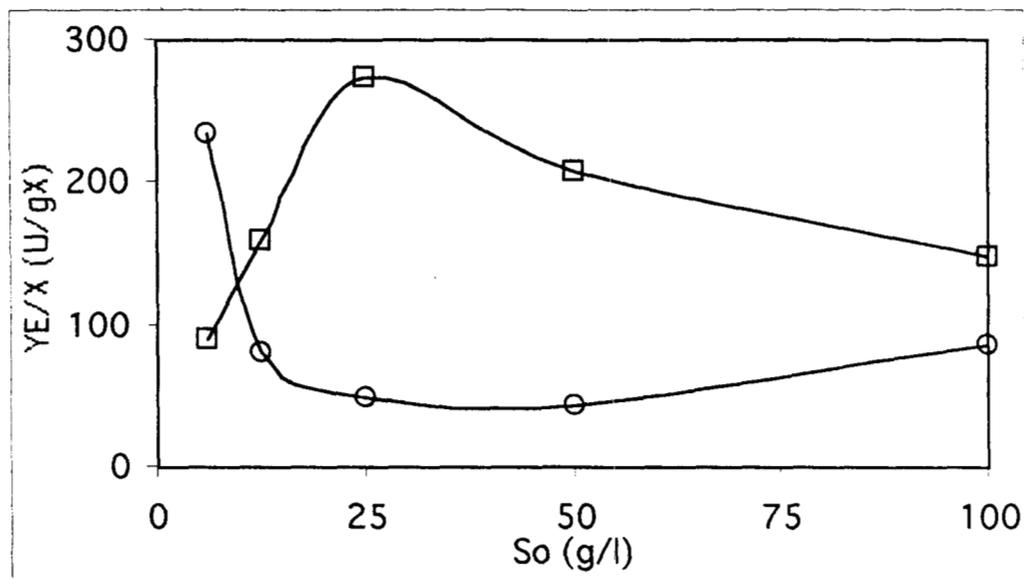
$$\text{Carbono total} = \text{Biomasa} + \text{CO}_2 + \text{Productos.}$$

La cantidad de biomasa,  $\text{CO}_2$  y productos suman el total de carbono consumido por el hongo y el destino final del carbono consumido depende de las condiciones de cultivo, la carencia de oxígeno aumentaría el flujo de carbono hacia productos secundarios reduciendo la síntesis de ATP y por ende la formación de biomasa, disminuyendo el valor de  $Y_{X/S}$ , tal como se explicó con anterioridad.



**Figura 2: Diagrama simplificado de la asimilación y destino del carbono en hongos filamentosos.**

En la figura 3.1.14 se muestran los valores de rendimiento de enzima de gramo de biomasa producida por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida y sólida.

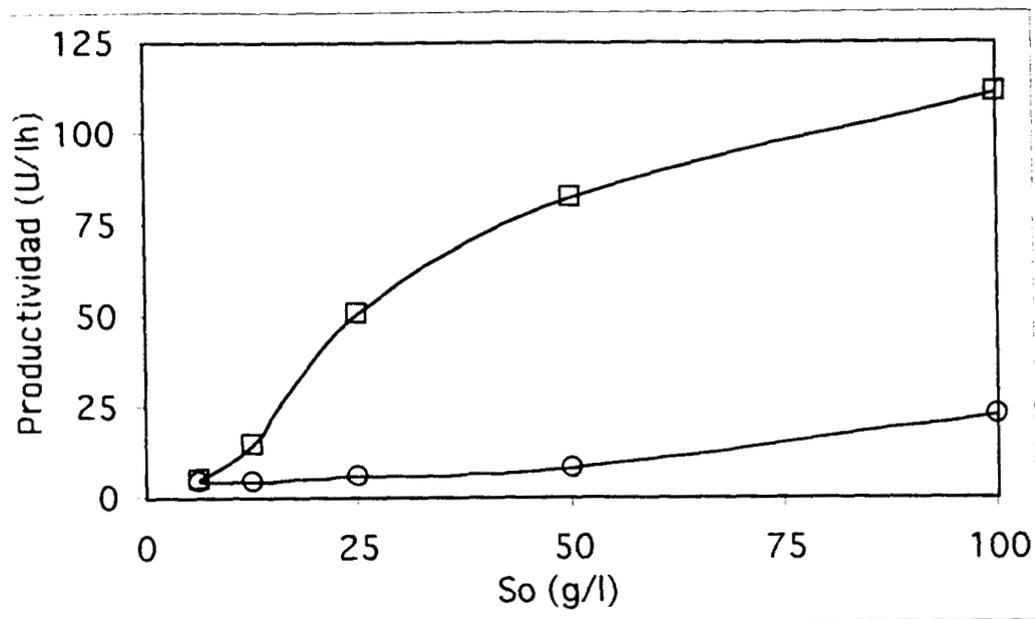


**Figura 3.1.14 Rendimiento de enzima por gramo de biomasa producida ( $Y_{E/X}$ ) de cultivos de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida (○) y fermentación sólida (□) con diferentes cantidades de sacarosa inicial.**

La FS mostró un máximo de rendimiento por gramo de biomasa producida con 25 g/l de sacarosa (270 U/gX). La  $Y_{E/X}$  disminuyó al aumentar los niveles de sacarosa inicial en el cultivo a 148 U/gX con 100 g/l de sacarosa inicial. En la FL la actividad específica de los cultivos disminuyó al aumentar la concentración inicial de sacarosa en el medio hasta los 50 g/l (44 U/gX). Al incrementarse la sacarosa a 100 g/l la  $Y_{E/X}$  del cultivo aumentó a 86 U/gX. Este aumento parece estar relacionado con la utilización de la glucólisis como fuente principal de ATP en los cultivos líquidos con altas concentraciones de sacarosa inicial, como se explicó anteriormente (Xu y col.,

1989; Kubicek-Pranz y col., 1990; Nielsen, 1992) . Esto obliga a aumentar la síntesis de invertasa a fin de cubrir la mayor necesidad de glucosa como fuente de carbono para la producción de ATP. El valor de la  $Y_{E/X}$  se calculó por el ajuste lineal de los datos experimentales de la parte ascendente de la producción enzimática contra la producción de biomasa para cada una de las condiciones estudiadas, los valores de correlación entre los datos experimentales y las líneas ajustadas son muy altos, solo el de líquido con 6.25 g/l de sacarosa estuvo por debajo de 0.9. Esta alta correlación nos indica que la producción enzimática esta al menos parcialmente asociada con la producción de biomasa en ambos sistemas de fermentación, aunque debido al método de cálculo no es posible determinar el grado de asociación que existe. Esto nos permite afirmar que la mayor producción de biomasa es la responsable de la mayor producción enzimática en fermentación sólida.

En la figura 3.1.15 se muestran los valores de productividad enzimática de cultivos de *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida.

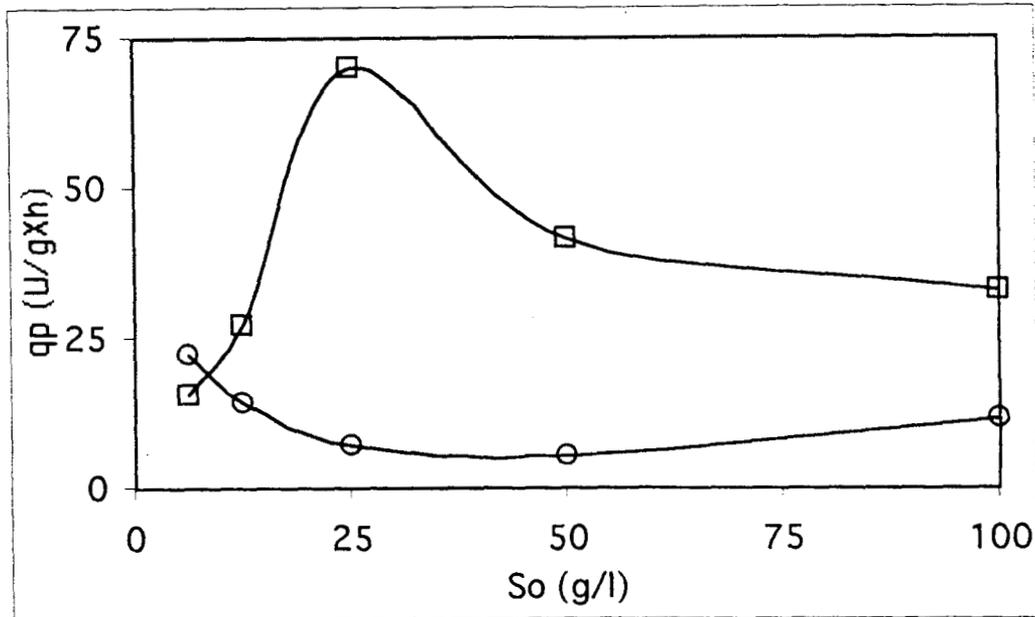


**Figura 3.1.15 Productividad (P) de cultivos de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida (O) y fermentación sólida (□) con diferentes cantidades de sacarosa inicial.**

La productividad aumento en ambos tipos de cultivo, pero pasó de ser igual con 6.25 g/l de sacarosa inicial a ser mas de 5 veces mayor en FS (121 U/h) que el valor de FL (21 U/h) con 100 g/l de sacarosa inicial. Estas diferencias en los valores de productividad comparativa de FS contra FL han sido reportadas antes por diversos grupos. Acuña-Argüelles y col (1995) reportan que la FS resultó ser entre 6 y 51 veces más productiva que la FL dependiendo del tipo de enzima medida. Lekha y Lonsane. (1994) reportaron que la productividad del medio sólido para la producción de tanasa fue 5 veces mayor en FS que en FL.

En este caso la mayor productividad de los cultivos de FS es el resultado combinado de la mayor velocidad de crecimiento, el mayor valor de  $Y_{XS}$  y el mayor valor de  $Y_{EX}$  de los cultivo de fermentación sólida comparados con la fermentación líquida.

La figura 3.1.16 muestra los valores de la tasa específica de producción enzimática  $q_p$  (U/gXh) obtenidos para cultivos de *Aspergillus niger* en fermentación líquida y sólida con diferentes concentraciones de sacarosa.



**Figura 3.1.16** Tasa específica de producción enzimática ( $q_p$ ) en cultivos de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida (O) y fermentación sólida (□) con diferentes cantidades de sacarosa inicial. Las líneas punteadas muestran la tendencia de los puntos .

Como puede observarse en la figura 3.1.16, en los cultivos de fermentación líquida, la tasa específica de producción enzimática  $q_p$  de FL disminuye hasta un valor de 5.5 U/gXh con 50 g/l de sacarosa inicial y aumenta hasta 11.2 U/gXh con 100 g/l de sacarosa inicial. Mientras que en FS el máximo se alcanzó con 70 U/gXh con 25 g/l de sacarosa inicial y disminuyó hasta 31 con 100 g/l de sacarosa inicial.

Estas diferencias en  $q_p$  podrían estar relacionadas con diferentes estados metabólicos para cada uno de los sistemas de fermentación. De acuerdo con los

resultados previos la diferencia en la  $q_p$  esta relacionada con la mayor velocidad específica de crecimiento y la mayor  $Y_{E/X}$  de los cultivos de FS.

Una explicación posible para el comportamiento de los cultivos de FL con respecto a la transferencia de oxígeno podría estar en los trabajos de Sols (1969). Quien observó que la cantidad de oxígeno en el medio de cultivo parece regular indirectamente la síntesis de glu-6-P, y basó en ello un modelo de regulación de transporte de carbohidratos y metabolismo en levaduras. Propone que el oxígeno regula de manera indirecta la acumulación de citrato al regular la velocidad de la fosforilación oxidativa, al cual a su vez controla la actividad de la hexocinasa en la glucólisis, debido a la concentración limitante de oxígeno, el metabolismo sería desviado hacia la glucólisis y hacia la fermentación en las levaduras. Esto resulta en el efecto Pasteur que se observa como una mayor producción de hidrolasas y mayor consumo de sustrato con bajo crecimiento. Aún cuando Nielsen (1992) puntualizó que los hongos no presentan el efecto Pasteur como tal, debido a que son aeróbicos estrictos y no pueden generar suficiente energía para crecer por medio de la conversión de piruvato en etanol, acetato o lactato. Durante el cultivo líquido con baja cantidad de oxígeno disuelto la fosforilación oxidativa se convierte en un cuello de botella con la acumulación de etanol, acetato, lactato o intermediarios del ciclo de Krebs por ejemplo ácido cítrico, esto ha sido observado por Xu y col. (1989) y por Kubicek-Pranz y col. (1990) en *Aspergillus niger*, quienes observaron que al aumentar la concentración de sacarosa o glucosa por arriba de 50 g/l se satura la fosforilación oxidativa y se acumula citrato como una manera de poder desviar el exceso de glucosa utilizada en la glucólisis. Carter y Bull (1969) encontraron que la

disminución de la concentración de oxígeno disuelto resulta en una mayor distribución de glucosa en la ruta de las pentosas, y debido a que el rendimiento energético de la ruta de las pentosas es bajo, sería necesario aumentar el consumo de glucosa cuando una mayor parte de la glucosa se metaboliza por ese medio. Todo lo anterior explica el aumento en el consumo de sustrato y como consecuencia el bajo rendimiento de biomasa por gramo de sustrato consumido de los cultivos de FL y por último el por qué los cultivos de 100 g/l no parecen presentar represión catabólica. Los resultados parecen confirmar que el hongo se encuentra limitado por oxígeno en FL cuando se presenta una gran cantidad de sustrato inicial.

El aumento en la concentración inicial de sacarosa tuvo efectos diferentes entre la FL y la FS. Mientras, que en FS la  $X_{max}$  aumentó y el rendimiento no se afectó de manera significativa por el aumento en la concentración de sustrato inicial, indicando que no existe una limitante obvia para este tipo de cultivo bajo las condiciones estudiadas. En FL la biomasa máxima ( $X_{max}$ ) está limitada, a pesar de que se use una mayor cantidad de sustrato inicial. Por lo cual, el rendimiento de la biomasa disminuyó de manera significativa al aumentar la concentración de sustrato inicial. Ambos resultados indican la presencia de una limitante que se agudiza al aumentar la concentración del sustrato inicial y tal como se indicó en el párrafo anterior esta limitante podría ser la cantidad de oxígeno en el medio de cultivo. Otro aspecto interesante de las diferencias encontradas es la dispersión del medio de cultivo sobre la superficie de cultivo de la fermentación sólida. Esto podría hacer que el cultivo se comporte como un lote alimentado donde la concentración de sustrato

se mantiene baja a pesar de la existencia de una alta concentración de sustrato final, tal como ha sido postulado por Ramesh y Lonsane (1991B). Este comportamiento ha sido reproducido en fermentación líquida por Aguilar y Huitrón (1987), quienes añadieron pequeñas cantidades de ácido galacturónico y glucosa a cultivos de *Aspergillus niger* durante la producción de pectinasas con pectina como fuente de carbono. Al mantener baja la concentración temporal de los represores éstos produjeron un efecto de estimulación para la producción enzimática en lugar de la represión esperada. La explicación de los autores es que bajas concentraciones de glucosa o del represor adecuado en realidad sirven como inductores de la síntesis de la hidrolasa correspondiente.

Los altos valores de correlación de los ajustes de  $Y_{E/X}$  permiten afirmar que la mayor productividad de los cultivos de FS se debe a la combinación del mayor rendimiento de biomasa por gramo de sustrato consumido y a la mayor  $Y_{E/X}$  de los cultivos sólidos. El aumento en la cantidad de biomasa con los niveles superiores de sacarosa fue suficiente para mantener una mayor productividad enzimática de los cultivos de fermentación sólida, a pesar de la disminución de los valores de la  $Y_{E/X}$ .

Todos estos resultados apoyan la idea de que en la fermentación sólida existe una alta disponibilidad de oxígeno que permite a *Aspergillus niger* mantener un metabolismo aeróbico que resulta en una alta velocidad de crecimiento y por lo tanto una mayor velocidad de consumo de sustrato.

### 3.2 Estudio de la producción de invertasa por 3 cepas de *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida con 100 g/l de sacarosa inicial.

Se comparó el crecimiento y la producción de invertasa por tres cepas de *Aspergillus niger* en fermentación líquida y sólida a fin de probar que las diferencias reportadas de FS y FL con altas concentraciones de sacarosa inicial, son resultado del sistema de cultivo y no variaciones atribuibles a una sola cepa.

La figura 3.2.1 muestra el perfil de crecimiento de tres cepas de *Aspergillus niger* en cultivo FL y FS.

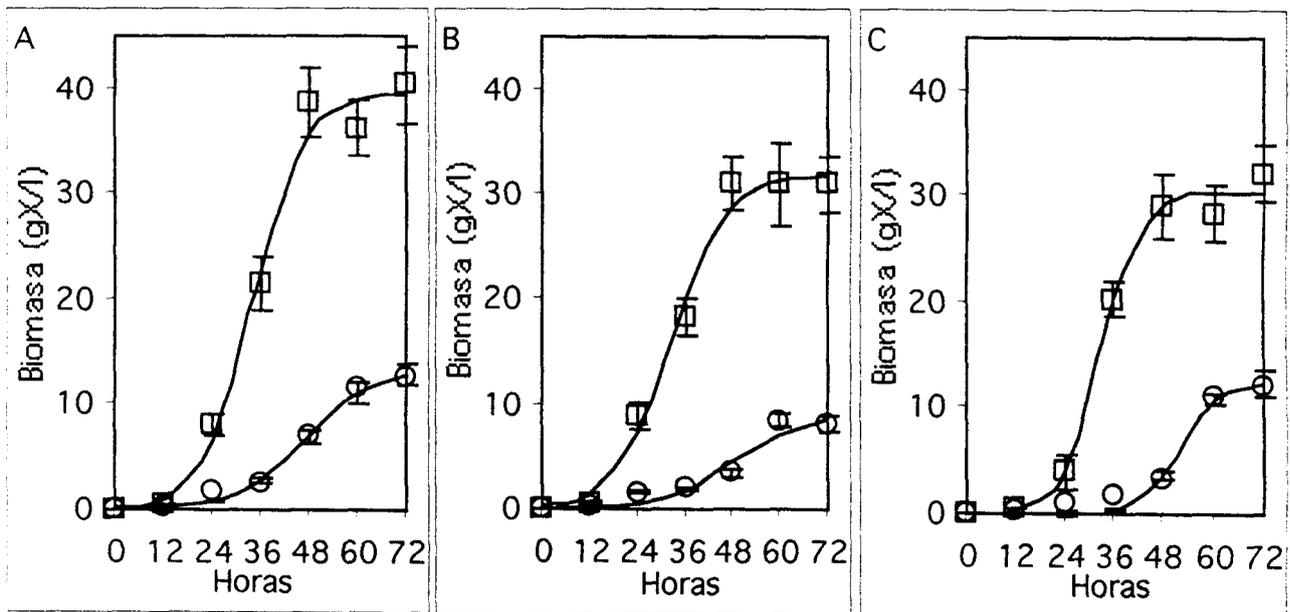


Figura 3.2.1 Crecimiento de las cepas Aa20 (A), N402 (B) y C28B25 (C) en fermentación líquida (O) y sólida(□) con 100 g/l de sacarosa inicial. Los valores experimentales se representan como símbolos y los valores ajustados se representan como líneas continuas.

El crecimiento de las cepas Aa20, N402 y C28B25 en FL es muy parecido entre sí. Las cepas presentan un tiempo de germinación de entre 12 a 24 horas, después de eso se presenta una fase de crecimiento continuo que puede durar hasta las 60

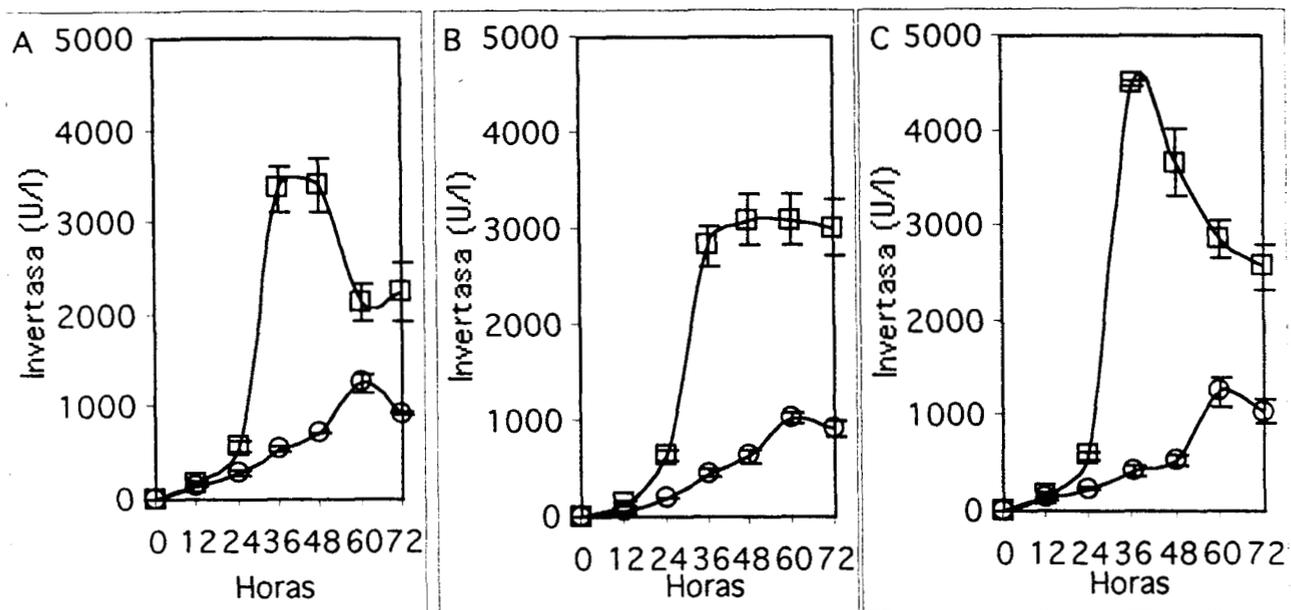
horas, En la FS las cepas mostraron perfiles de crecimiento parecidos entre sí, con un periodo de adaptación de alrededor de 12 horas, alcanzando la producción máxima a las 48 horas. Comparando las curvas de crecimiento (Fig 3.2.1A, B y C) se observa que todas las cepas crecieron más rápido y acumularon mayor cantidad de biomasa en fermentación sólida que en fermentación líquida. Los índices de crecimiento específico ( $\mu$ ) fueron mayores en sólido y  $X_{max}$  fue tres veces más elevada en FS (34.5 g/l vs. 11.04 g/l) comparado con FL.

La  $X_{max}$  es estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) y muestra claramente que *A. niger* es capaz de crecer mucho más en un soporte sólido que en un matraz en agitación cuando el nivel de sustrato es alto. En ambos sistemas de cultivo la  $X_{max}$  es muy parecida entre las cepas.

Un examen microscópico de los cubos de PUF (sección 3.4), mostró un micelio enredado en la red de poliuretano con grandes espacios llenos de aire. Así pues, parece razonable la propuesta de que el cultivo en FS funciona como un cultivo en superficie para el hongo, el cual por lo tanto no está limitado por la transferencia de oxígeno como en el caso del sistema de fermentación líquida.

Los cultivos de fermentación líquida mostraron pellets con un centro muy densamente agregado lo que seguramente aumenta los problemas relacionados con la transferencia de oxígeno al interior de la biomasa, y podría ser un indicación del metabolismo de tipo microaeróbico o anaeróbico en la FL.

La figura 3.2.2 (A, B, y C), muestran los tiempos de evolución de los títulos de invertasa para cada cepa.



**Figura 3.2.2 Producción de invertasa por las cepas Aa20 (A), N402 (B) y C28B25 (C) en fermentación líquida (O) y sólida(□).**

Los círculos corresponden a los títulos medidos en experimentos con FL mostrando un valor pico alrededor de las 60 horas y decreciendo mas tarde, la media de la producción máxima enzimática ( $E_{max}$ ) fue de  $1179 \pm 138$  U/l. Los cuadrados corresponden a los títulos de invertasa medidos en experimentos con el sistema FS, la media de la  $E_{max}$  es de  $3663 \pm 228$  U/l, más del doble que en FL.

En el cultivo líquido de las tres cepas de *Aspergillus niger* Aa20, N402 y C28B25, hay una fase de baja producción a 24 horas, tras esto la actividad de invertasa se acumula de manera continua durante todo el tiempo de fermentación hasta alcanzar el máximo a las 60 horas, tras este máximo la actividad de invertasa disminuye en las tres cepas. La producción de invertasa en fermentación líquida parece ser la misma independientemente de cada cepa. En esto pueden intervenir factores

relativos a las limitaciones del medio y en el caso de que la cantidad de invertasa producida por *Aspergillus niger* sea dependiente de la cantidad de biomasa se explicaría el parecido por la limitación del crecimiento por el sistema de cultivo.

La producción de invertasa por las tres cepas de *Aspergillus niger* en fermentación sólida presenta un periodo de baja producción alrededor de las 24 horas, tras este periodo la producción de invertasa se incrementa de manera exponencial hasta las 36 horas y 48 horas de cultivo. Tras este periodo la actividad de invertasa tiende a disminuir pero parece hacerlo a un ritmo diferente para cada cepa. Las diferencias que se presentan en fermentación sólida no parece estar relacionada con limitaciones intrínsecas del medio o sistema de cultivo y en el que las limitaciones de producción que se observan son las relativas a cada cepa.

En la tabla 3.2.3 se muestran los resultados obtenidos a partir del crecimiento de las cepas AA20, N402 y C28B25 en fermentación líquida y sólida. Los resultados obtenidos se compararon por análisis estadístico de ANOVA de una sola vía.

No se encontró diferencia estadística en el rendimiento de enzima por gramo de biomasa producida entre los experimentos FL y FS. Mientras que las cepas C28B25 y Aa20 mostraron valores de  $Y_{EX}$  más altos en FS que en FL, la cepa N402 mostró un valor de  $Y_{EX}$  más alto en FL que en FS, aún cuando los valores para cada cepa en FL y FS fueron cercanos.

La productividad enzimática ( $P=U/hl$ ) se estimó en término volumétrico, debido a que se utilizó el mismo volumen en ambos sistemas de cultivo. Se tomó el valor de producción máxima de cada cepa y todas las cepas mostraron una mayor productividad en FS que en FL, tal como ha sido previamente reportado por Solís

Pereira y col. (1993); Lekha y Lonsane (1994) y Acuña-Argüelles y col, (1995), estos autores reportaron que los cultivos por FS produjeron niveles de producción enzimática más alta y en menor tiempo que los que en FL, y atribuyeron este comportamiento principalmente a diferencias en la inducción y represión enzimáticas (Solís-Pereira y col. , 1993); o a diferencias en la calidad de las enzimas producidas en cada sistema de cultivo (Lekha y Lonsane, 1994; Acuña-Argüelles y col., 1995).

**Tabla 3.2.3 Biomasa, producción enzimática, velocidad de crecimiento, productividad volumétrica y productividad por gramo de biomasa de tres cepas de *Aspergillus niger* en fermentación líquida y sólida.**

Parámetros	Xmax (gX/l)		Emax (U/l)		$\mu$ (1/h)		Y <sub>E/X</sub> (U/gX)		Prod (U/lh)	
	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido
AA20	13.6	39.6	1261	3411	0.12 0.99	0.16 0.99	79 0.88	98 0.86	21	71
N402	9.5	31.9	1020	3089	0.11 0.97	0.14 0.99	113 0.93	109 0.90	17	64
C28B25	12.6	30.3	1258	4487	0.14 0.99	0.21 0.99	87 0.93	151 0.87	21	125
prom	11.9	33.9	1180	3662	0.12	0.17	93	119	19.7	86.7
Desv std	2.1	4.9	138	732	0.02	0.04	18	28	2.30	33.05
Pr>F	0.002		0.004		0.086		0.24		0.025	
F	49.85		33.29		5.15		1.91		12.28	
Sig	**		**		ns		ns		*	

Nuestros resultados muestran que no solo existe una mayor producción de biomasa en FS comparada con la FL, si no que la velocidad de crecimiento en FS es también mayor que en FL, esto resulta en mayores cantidades de biomasa acumulada en FS en menor tiempo. Debido a que no encontramos diferencias significativa en los valores de Y<sub>E/X</sub> entre fermentación sólida y fermentación líquida y a que los valores

de correlación obtenidos en el cálculo de la  $Y_{E/X}$  son altos, podemos pensar que la producción de invertasa está ligada al menos parcialmente de manera directa a la producción de biomasa en ambos sistemas de cultivo con 100 g/l de sacarosa inicial. Y por lo tanto, la producción enzimática quedaría determinada por la capacidad del cultivo para acumular biomasa. Al ser mayor y más rápida la producción de biomasa en fermentación sólida esto podría explicar tanto los mayores niveles de producción como la mayor productividad de los cultivos sólidos.

Las diferencias observadas en este experimento podrían ser inherentes a las cepas utilizadas y depender del origen de cada una de las cepas. Este resultado es consistente con la propuesta de que ciertas cepas parecen estar mejor adaptadas para alguno de los sistemas de cultivo (Shankaranand y col., 1992; Antier y col., 1993). El hallazgo más importante de esta sección del trabajo es la confirmación de que las diferencias encontradas entre fermentación sólida y fermentación líquida no parecen ser dependientes de la cepa de *Aspergillus niger* utilizada, sino que dependen del sistema de cultivo. Estos resultados se publicaron en el trabajo titulado "Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation", que se incluye en el anexo 1.

### 3.3 Estudio de la secreción de invertasa por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación sólida y líquida con 100 g/l de sacarosa inicial.

Se cultivó *Aspergillus niger* C28B25 con 100 gramos de sacarosa como fuente de carbono, a fin de analizar la producción intra y extracelular de la invertasa. La producción de proteasas se comparó entre ambos sistemas de cultivo. Se comparó la acumulación y el consumo de monosacáridos en los cultivos de ambos sistemas de cultivo

En la figura 3.3.1 se muestra la acumulación de biomasa de la cepa C28B25 en fermentación líquida y sólida con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono.

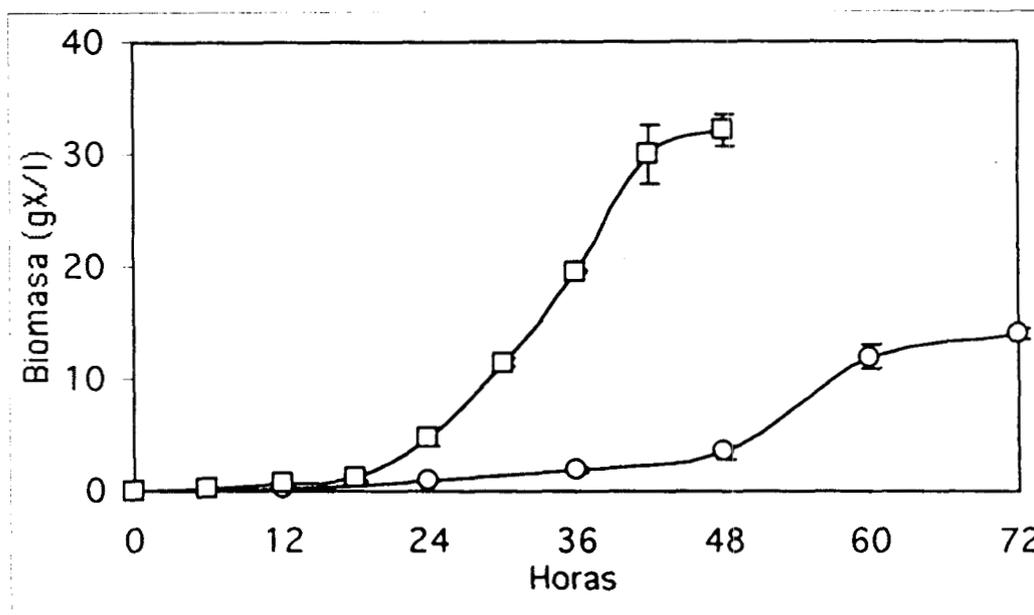


Figura 3.3.1 Biomasa producida por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida (○) y fermentación sólida (□) con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono.

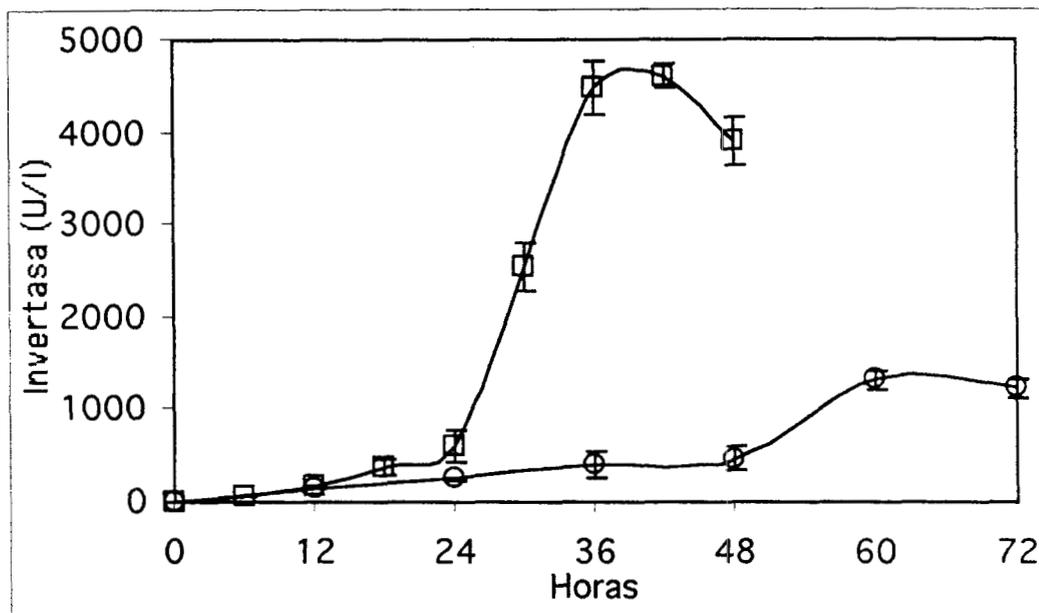
Se observa que en fermentación líquida la biomasa presenta una fase de adaptación larga con un aumento de la biomasa muy pronunciado entre las 48 y las 60 horas, la

biomasa acumulada pasa de aproximadamente 4 g/l hasta 11 g/l en solo 12 horas y es a las 60 horas cuando se inicia la esporulación de los pellets del cultivo, posterior a este momento la acumulación de biomasa disminuye llegando a 12 g/l a las 72 horas. Los resultados de fermentación sólida presentan un perfil parecido a los de fermentación líquida; la fase de adaptación es más corta, aproximadamente 18 horas y la fase de crecimiento exponencial llega hasta las 42 horas momento en que se inicia la esporulación en el cultivo, para ese momento se han acumulado aproximadamente 32 g/l de biomasa, valor que se incrementa muy poco para el final de la fermentación = 33 g/l a las 48 horas. Aún cuando los dos cultivos presentan una curva clásica de crecimiento formada por la fase de adaptación, crecimiento exponencial y fase estacionaria, los tiempos y relaciones entre ellos son diferentes. Andres y Peberdy (1974) observaron que altas concentraciones de glucosa o sacarosa en el medio de cultivo en fermentación líquida resultaron en un retraso importante en los tiempos de crecimiento y producción de invertasa por *Aspergillus nidulans* en fermentación líquida. De acuerdo con Nielsen (1992) este retraso podría estar relacionado con la alta concentración de sacarosa en el medio, que actúa como inhibidor de la germinación y alarga el tiempo de adaptación.

La figura 3.3.2 presenta los perfiles de secreción de invertasa por *Aspergillus niger* C28B25 cultivada en fermentación líquida y sólida con 100 g/l de sacarosa.

En la curva de producción de invertasa de fermentación líquida se pueden observar lo que parecen ser dos fases de producción, la primera alcanza un máximo de 400 U/l a las 36 horas y la segunda, que se inicia a las 48 horas y alcanza el máximo de

1500 U/l a las 60 horas. La producción de invertasa en fermentación sólida se inicia lentamente durante las primeras 24 horas con sólo 500 U/l y presenta un aumento importante entre las 24 y las 36 horas. Tras ese tiempo la velocidad de producción de invertasa disminuye para alcanzar un máximo de 4600 U/l a las 42 horas. Tras ese tiempo la actividad de los extractos disminuye.



**Figura 3.3.2 Producción de invertasa extracelular por *Aspergillus niger* C26B25 en fermentación líquida (O) y fermentación sólida (□) con 100 g/l de sacarosa.**

Los perfiles de producción de invertasa en ambos sistemas de cultivo siguen los perfiles de crecimiento presentados en la figura 3.3.1, lo que ratifica que la producción de invertasa está ligada al crecimiento de la biomasa en ambos medios de cultivo.

En la figura 3.3.3 puede observarse que la invertasa intracelular se acumula más rápidamente en el cultivo y representa a la mayoría de la actividad de invertasa en durante todo el tiempo de cultivo.

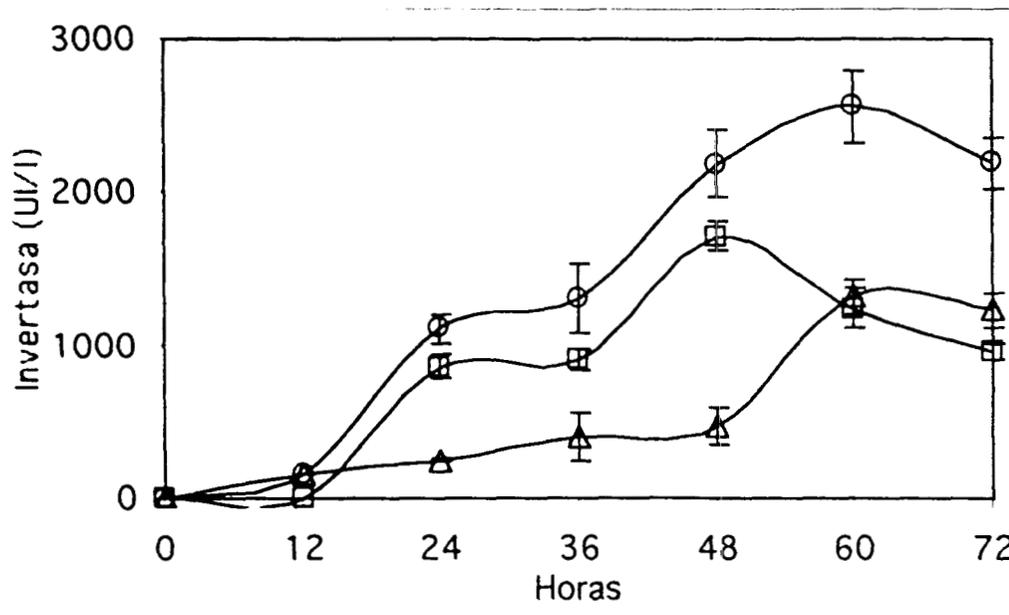
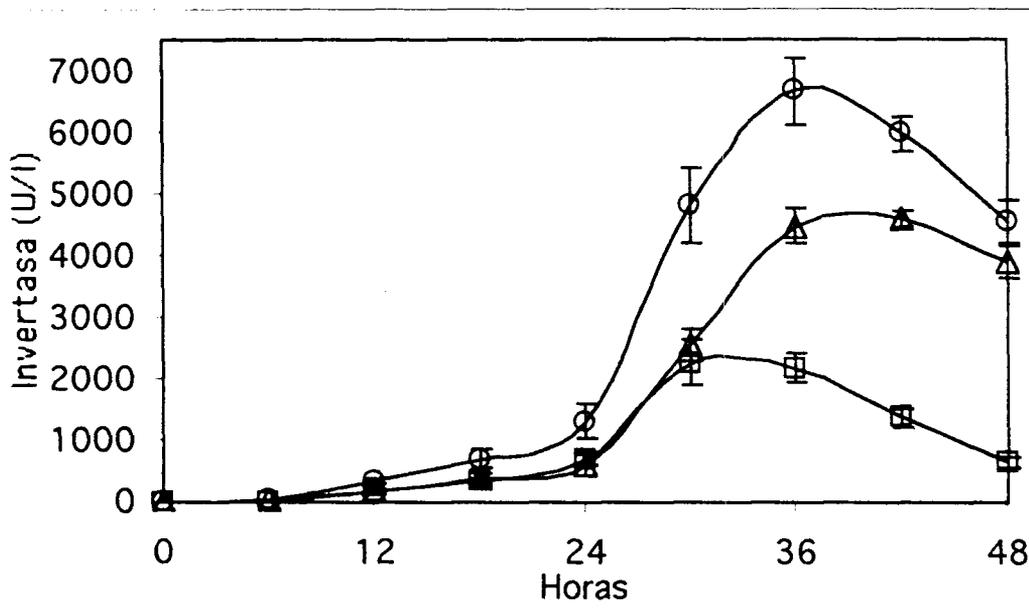


Figura 3.3.3 Comparación de la actividad intra ( $\square$ ), extracelular ( $\diamond$ ) y total ( $\circ$ ) de invertasa por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida. La invertasa total se representa como una línea punteada, ya que se obtuvo por la suma de las otras dos.

La invertasa intracelular presenta un valor máximo de producción de 1500 U/l aproximadamente que es el mismo valor máximo obtenido para la invertasa extracelular, con esto la producción real de invertasa para este cultivo se eleva a cerca de 2700 U/l. En el momento de máxima producción intracelular se tienen 1500 U/l de invertasa y 500 U/l de invertasa extracelular, lo que da una fracción intra-extracelular 75/25%, lo que coincide con lo reportado por Peberdy (1994) quien afirma que *Aspergillus niger* presenta el 70% de la invertasa total como invertasa intracelular. Por otra parte, Vainstein y Peberdy (1990) observaron que, aproximadamente el 50% de la invertasa total producida por *Aspergillus nidulans* en fermentación líquida está asociada al micelio y parece estar localizada en el espacio

periplásmico, aproximadamente el 60% de esta invertasa intracelular puede ser liberada por acción de químicos como el DTT y la proteasa K, y el resto se puede liberar por acción mecánica. El hecho de que la invertasa intracelular se acumule antes que la invertasa extracelular corresponde con la idea de que la invertasa extracelular es el resultado del paso invertasa intracelular al medio de cultivo.

La figura 3.3.4 muestra los perfiles de producción de invertasa intra y extracelular de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación sólida.



**Figura 3.3.4** Comparación de la actividad intra ( $\square$ ), extracelular ( $\triangle$ ) y total ( $\circ$ ) de invertasa por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación sólida. La invertasa total se representa como una línea punteada, ya que se obtuvo por la suma de las otras dos.

Durante las primeras horas de fermentación los extractos intra y extracelulares presentan niveles de producción que resultan equivalentes y a partir de las 24 horas la invertasa intracelular pasa a representar un fracción cada vez más pequeña de la

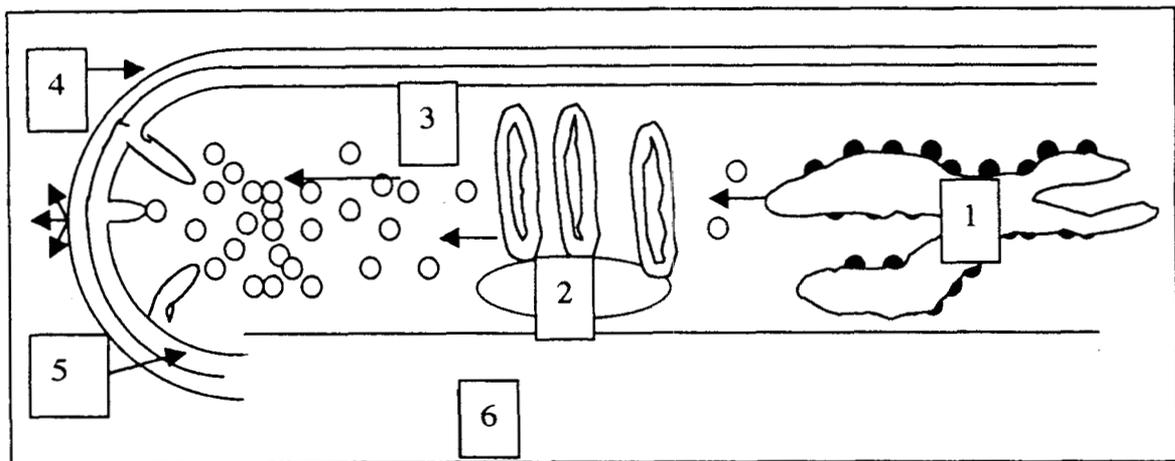
actividad extracelular. Esta se incrementa al tiempo que la actividad intracelular disminuye. La actividad total máxima se alcanza a las 36 horas con cerca de 6800 U/l.

Los resultados presentados en esas figuras corresponden con los hallazgos de Lekha y Lonsane (1994), quienes encontraron que la tanasa producida por *Aspergillus niger* en fermentación sólida fue totalmente extracelular, mientras que en fermentación líquida y en fermentación en superficie fue totalmente intracelular durante las primeras 48 horas de cultivo. Tras ese tiempo se secretó el 83% de la tanasa en fermentación líquida y el 51% en fermentación en superficie. El crecimiento en forma de micelio disperso ha sido reportado por Archer (1994) como una forma de crecimiento más favorable para la secreción enzimática que el crecimiento en forma de pellet lo que podría ayudar a explicar los resultados obtenidos.

Esta diferencia en la proporción de secreción de enzimas se ha observado para varias especies, como *Neurospora crassa* que presenta el 100% de la invertasa intracelular, pero en cepas mutantes que no sintetizan pared celular el 90% de la invertasa es extracelular. Esto se ha reportado también para protoplastos de *Aspergillus niger* (Sorensen y col., 1996), lo que indica que la pared celular juega un papel importante en la secreción de las enzimas al medio de cultivo. De acuerdo con los modelos conocidos las enzimas se secretan hacia la punta de las hifas que es el mismo lugar donde se sintetiza la pared celular, de tal manera que las enzimas se mezclan con los componentes de la pared celular y difunden a través de la pared

inmadura que presenta poros muy grandes, lo que permite la secreción de enzimas de hasta 300 KDa, mientras que los poros de la pared madura solo permiten el paso de enzimas de 20 KDa (Peberdy, 1994).

Este proceso de difusión a través de la pared celular puede explicar también la mayor secreción de la invertasa en los cultivos de fermentación sólida comparados con los de fermentación líquida. En fermentación sólida, la invertasa puede difundir libremente al medio de cultivo, mientras que en fermentación líquida la invertasa tenderá a quedar atrapada al interior del pellet, dando como resultado una menor liberación al medio de cultivo, el proceso de secreción se esquematiza en la figura 2.



**Figura 2: Esquema de secreción de hidrolasas por hongos filamentosos a través de la punta de una hifa, 1) Retículo endoplásmico, 2) Aparato de Golgi, 3) Vesículas de secreción, 4) pared celular, 5) Espacio periplásmico, 6) Medio de cultivo. Modificado de Peberdy, 1994,**

De acuerdo con Peberdy (1994) y Archer y Peberdy (1997), las proteínas de secreción se sintetizan en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE) rugoso y al mismo tiempo se insertan dentro de la membrana del RE, esta membrana

se separa y se une al aparato de Golgi, donde se lleva a cabo la maduración de las proteínas por medio de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación, la glucólisis y la proteólisis. Una vez maduras las proteínas, las vesículas se separan y se dirige hacia un cumulo de vesículas de secreción llamado ocasionalmente SPITZENKORPER, el cual parece dirigir la dinámica de secreción y en donde se mezclan con vesículas de secreción de componentes de la pared, de ahí se dirigen a la membrana celular, donde son liberadas por la fusión de las vesículas con la membrana celular. Una vez en el espacio periplásmico, las proteínas difunden al espacio extracelular, esta difusión depende del tamaño de la proteína, del grado de maduración de la pared y de la afinidad de la proteína por los componentes de la pared (Archer y Peberdy, 1997).

En la figura 3.3.5 se muestra el perfil de consumo de azúcares en fermentación líquida. Se observa la disminución continua de la sacarosa durante las primeras 36 horas de fermentación. Esta disminución correspondió con la acumulación de glucosa y fructosa que alcanzaron su máximo al mismo tiempo. La fructosa se acumuló en mayor cantidad que la glucosa. Al final de la fermentación, la glucosa fue consumida casi en su totalidad, mientras que la fructosa quedó como remanente (9 g/l).

Esta diferencia en el transporte de monosacáridos hacia el interior del hongo ha sido ampliamente estudiada en *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* por Torres y col. (1996); De Winde y col. (1996); Walsh y col. (1996); Reinferberger y col. (1997); Ye y col. (1999) quienes han establecido que la presencia de altas

concentraciones de glucosa intracelular regula la inducción y expresión de transportadores específicos de otros monosacáridos de tal manera que al aumentar la concentración intracelular de la glucosa se inhibe la formación de transportadores de otros azúcares y se impide el ingreso de monosacáridos resultantes de la hidrólisis de polisacáridos presentes en el medio de cultivo.

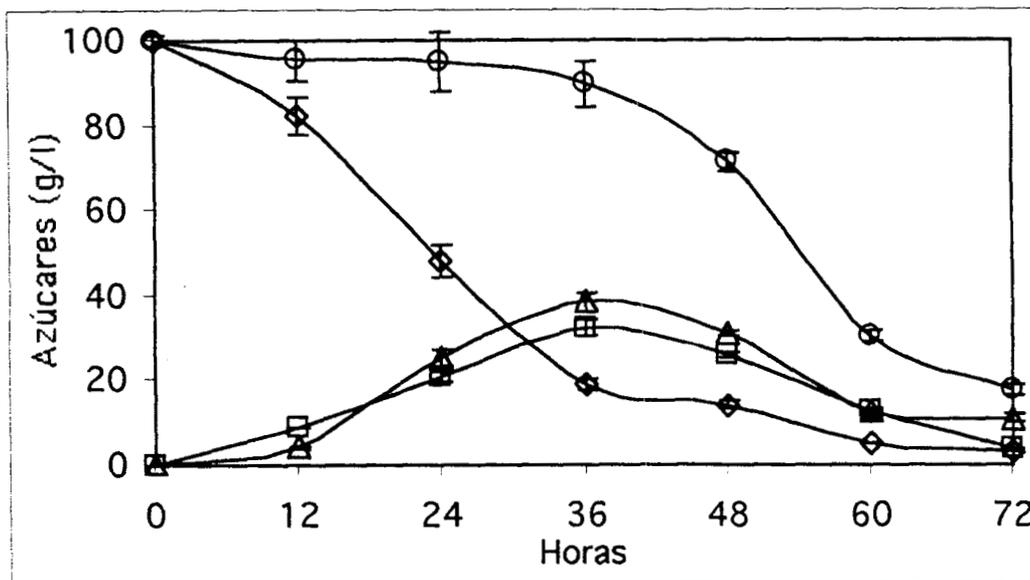


Figura 3.3.5 Perfil de consumo de azúcares por *Aspergillus niger* C28B5 en fermentación líquida con 100 g/l de sacarosa. Glucosa (□), fructosa (△), sacarosa (◇) y azúcares residuales (○).

De esta manera se impide la expresión de otras hidrolasas por la presencia de cantidades significativas de inductores debidos a la presencia de sus substratos en el medio. Ko y col. (1994) y Goel y col. (1999) han llevado esta idea más allá y han relacionado la concentración intracelular de la glucosa con el control metabólico por la F6P e indirectamente con la concentración de piruvato, pues una alta concentración de piruvato unida a una alta concentración de glucosa parece inducir

la utilización de vías metabólicas de fermentación en *Saccharomyces* y la síntesis de ácidos orgánicos en hongos filamentosos. Tal como se explica en la sección 3.1.

En la figura 3.3.6 se muestra el perfil de consumo de azúcares por *Aspergillus niger* en fermentación sólida con 100 g/l de sacarosa inicial.

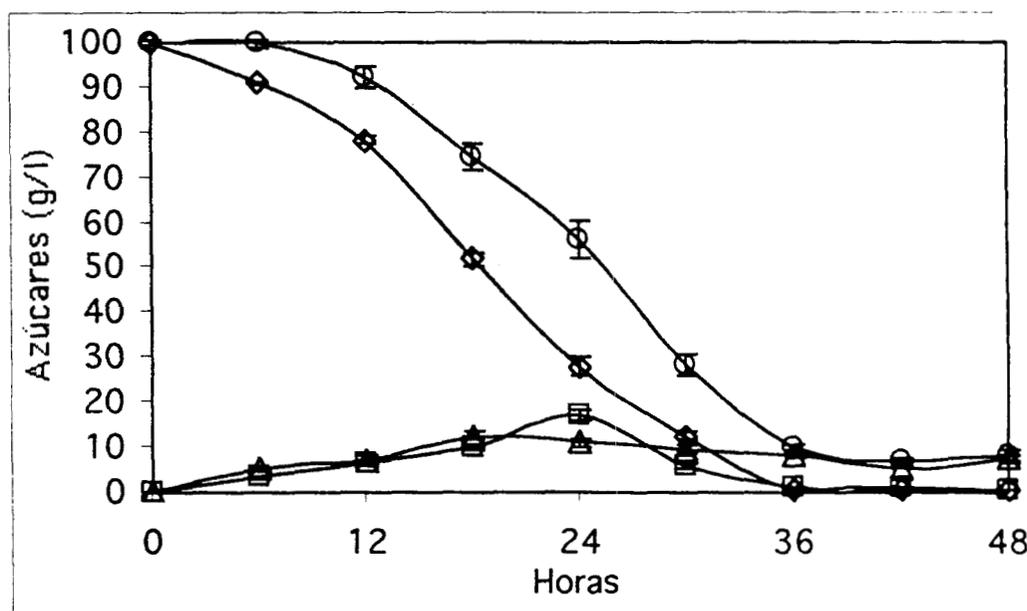


Figura 3.3.6 Perfil de consumo de azúcares por *Aspergillus niger* C28B5 en fermentación sólida con 100 g/l de sacarosa. Glucosa (□), fructosa (△), sacarosa (◇) y azúcares residuales (O).

En esta figura se observa que el consumo de sacarosa fue continuo durante todo el tiempo de la fermentación y a las 36 horas desapareció del cultivo. Durante el tiempo de cultivo se acumularon pequeñas cantidades de fructosa y glucosa, la fructosa se acumuló en mayor medida que la glucosa, 28 g/l y 17 g/l respectivamente. Al final de la fermentación la glucosa se consumió totalmente, mientras que los niveles de fructosa se mantuvieron estables desde las 30 horas hasta el final del cultivo.

En las figuras anteriores se presentaron los perfiles de consumo de azúcares en fermentación líquida y sólida respectivamente. Como puede observarse los azúcares se consumen completamente en cultivo sólido, mientras que en cultivo líquido los azúcares remanentes representan el 10% del valor inicial. Otro detalle importante es que mientras que la glucosa es totalmente consumida hacia el final de ambas fermentaciones, la fructosa representa entre el 60 y 90% de los azúcares remanentes totales. En ambos casos la esporulación corresponde con el agotamiento de la sacarosa en el cultivo y la acumulación máxima de monosacáridos parece corresponder con el mismo momento metabólico en ambos cultivos.

Debido a que el consumo de carbohidratos está normalmente limitado al ingreso de monosacáridos, los disacáridos deben ser degradados por enzimas extracelulares secretadas por el hongo antes de ser ingresadas al interior de la célula. Esto apunta a la posibilidad de que la invertasa intracelular de FL en realidad este en el espacio periplásmico y por lo tanto en contacto con el medio de cultivo, lo que explicaría la degradación de la sacarosa cuando los niveles de invertasa extracelular en el medio de cultivo son bajos

En los hongos filamentosos la regulación de la síntesis de invertasa se lleva a cabo por medio de la regulación del gen *suc2*. En condiciones normales, cuando la concentración de ATP es baja, la presencia de glucosa estimula la síntesis de una serie de hidrolasas entre las cuales se encuentra la invertasa; al aumentar la concentración de glucosa producto de la actividad de invertasa sobre el sustrato del cultivo, aumentan los niveles intracelulares de ATP y se activa el inhibidor *creA*, el cual se une a los genes estructurales de las hidrolasas y se lleva a cabo la represión

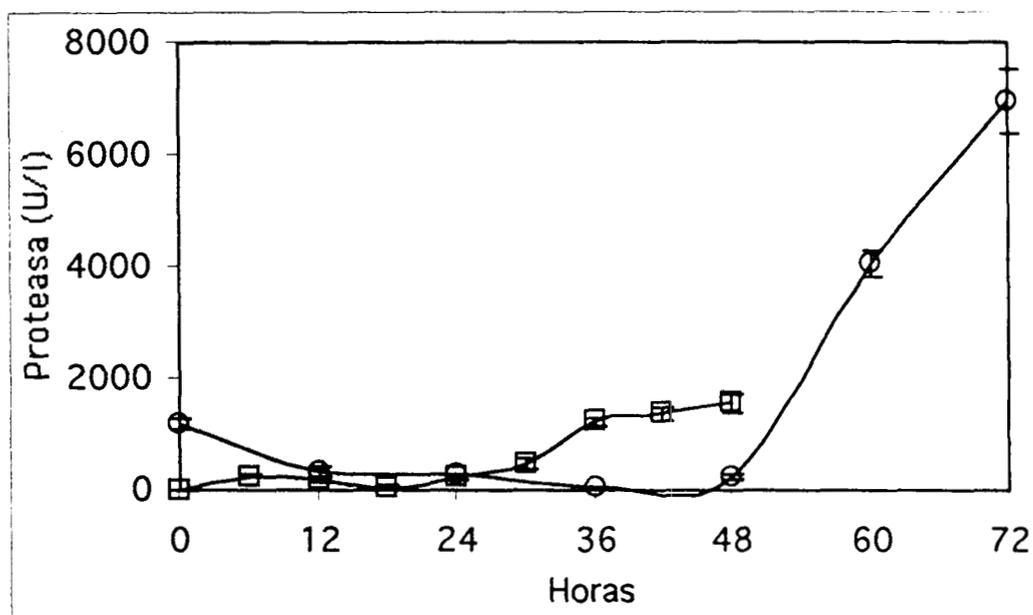
catabólica. En el caso de la fermentación sólida los niveles de glucosa no aumentan lo suficiente como para sobrepasar el nivel umbral para producir la respuesta de represión, pero si para estimular el crecimiento y mantener la estimulación de los genes *suc2*, lo que explicaría la síntesis aumentada de hidrolasas por la adición de glucosa, tal como en los experimentos de Aguilar y Huitrón (1987) explicados anteriormente.

En el caso de la fermentación líquida con altas concentraciones de sacarosa, lo que se tiene es un cuadro metabólicos donde la concentración inicial de la glucosa actúa como estimulante de la síntesis de la invertasa, pero los niveles extracelulares de glucosa aumentan rápidamente como resultado de la hidrólisis de la sacarosa. Esto debería producir la represión catabólica de la invertasa, pero debido a la baja concentración del oxígeno en el medio de cultivo la concentración intracelular de ATP es baja, por lo que no se activa el represor *creA* y como resultado la invertasa no sólo no deja de producirse, sino que se estimula su producción por gramo de biomasa. Esto aumenta la concentración de la glucosa en el interior de la célula y junto con el cuello de botella de la fosforilación oxidativa termina produciendo una desviación del metabolismo hacia la producción de ácidos orgánicos intermediarios del ciclo de Krebs, específicamente la producción de ácido cítrico en el caso de *Aspergillus niger*. Este comportamiento ha sido reportado y aprovechado para la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (Carlson, 1987; Barford, 1990; Ko y col., 1994; Torres y col., 1996; Goel, 1999).

Todos estos resultados indican que la alta producción de biomasa es favorecida por la una mayor disponibilidad de oxígeno. La mejor distribución de altas

concentraciones de substrato es un elemento clave para una mayor productividad de la FS. El tipo de crecimiento en forma micelial podría ser la razón de que se secrete una mayor cantidad de invertasa extracelular en el tiempo del cultivo.

En la figura 3.3.7 se presenta la producción de proteasa por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida (O) y fermentación sólida (□) con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono.



**Figura 3.3.7 Producción de proteasa extracelular por *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida (O) y fermentación sólida (□) con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono.**

En esta figura puede observarse que en la fermentación líquida se secretan proteasas al medio de cultivo durante la germinación y durante los últimos tiempos de la fermentación, mientras que la fermentación sólida no presenta niveles significativos de proteasas en el extracto del medio de cultivo durante el tiempo de

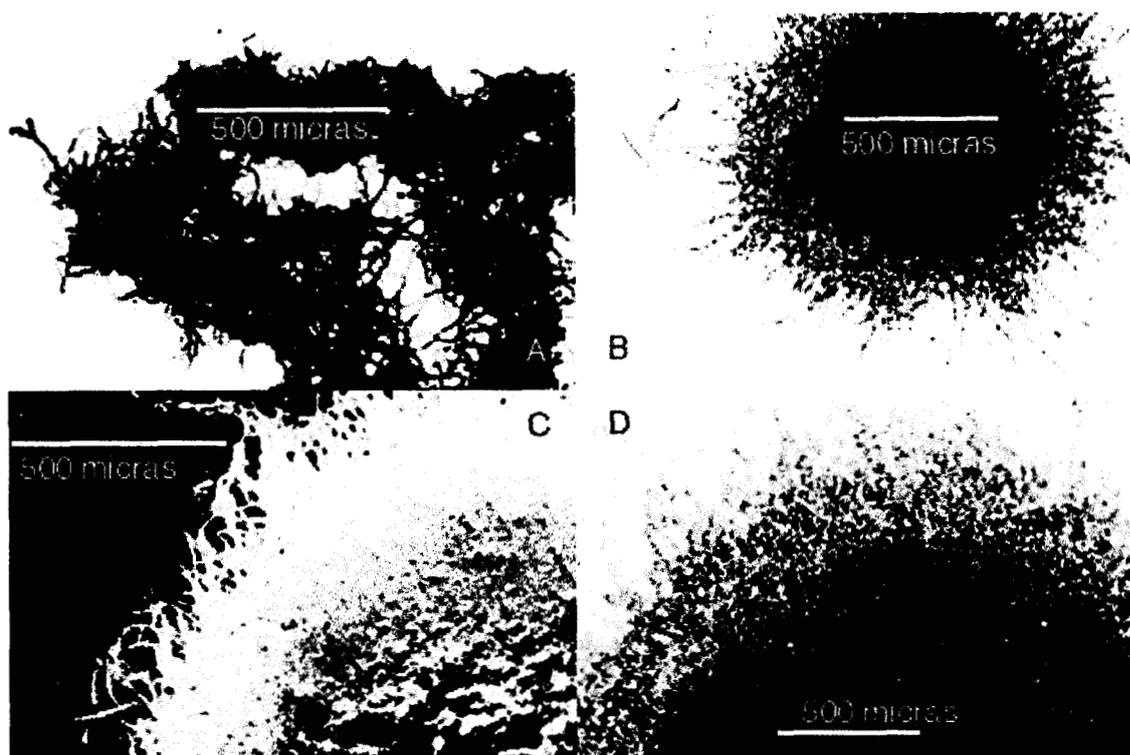
fermentación. Este comportamiento ha sido hallado en repetidas ocasiones en trabajos relacionados con el presente (Aguilar y col, 2000; Diaz-Godines y col., 2000 Comunicaciones personales) y ha sido reportado en la literatura por (Liu y col., 1998), lo que podría llevar a pensar que la fermentación sólida es un medio que resulta favorable para la estabilidad de las hidrolasas producidas. Esto no ocurre en los datos de este trabajo, donde la invertasa no resulta más estable en la fermentación sólida que en la fermentación líquida, ni en el trabajo de otros investigadores, quienes han llegado a utilizar la fermentación sólida como un sistema muy eficiente para la síntesis de proteasas (Tao y col., 1997). Por lo que la falta de producción de proteasas en fermentación sólida parece más relacionada con las condiciones de cultivo que con el tipo de cultivo.

Al analizar los tiempos de producción de proteasas con los perfiles de actividad enzimática se observa que no parece existir efecto de las proteasas sobre la estabilidad enzimática de los cultivos. Por ejemplo, la fermentación líquida no parece presentar una disminución de la actividad de invertasa como resultado de la presencia de las proteasas en el cultivo, mientras que las enzimas producidas en fermentación sólida no parecen ser más estables que las de los cultivos líquidos. Una posible explicación es que el método de determinación de proteasas no permite determinar la actividad real de proteasas en los cultivos, sea por la falta de un método que nos permita medir todas las proteasas presentes en los cultivos o debido a que las condiciones de los cultivos no sean propicias para la hidrólisis de la invertasa por estas proteasas.

### 3.4 Estudio de la morfología de crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida.

Se tomaron microfotografías para realizar la comparación del tipo de crecimiento en ambos sistemas de cultivo. Se realizaron medidas de los cultivos sólidos.

En la figura 3.4.1 se muestran las microfotografías del crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación líquida con 100 g/l de sacarosa inicial.



**Figura 3.4.1** Microfotografías del desarrollo de *Aspergillus niger* C28B25 en fermentación líquida con 100 g/l de sacarosa inicial. A) Micelio con 12 horas de crecimiento (100X). B) Pellet con 24 horas de crecimiento (100X). C) Pellet con 48 horas de crecimiento (100X). D) Pellet con 60 horas de crecimiento (50X).

Al principio del cultivo líquido se observa un crecimiento en forma de micelio disperso. A las 24 horas se observa la formación de una zona pigmentada con

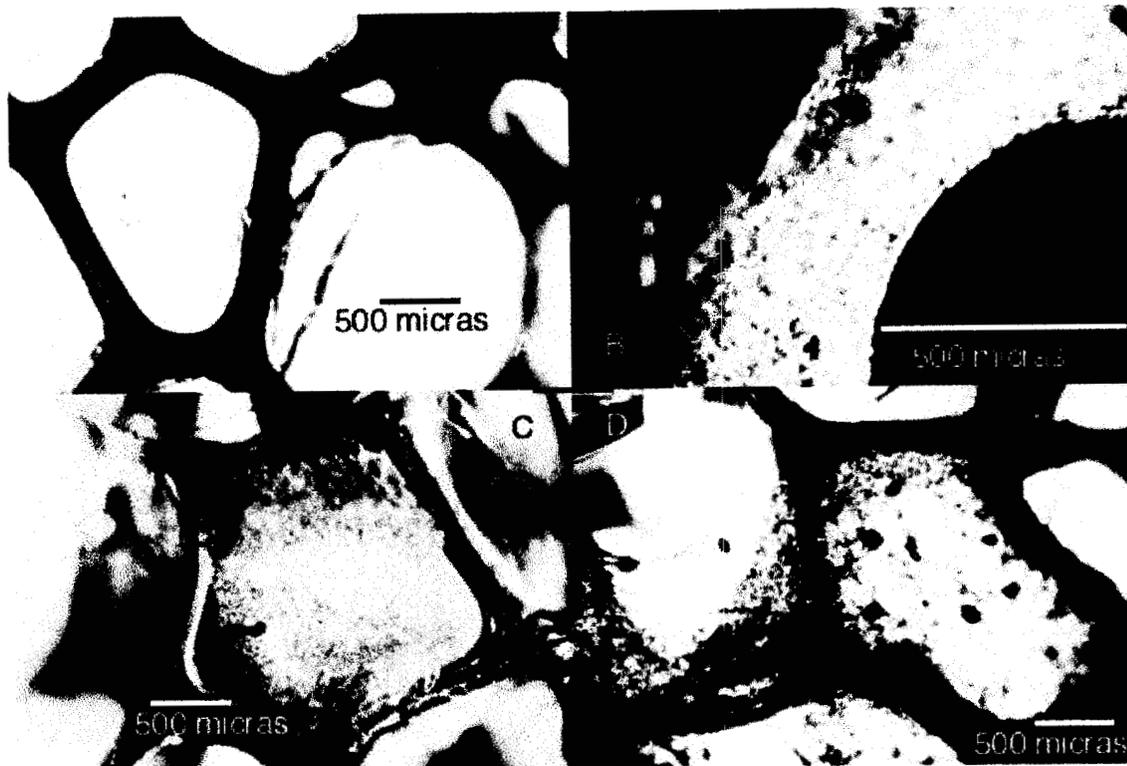
micelio altamente compactado que sirve como centro de crecimiento para *Aspergillus niger* en etapas posteriores de crecimiento. Tras 48 horas de cultivo puede observarse la formación de dos zonas dentro del pellet: el centro con micelio altamente compactado y una zona de micelio joven sin compactación. Al final de la fermentación se observa que la zona de micelio entrecruzado representa la mayor parte del micelio total del cultivo y el centro del pellet sigue presentando una pigmentación oscura. Esta ha sido reportada como un paso inicial de la esporulación en cultivo superficial, pero en fermentación líquida está presente desde tiempos tempranos del ciclo de vida. Es en este momento cuando empieza a observarse esporulación en zonas de micelio por arriba de la línea de flotación del micelio, pero la esporulación no se realiza en el interior de la matriz líquida del cultivo.

Mientras en cultivo superficial la mayoría de los hongos filamentosos, incluyendo a los del género *Aspergillus*, desarrollan hifas superficiales, sumergidas o aéreas, en cultivo sumergido el crecimiento de las hifas es tridimensional, lo que da como resultado una gran variedad de formas de cultivo de las cuales el crecimiento en forma de pellet esférico es la más común. La formación de los pellets está regulada por la agregación de las esporas, los tubos germinativos y el micelio suelto y la baja concentración de  $O_2$  que parece estar relacionada a una mayor velocidad de ramificación (Berry y col., 1977; Cocker y Greenshiel, 1977). En microbiología industrial se acepta de manera general que la forma de crecimiento más adecuado para la FL es en forma de pellet esférico debido a que facilita la filtración. Pero, aún cuando los pellets mejoran las propiedades de transferencia de oxígeno al interior del

hongo comparada con el micelio disperso, producen un centro anaeróbico y el crecimiento aeróbico se realiza solamente en la periferia del pellet y el centro del pellet se forma una zona anaerobia donde se inducen otras rutas metabólicas que disminuyen el rendimiento de la biomasa y las proteínas (Solomon, 1975; Pirt, 1972). Se ha sugerido que el crecimiento en forma de micelio se da como respuesta de autotropismo negativo, debido a la acumulación de toxinas en la vecindad de las esporas, pero existe otra hipótesis de que el tipo de crecimiento miceliar es una respuesta quimiotrópica a los gradientes de oxígeno y nutrientes del medio y como un método más eficiente para cubrir todo el substrato rápidamente. El mezclado en fermentación líquida impide la formación de gradientes lo que podría explicar el crecimiento en forma de pellets (Laukevics y col., 1985).

Una observación muy interesante de las microfotografías es la tinción diferencial que se observa entre las puntas de las hifas y el micelio compacto. Estas diferencias podrían estar relacionadas con dos fenómenos: el azul de metileno es un colorante específico de pared de hongos filamentosos y parece tener una mayor afinidad por la glucosamina altamente entrecruzada, de esta manera las paredes más viejas del cultivo al tener una mayor concentración de glucosaminas entrecruzadas tendrán más afinidad por el colorante. El segundo evento es el entrecruzamiento de las hifas que puede resultar en un menor lavado del colorante en la preparación y contribuir a dar un color más oscuro en las fotografías (Johansen, 1940).

En la figura 3.4.2 se muestran las microfotografías de crecimiento de *Aspergillus niger* sobre espuma de poliuretano.



**Figura 3.4.2** Microfotografías de *Aspergillus niger* crecidos sobre poliuretano  
**A)** micelio tras 6 horas de crecimiento (100X). **B)** Detalle de micelio con 12 horas de crecimiento (400X). **C)** micelio con 36 horas de crecimiento (100X). **D)** micelio con 42 horas de crecimiento (100 X).

Puede observarse (A) la presencia de centros de crecimiento miceliar filamentosos en las trabéculas del poliuretano, en la parte derecha se puede observar el PUF tal como es antes de crecimiento del micelio mostrando las trabéculas limpias y con una delgada capa de agua. Puede observarse (B) que *Aspergillus niger* forma puentes entre las trabéculas del poliuretano, usando estas mismas como soporte de crecimiento. Al crecer en forma de zarcillo el micelio se adhiere alrededor de las trabéculas y se ancla sobre el poliuretano. Puede apreciarse (C) la formación de redes de micelio que empiezan a llenar los espacios aéreo del poliuretano. Puede observarse (D) que el micelio ocupa todo el espacio aéreo del poliuretano lo cual

seguramente favorece un ambiente anaerobio y junto con el agotamiento de la fuente de carbono se induce la esporulación.

En la tabla 3.4.3 se muestran los valores obtenidos a partir de la medición directa de las fotografías de fermentación sólida.

**Tabla 3.4.3: Medidas obtenidas en los cultivos de *Aspergillus niger* sobre poliuretano.**

	Agujero ( $\mu\text{m}$ )	Trabécula ( $\mu\text{m}$ )	Capa de agua ( $\mu\text{m}$ )
Mínimo	420	180	50
Máximo	2200	260	70
Promedio	787	201	62
Desviación Standard	355	15	9
No. de muestras	100	100	50

Los valores mostrados en la tabla 3.4.3 se utilizaron para obtener el valor crudo de relación a/v y la superficie de cultivo, valores que podrían explicar algunas de las diferencias encontradas entre fermentación sólida y fermentación líquida. Dado que el grosor de la capa de agua es muy pequeño, la transferencia de oxígeno debe ser muy alta de acuerdo con la ley de Fick. Esto junto con la relación de a/v de  $161 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  y el valor de área total de cultivo de  $4032 \text{ cm}^2$ , que representa una gran superficie de intercambio de oxígeno, que ayudaría a mantener el suministro de oxígeno necesario para cubrir los requerimientos de oxígeno de la fermentación sólida con altas concentraciones de sacarosa.

Las fotografías reproducen los eventos de crecimiento reportados por Auria y col., en 1990 y 1993, quienes crecieron *Aspergillus niger* en amberlita como sustrato inerte, las microfotografías obtenidas en este trabajo muestran las siguientes fases de crecimiento:

- 1: Germinación, se observa la formación de centros de germinación con poco crecimiento (0-6 horas).
2. Crecimiento vegetativo: la elongación de las hifas ocupa el espacio libre presente en el poliuretano (12 a 36 horas).
3. Fase de limitación del crecimiento: no se observa más crecimiento del micelio vegetativo, en este momento se ha agotado aproximadamente el 95% del sustrato, se inicia la formación de las conidias. (42 a 48 horas).
4. Esporulación: se forman las conidias en la punta de las hifas aéreas y las cleistotecias y las conidias maduran (48 h).

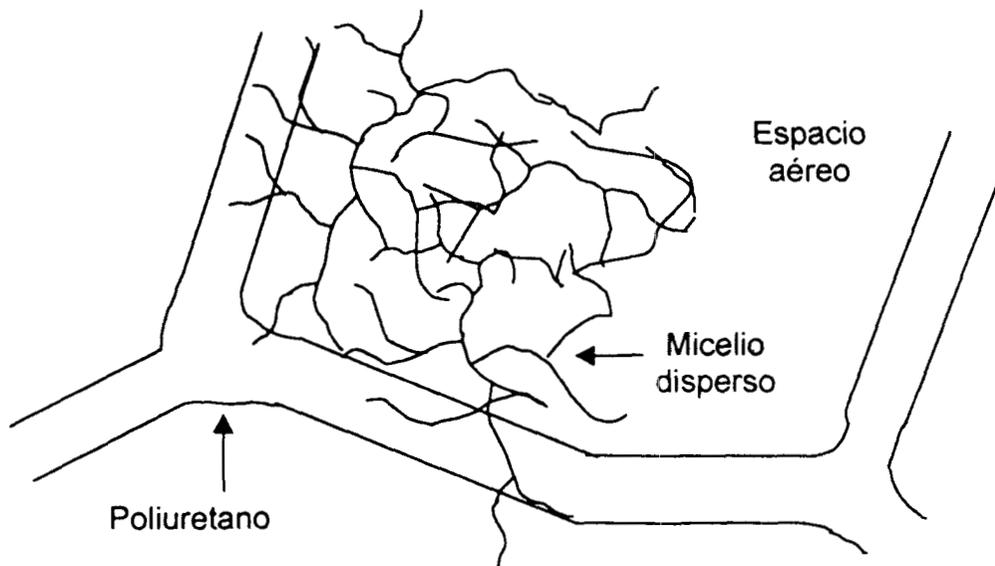
Los tiempos y el tipo de crecimiento definidos por nosotros y por Auria y col. (1993) son muy parecidos a los que obtenemos nosotros.

La diferencia principal entre estos dos sistemas de crecimiento es que en amberlita el crecimiento se lleva a cabo por medio del crecimiento superficial y en el poliuretano se lleva a cabo al interior del sustrato.

La ramificación típica de los hongos filamentosos resulta en micelio suelto, que termina llenando el espacio aéreo y el espacio disponible. Esto resulta ser la mayor limitante para la capacidad máxima de crecimiento de los hongos en el sustrato sólido (Laukevics y col., 1985).

Al calcular la densidad de crecimiento por volumen de reactor en lugar de volumen de medio, se obtuvieron en promedio 13.6 gramos de biomasa por litro de reactor, este valor esta muy lejano de los 80 g/l de biomasa que pueden llegar a obtenerse en fermentación líquida bajo las mejores condiciones. Laukevics y col. (1985) reportaron densidades de biomasa por litro de reactor en fermentación sólida de entre 5 y 20 gramos de biomasa por litro de cultivo para diversos cultivos, mientras que Auria y col. (1995) encontraron densidades de cultivo de 15 g/l de reactor, al parecer esta limitación se debe al llenado del espacio aéreo del soporte; aun cuando en este trabajo no encontramos esta limitación, al revisar las fotografías puede observarse que el espacio aéreo del poliuretano se encontraba lleno al momento de la esporulación, lo que indica que nos encontramos cerca de la saturación del sistema. Según Laukevics y col. (1985), la saturación del espacio aéreo en el soporte empacado, es la mayor limitación para el desarrollo de la fermentación sólida, pero esto, no impide que la fermentación sólida tenga una mayor productividad que la fermentación líquida.

Estas observaciones pueden ser de interés para caracterizar diversos soportes sólidos en función del área de contacto con la atmósfera y del volumen intersticial o del tamaño del poro del material.



**Figura 3: Esquema de crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación sólida sobre espuma de poliuretano, concebida a partir de las fotografías y las mediciones realizadas.**

En la FS puede observarse que la capa de agua que rodea al poliuretano es delgada, esto es debido a la superficie por unidad de volumen del poliuretano. Esto facilita enormemente la transferencia de oxígeno entre el aire y el hongo, tal como se muestra en la figura 3. Además, el hongo se desarrolla hacia el espacio aéreo del poliuretano. Lo que facilita aun más la transferencia de oxígeno hacia la biomasa. Se debe puntualizar que la transferencia de oxígeno sólo es efectiva en cultivos con grandes espacios aéreos como el poliuretano, ya que los cultivos que utilizan desechos agroindustriales como la pulpa de café o el bagazo de caña o el salvado de trigo están obligados a ser aireados de manera forzosa para permitir el crecimiento de organismos aeróbicos (Ikasari y Mitchell, 1998).

Tomasini y col. (1997), demostraron que el poliuretano no es un soporte adecuado para la producción de ácido giberélico, mientras que los soportes de origen agroindustrial como el bagazo de caña les permitieron obtener altos niveles de producción y biomasa.

Lo anterior indica que se debe ser cuidadosos al elegir un substrato para fermentación sólida y cumplir con las normas estipuladas por Raimbault (1998) y por Pandey y col. (1999), quienes afirman que uno de los pasos claves para la obtención de un cultivo sólido es la elección de un soporte adecuado para el organismo y para el proceso.

### **Discusión general:**

En los años 70's hubo un gran entusiasmo de que la fermentación sólida sería una alternativa viable a la fermentación líquida convencional, puesto que muchos metabolitos de alto costo como enzimas, metabolitos primarios y secundarios pueden ser producidos por éste método de cultivo, además se pensaba que la fermentación sólida podría ser una tecnología importante para los países en vías de desarrollo debido a que la inversión inicial que se requiere es baja, el medio de cultivo es normalmente barato y simple de preparar, la baja cantidad de agua utilizada normalmente reduce el riesgo de contaminación del cultivo, la fermentación sólida ofrece condiciones de cultivo que son muy parecidas a las que existen en el hábitat natural del hongo ( Viniegra, 1988; Raimbault, 1998). Sin embargo, estas ventajas no han podido explotarse a gran escala, debido a que hace falta un mayor conocimiento que permita la utilización de la fermentación sólida con substratos locales de bajo costo y la producción de metabolitos con procesos de baja tecnología.

Hasta la fecha existe una falta importante de conocimiento básico y de ingeniería relacionados con la fermentación sólida. Mucho del trabajo que se ha realizado es empírico o cualitativo, por lo que faltan datos cuantitativos y fisiológicos básicos. Pandey y col. en 1999 resumieron esta problemática con la siguiente frase: "esta bien establecido que la fermentación sólida es un sistema de cultivo más productivo que la fermentación líquida, pero hasta la fecha no ha podido establecerse de manera clara a que se debe este fenómeno".

Uno de los problemas principales para el estudio de la fermentación sólida es la dificultad de medir la biomasa producida por métodos directos. Esto se debe a que en la fermentación sólida el micelio se desarrolla de manera íntima con el soporte y lo invade. Además, cuando se utilizan soportes biodegradables el hongo crece a expensas del soporte impidiendo la determinación de la cantidad de carbono consumido por el hongo y dificultando la obtención de un balance de carbono fiable. Los intentos de determinar la biomasa producida en fermentación sólida por medio de la medición de las cantidades de componentes de la pared, proteínas o DNA, no han sido fructíferas y en su mayoría son inexactas o sufren de interferencias debidas al sustrato. La utilización de soportes inertes ha tropezado con la modificación de las condiciones de cultivo por la presencia del soporte, como en el caso del uso de la amberlita (Desgrandes y col., 1991; Roche y col., 1993; Auria y col., 1990, 1993, 1995; Raimbault, 1998).

El uso de soportes biodegradables ha dificultado también el estudio de la represión catabólica en fermentación sólida, debido a que los soportes sólidos de origen vegetal inducen la síntesis de enzimas no deseadas, la co-inducción de las enzimas de interés o la interferencia del soporte con la determinación de las actividades enzimáticas de interés.

Uno de los problemas que se han enfrentado hasta el día de hoy es que las comparaciones entre la fermentación sólida y la fermentación líquida se han realizado utilizando medios de cultivo diferentes, donde el medio de cultivo de fermentación sólida es normalmente mucho más rico que el medio de fermentación líquida.

La utilización de matraces agitados en este trabajo, aún cuando se sabe ampliamente que se trata de sistemas que están limitados por la baja transferencia de oxígeno del aire al medio de cultivo, obedece a que se trata de los sistemas normales de cultivo en laboratorio y a que se trata del método de cultivo utilizado por todos los investigadores que han realizado comparaciones entre fermentación sólida y fermentación líquida (Henzler y Schedel, 1991).

La fermentación sólida cuenta también con una serie de limitantes importantes antes de poder desarrollarse como una alternativa viable a gran escala para la fermentación líquida. La más importante es la limitación del crecimiento por la saturación del espacio aéreo, limitación que es fundamental en el medio sólido debido a que es inherente al soporte. Un soporte, para poder actuar como tal en fermentación sólida, debe ser un medio con una gran superficie de crecimiento por unidad de volumen, usualmente con  $10^3$  a  $10^6$   $\text{cm}^2/\text{cm}^3$ , al aumentar esta superficie, el espacio aéreo disponible para el crecimiento disminuirá, por lo que es importante encontrar el equilibrio adecuado para el organismo de interés. Otra limitación se refiere a la utilización de soportes con propiedades mecánicas adecuadas: un soporte que tienda a desmoronarse perderá su espacio aéreo y por ende tendrá poco crecimiento, si el soporte no absorbe suficiente agua no podrá soportar el crecimiento del microorganismo y si absorbe demasiada agua disminuirá la actividad del agua lo que inhibirá el crecimiento, lo anterior nos da una indicación de que la búsqueda de un substrato adecuado para la fermentación sólida que se requiere es otra área de estudio que merece ser tomada en cuenta (Raimbault, 1998; Pandey y col., 1999). Además, la utilización de substratos de origen vegetal en fermentación sólida

enfrenta problemas de difusión de oxígeno y de dispersión de calor tal como lo han afirmado Viniegra (1996), Ikasari y Mitchell, (1998) y Marsh y col., (1998) lo que dificulta el escalamiento de la fermentación sólida hasta niveles de interés industrial.

La utilización de altas concentraciones de fuente de carbono aumenta las diferencias observadas entre fermentación sólida y fermentación líquida probablemente debido a que podría agudizar los problemas de transporte en la fermentación líquida y explotar la alta capacidad de crecimiento del hongo en FS, y representa una de las mayores ventajas de la fermentación sólida en la degradación de substratos agroindustriales (Viniegra, 1996).

Los resultados de este trabajo y los reportados en la literatura son muy consistentes al demostrar que en la FL se presenta una acumulación importante de azúcares reductores, mientras que en FS no existe tal, lo que podría explicar por que no se presenta inhibición para el crecimiento o fenómenos de represión catabólica. Estos fenómenos afectan la velocidad de crecimiento y, muy probablemente, la capacidad de producción enzimática en fermentación líquida. Este efecto puede derivarse también de que en fermentación sólida el medio de cultivo se esparce sobre toda la superficie de cultivo, que en el poliuretano está en el orden de  $1 \cdot 10^3 \text{ cm}^2$  por gramo, lo que disminuye la concentración local de fuente de carbono y restringe la acción de las hidrolasas liberadas por el microorganismo a la vecindad del micelio.

Es de interés particular en este trabajo la falta de represión catabólica en *Aspergillus niger* al utilizar altas concentraciones de sacarosa como fuente de carbono. Este fenómeno que no se presenta con otras fuentes de carbono ha sido aprovechado en

múltiples ocasiones para aumentar la producción de  $\beta$  fructo-furanosidasas por *Aspergillus japonicum* (Chen y Liu, 1996), y que tiene un efecto muy importante en el rendimiento de biomasa en la fermentación líquida por arriba de 50 g/l de sacarosa como fuente de carbono (Nielsen, 1992; Ko y col., 1994, Torres y col., 1996).

Se demostró que estos fenómenos están ligados al tipo de cultivo y no al comportamiento de la cepa utilizada, al usar y encontrar el mismo comportamiento para varias cepas de *Aspergillus niger*.

La documentación del tipo de crecimiento en fermentación sólida y fermentación líquida permitió mostrar la dinámica de crecimiento inherente a cada tipo de cultivo y muestra de manera directa algunas de las diferencias importantes entre fermentación sólida y fermentación líquida, es importante mostrar que la morfología de crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación sólida es igual a la de crecimiento silvestre lo que podría explicar de manera simple el porqué de la mayor productividad de la fermentación sólida.

La utilización de poliuretano puede resultar en un avance significativo en el estudio de *Aspergillus niger* en fermentación sólida. Se trata de un medio limpio que permite el estudio directo de la formación de la biomasa y la síntesis de hidrolasas, además, es un medio que permite la comparación directa de la fermentación sólida y líquida, ya que la única diferencia entre la FL y la FS en este trabajo es la presentación de medio con y sin el poliuretano, es decir, como un líquido o como medio es un soporte sólido. Al no existir absorción del medio por el poliuretano no se afectó la actividad de agua del medio de cultivo. Una consideración extra al uso del poliuretano como

soporte para la fermentación sólida es el problema que puede representar la evaporación del medio de cultivo durante el tiempo de fermentación, lo que es especialmente importante en cultivos con aireación forzada. En este trabajo se determinó experimentalmente la evaporación de agua durante el tiempo de la fermentación sólida sobre el poliuretano con y sin micelio, tal como se explica en materiales y métodos. Los resultados indicaron una pérdida del 10% del agua del cultivo sin micelio y de sólo el 4% con micelio. La presencia del micelio disminuyó la cantidad del medio de cultivo que puede recuperarse, dados los experimentos de evaporación, podría pensarse que la menor recuperación de medio de cultivo sólidos, puede deberse a que el micelio es higroscópico y retiene agua.

Entre los siguientes trabajos a desarrollarse en esta área está la utilización de poliuretano con características diferentes: mayor espacio aéreo, mayor superficie de crecimiento, mayor afinidad por el agua, el uso de mezclas gaseosas diferentes, limitación de oxígeno, el estudio de los patrones de represión y secreción enzimática. En este trabajo ha podido reproducirse con éxito la mayoría de las diferencias existentes entre FS y FL, usando como soporte inerte al poliuretano, que es un sistema limpio, barato y de fácil preparación en el laboratorio. Al mismo tiempo este trabajo representa el primer paso hacia el estudio científico de los fenómenos básicos ligados a la fermentación sólida y que permitirá el estudio molecular de los aspectos de crecimiento, inducción y producción de enzimas.

## 4 Conclusiones

De acuerdo con los resultados de este trabajo se pueden formular las siguientes conclusiones:

*Aspergillus niger* crece más rápidamente, con una mayor biomasa máxima y con un mayor rendimiento de biomasa por gramo de substrato consumido en fermentación sólida que en fermentación líquida.

La producción de invertasa está al menos parcialmente unida a la producción de biomasa en ambos tipos de cultivo. Por lo tanto, la mayor productividad de los cultivos de fermentación sólida se debe, a la mayor y más rápida producción de biomasa en este tipo de fermentación.

Los cultivos de fermentación sólida en poliuretano, presentan crecimiento en forma de micelio disperso con un gran espacio aéreo y una superficie de intercambio gaseoso 160 veces mayor que en líquido, la cual presentan pellets con centros muy densos. De manera que las condiciones de cultivo y el tipo de crecimiento favorecen la transferencia de oxígeno al interior de la biomasa en fermentación sólida y la dificultan en fermentación líquida.

## **Propuestas:**

En este trabajo se presentaron los resultados de la comparación del crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación líquida y fermentación sólida. Estos resultados muestran el probable origen de algunas de las diferencias entre ambos sistemas de cultivo, pero están basadas en su mayor parte en indicaciones indirectas y el conocimiento sobre las respuestas metabólicas de los hongos filamentosos a las condiciones de cultivo encontradas o supuestas en base a los resultados.

Otro factor a tomar en cuenta es la incertidumbre inherente a algunas de las determinaciones, como la determinación de la biomasa por gravimetría en los primeros tiempos de cultivo.

Para poder probar de manera directa algunas de las ideas presentadas en esta tesis, podrían implementarse algunos experimentos de comprobación que se presentan en esta sección. Además, existe la posibilidad de refinar los experimentos presentados para obtener una determinación de los parámetros de crecimiento y producción más exacta e implementar otros sistemas de análisis de datos.

Estas consideraciones permitirán obtener resultados más confiables y mejorar la exploración de las diferencias entre la fermentación sólida y la fermentación líquida. Además, el uso del poliuretano como un sistema modelo para el estudio de la fermentación sólida abre vastas posibilidades que pueden permitir el estudio de las diferencias entre fermentación sólida y líquida de manera directa.

Podría determinarse de manera directa la idea de que la limitación en el ingreso del oxígeno en la fermentación líquida es la responsable del bajo rendimiento de la producción de biomasa y de la menor producción de biomasa por gramo de

biomasa. Para probar esta hipótesis podría llevarse a cabo los siguientes experimentos:

- a) Aumentar la transferencia de oxígeno en la fermentación líquida por medio del uso de matraces con mamparas, y el uso de fermentadores agitados y aireados.
- b) Limitar el ingreso de oxígeno en fermentación sólida por medio del uso de mezclas gaseosas con bajas concentraciones de oxígeno.
- c) Estudiar el efecto de la concentración del oxígeno en el medio de cultivo sobre la síntesis de metabolitos primarios y secundarios

El estudio de la regulación de producción enzimática de hidrolasas en hongos filamentosos podría realizarse por medio de los siguientes experimentos:

- a) Uso de mezclas con diferentes proporciones de inductor y glucosa
- b) Medir los niveles de inducción enzimática por medio de la determinación de los niveles de RNAm *in situ*.
- c) Seguir la ruta de la secreción enzimática por medio de la expresión de la "green-protein" fusionada con una secuencia reguladora y líder de una hidrolasa o por medio de inmunolocalización en microscopía electrónica.

Una de las principales diferencias entre la fermentación sólida y la líquida es que el modo de crecimiento como pellets en líquido y micelio disperso en sólido, resulta en diferencias importantes en los niveles de actividad metabólica de los cultivos. Determinar los niveles de actividad metabólica de los cultivos permitiría comparar de manera más precisa algunos parámetros de producción de hidrolasas. Esto requeriría, determinar la proporción de actividad del micelio activo por los niveles de RNAr.

La utilización de poliuretano como soporte inerte para el estudio de la fermentación sólida puede permitir el que se midan directamente las velocidades de crecimiento de las hifas individuales y realizar observaciones por medio del procesamiento de imágenes.

La realización de estos experimentos en trabajos subsecuentes permitiría explorar de manera más directa y exacta, las diferencias existentes entre fermentación líquida y fermentación sólida

## **Bibliografía**

- Acuña-Argüelles, M., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 43: 808-814.
- Aguilar, C.N (2000) Tesis doctoral, comunicación personal.
- Aguilar, G., Huitrón C. (1987) Stimulation of the production of extracelular pectinolytic activities of *Aspergillus sp* by galacturonic acid and glucose addition. **Enzyme Microbial Technology**. 9: 690-696.
- Andres, I., Peberdy, J.F. (1974) The production of invertase in *Aspergillus nidulans* with reference to the effects of glucose and sucrose. **Microbios**, 10:15-23
- Antier, P., Minjares-Carranco, A., Viniegra, G. (1993) Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation on coffee pulp. **Enzyme Microbial Technology** 15 254-260.
- Archer, D. B. (1994) Enzyme production by recombinant *Aspergillus*. **Bioprocess Technology**. 19: 373-393.
- Archer, D. B., Peberdy, J. F. (1997) The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**. 17(4):273-306.
- Auria, R., Hernandez, S., Raimbault, M., Revah, S. (1990) Ion exchange resin: a model for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. **Biotechnology Techniques**. 4(6): 391-396.

- Auria, R., Morales, M., Villegas, E., Revah, S. (1993) Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. 41: 1007-1013.
- Auria, R., Ortiz, I., Villegas, E., Revah, S. (1995) Influence of growth and high mold concentration on the pressure drop in aerated solid state fermentation. **Process Biochemistry**. 30(8): 751-756.
- Barford, JP. (1990) A general model for aerobic yeast growth: Batch growth., **Biotechnology and Bioengineering**. 35:907-920.
- Berry, D., Chmiel, A., Al Obaidi, Z. (1977) Citric acid production by *Aspergillus niger*. En **Genetics and physiology of Aspergillus** . Smith, J. E., Pateman, J. A. (Eds) Academic Press, pp 361-390.
- Boccas, F., Roussos, S., Gutierrez-Rojas, M., Viniegra-González, G. (1994) Production of pectinase on coffee pulp in solid-state fermentation system: selection of wild fungal isolates of high potency by a simple-step screening technique. **Journal of Food Science Technology**. 31: 22-26.
- Boddy, L. M., Bergès, T., Barreau, C., Vainstein, M. H., Dobson, M. J., Ballance, D. J., Peberdy, J. F. (1993) Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. **Current Genetics**. 24: 60-66.
- Bos, C. J.; Debets J. M.; Swart, K.; Huybers, A.; Kobus, G.; Slakhorst, S. M.; (1988) Genetic Analysis and the Construction of a Master Strain for Assignment to Six Linkage Group in *Aspergillus niger*. **Current Genetics**. 14: 437-443.
- Carlson, C., Botstein, D. (1982) Two differentially regulated mRNA with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**. 28: 145-154.

- Carlson, M. (1987) Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. **Journal of Bacteriology**. 169 (11): 4873-4877.
- Carter, B. L. A., Bull, A. T. (1969) **Biotechnology Bioengineering** 11: 785. En
- Nielsen, J. (1992) Modelling the growth of filamentous fungi. *Advances in biochemical Engineering/Biotechnology*. 46: 187-223.
- Chavira, R.J.R., Burnett , T. J., Hageman, J. (1984) Assaying proteinases with azocoll. **Analitical Biochemistry**. 136: 446-450.
- Chen, J. S., Saxton, J., Hemming, F. W., Peberdy, J. (1996) Purification and partial characterization of the high and low molecular weight form (S- and F-form) of invertase secreted by *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1296: 207-218.
- Chen, W. C., Liu, C. H. (1996) Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial technology**. 18:153-160.
- Chen-Tien, C., Yu-Yen, L., Moh-Shy, T., Cheng-Fwu, L. (1994) Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. **Biochemistry and Molecular Biology International**. 32(2): 269-277.
- Cocker, R., Greenshield, R.N. (1977) Fermenter cultivation of *Aspergillus*. En **Genetics and physiology of *Aspergillus*** . Smith, J. E., Pateman, J. A. (Eds) Academic Press, pp 361-390.
- De Winde, J.H., Crawels, M., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Winderickx, J. (1996) Differential requirement of the yeast sugar kinases sensing in establishing the catabolic-repressed state. **European Journal of Biochemistry**. 241: 633-643.

- Desgrandes, C., Vergoignan, C. George, M., Durand, A. (1991) Biomass estimation in solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 35:200-205.
- Diaz-Godínez, G. (2001) Tesis doctoral, comunicación personal.
- Dunn-Coleman, N. S., Bloebaum, P., Berka, R. M., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Przetak, M., Carter, G. L., LaCost, R., Wilson, L. J., Kodama, K. H., Baliu, E. F., Bower, B., Lamsa, M., Heinsohn. H. (1991) Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. **Biotechnology**. 9: 976-981.
- Favela-Torres, E. Cordova-Lopez, J. Garcia-Rivero, M. Gutierrez-Rojas, M. (1998) Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. **Process Biochemistry**. 33(2): 103-107.
- Favela-Torres, E., Garcia-Rivero, M., Cordova-Lopez, J., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Gutierrez-Rojas, M., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P., Huerta Ochoa, S. (1996) Kinetics of *Aspergillus niger* growth at high glucose concentrations in different types of the culture. **En Advances in solid state fermentation**. Roussos, S. Lonsane, B.K., Raimbault, M., and Viniegra-Gonzalez, G. Ed. Kluwer academic publishers. Netherlands.
- Fujishima, F., Uchida, K., Yoshino, H. (1972) Enzyme production by molds in sponge culture. **Journal of Fermentation Technology**. 50, 724-730.
- Gascon, S., Lampen, J. O. (1968) Purification of the internal invertase of yeast. **Journal of Biological Chemistry**. 243: 1567-1572.

- Gascon, S., Neumann, N. P., Lampen, J. O. (1968) Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases. **Journal of Biological Chemistry**. 243: 1573-1577.
- Goel, A., Lee, J., Domach, M.M., Atai, M.M. (1999) Metabolic fluxes, pools and enzyme measurements suggest a tighter coupling of energetics and biosynthetic reactions associated with reduced pyruvate kinase flux. **Biotechnology and Bioengineering**. 64(2): 129-134.
- Grajek, W. P., Gervais, H. (1987) Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma Viride* TS in solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**. 9: 658-662.
- Henzler, H. J., Schedel, M. (1991) Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. **Bioprocess Engineering**. 7: 123-131.
- Herrera, T., Ulloa, M. (1990) **El reino de los hongos Micología básica y aplicada**. 1ª Ed., Fondo de Cultura Económica. Mexico.
- Hesseltine, C. W. (1972) Solid State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. 13:517-532.
- Ikasari, L., Mitchell, DA. (1998) Mimicking gas and temperature changes during enzyme production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**. 20: 349-353.
- Johansen, D. A. **Plant Microtechnique**. 1<sup>st</sup> Ed. McGraw-Hill. U.S.A. 1940.
- Kluyver A. J., Perkin, L. H. C. (1933) Methods to study the metabolism of molds. **En Genetics and physiology of Aspergillus** . Smith, J. E., Pateman, J. A. (Eds) Academic Press, 1977, pp 361-390.

- Ko, Y. F., Bentley, W. E., and Weigand, W. A. (1994) A metabolic model of cellular energetics and carbon flux during aerobic *Escherichia coli* fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. 43:847-855.
- Kubicek-Pranz, E. M., Mozelt, M., Röhr, M., Kubicek, C. P. (1990) Changes in the concentration of fructose-2,6-biphosphate in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentrations. **Biochimica et Biophysica Acta**.1033: 250-255.
- Kulmburg, P., Sequeval, D., Lenouvel, F., Mathieu, M., Felenbok, B. (1992) Identification of the promoter region involved in the autoregulation of the transcriptional activator ALCR in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**. 12(5): 1932-1939.
- Kuster-van Someren, M. A., Kester, H. C. M., Samson, R. A., Visser, J. (1990) Variation in pectinolytic enzymes of the black *Aspergilli*: A biochemical and genetic approach. In **Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification**, J. I. Pitt and R. A. Samson Eds. Plenum Press, New York, pp 321-334.
- Lapadatescu, C., Bonnarne, P. (1999) Production of aryl metabolites in solid-state fermentations of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **Biotechnology Letters**. 21:763-769.
- Laukevics, J. J, Apsite, A. F., Viesturs, U. S., Tengerdy, R. P. (1985) Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation on wheat straw. **Biotechnology and Bioengineering**. 27: 1687-1691.

- Lekha, P. K., Lonsane, B.K. (1994) Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**. 29:497-500.
- Liu, F., Li, W., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M. (1998) Inhibition of extracellular protease secretion by *Aspergillus niger* using cell immobilization. **Biotechnology Letters**. 20(6) 539-542.
- MacKenzie, D.A., Jeenes, D.J., Belsaw, N.J. Archer, D.B. (1993) Regulation of secreted proteins production by filamentous fungi: Recent developments and perspectives. **Journal of General Microbiology**. 193: 2295-2307.
- Marsh, A. J., Mitchell, D. A., Stuart, D. M., Howes, T. (1998) O<sub>2</sub> uptake during solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor. **Biotechnology Letters**. 20(6): 67-611.
- Mavituna, F., Sinclair, C. G. (1985) A graphical method for the determination of critical biomass concentration for non-oxygen-limited growth. **Biotechnology Letters**. 7(2):69-74.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. 31(3): 426-428.
- Minjares-Carranco, A, Trejo-Aguilar, B. A., Aguilar, G., Viniestra-González, G. (1997) Physiological comparisons between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **Enzyme and Microbial. Technology**. 21: 25-31.

- Moo-Young, M., Moreira A. R., Tengerdy R. P. (1983). Principles of Solid-Substrate Fermentation. En: The Filamentous Fungi. Vol. IV **Fungal Technology**. Esis, E.; E. Smith; D. R. Berry & B. Kristiansen, (Edit.), Arnold, London. pp 117-143.
- Mukherjee, K., Sengupta, S. (1985) The production of constitutive invertase and inulinase by the mushroom *Panaeolus papillonaceus* in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**. 31:773-777.
- Mukhopadhyay, S. N., Ghose T.K. (1976) Oxygen participation in fermentation (Oxygen microorganism interactions). **Process Biochemistry**, June: 19-27.
- Nielsen, J. (1992) Modelling the growth of filamentous fungi. **Advances in biochemical Engineering/Biotechnology**. 46: 187-223.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniegra-González, G., Raimbault, M. (1988) Solid state culture of *Aspergillus* in support. **Journal of Fermentation Technology**. 66: 57-62
- Pandey P., Selvakumar, P., Soccol, C. R., Nigan, P. (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**. 27(1): 491-162.
- Pandey, A. (1992). Recent Process Developments in Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**. 27: 109-117.
- Peberdy, J. F. (1994) Protein secretion in filamentous fungi trying to understand a highly productive black box. **Trends in Biochemistry**. 12: 50-57.
- Pérez J. A., Rodríguez, J., Rodríguez, L., Ruiz, T. (1996) Cloning and sequence analysis of the invertase gene INV 1 from the yeast *Pichia anomala*. **Current Genetics**. 29:234-240.
- Pirt, J. (1975) **Principles of microbial, and cell cultivation**. Academic Press. Blackwell Scientific Publications, London.

- Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Hemmons, L. M.; McDonald, M. K. D.; Bufton, A. W. J. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**. 5:141-238.
- Quiroga, E. N., Vattuone, M. A., Sampietro, A. R. (1995) Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1251: 75-80.
- Raimbault, M. (1998) General and microbiological aspects of solid state fermentation. Process Biochemistry, 1(3) in **Electronic Journal of Biotechnology**. www.ejb.org
- Ramamurthy, V., Kothari, R. M. (1993) Journal of Biotechnology. 27: 349-354. En Liu, F., Li, W., Ridgway, D., Gu, T., and Moo-Young, M. (1998) Inhibition of extracellular protease secretion by *Aspergillus niger* using cell immobilization. **Biotechnology Letters**. 20(6) 539-542.
- Ramesh, M. V., Lonsane, B. K. (1991a) Ability of solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis* M 27. **Applied Microbiological. Biotechnology**. 35: 591-593.
- Ramesh, M. V., Lonsane, B. K. (1991b) Regulation of alpha-amylase production in *Bacillus licheniformis* M27 by enzyme end-products in submerged fermentation and its overcoming in solid state fermentation system. **Biotechnology Letters**. 13: 355-360.
- Reinfeberger, E., Boles, E., Ciriacy, M. (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the triggering mechanism of glucose repression. **European Journal of Biochemistry**. 245: 324-333.

- Righelato, R. C. (1975) Growth kinetics of mycelial fungi. En **Filamentous fungi vol.1 (Industrial mycology)**. Smith, J. E., Berry, D. (Eds.) Edward Arnold, London.
- Roche, N., Venague, A., Desgranges, C., Durand, A. (1993) Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. **Biotechnology Advances**. 11:677-683.
- Romero-Gómez, S.J., Augur, C., Viniestra-González, G. (2000) Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Biotechnology Letters** 22: 1255-1258.
- Ronne, H. (1995) Glucose repression in fungi. **Trends in Genetics**. 11: 13-17.
- Ruijter, G. J. G., Visser, J. (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. **FEMS Microbiology Letters**. 151:103-114.
- Shankaranand, V. S., Ramesh, M. V., Lonsane, B. K. (1992) Idiosyncracies of solid state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. **Process Biochemistry**. 27: 33-36.
- Sols, A. (1969) Aspects of yeast metabolism. Mills, A. K. and Krebs, H. (Eds.) Blackwell Scientific Publications. Oxford, U. K. pp. 269.
- Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P., Viniestra-González, G. (1996) Production of pectinases by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation at high initial glucose concentrations. **World Journal of Microbiological. Biotechnology**. 12: 257-260.
- Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniestra-González, G., Gutierrez-Rojas, M. (1993) Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinases by

- Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Applied Microbiological Biotechnology**. 39: 36-41.
- Solomon, R. (1975) Growth of *Aspergillus* in liquid fermentors. En **Filamentous fungi vol.1 (Industrial mycology)**. Smith, J. E., Berry, D. (Eds.) Edward Arnold, London.
- Sorensen, T. K., Wallis, G. L. F., Peberdy, J. F. (1996) Fungal protoplast as tools for studies on protein secretion. **Biotechnology Letters**. 18(12):1375-1380.
- Tao, S., Peng, L., Beihui, L., Deming, L., Zuohu, L. (1997) Solid state fermentation of rice chaff for fibrinolytic enzyme production by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology Letters**. 19(5): 465-467.
- Tengerdy, R. D (1985). **Solid Substrate Fermentation**. Elsevier Science Publishers. 200: 96-99.
- Tomasini, A., Fajardo, C., Barrios-González, J. (1997) Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** . 13:203-206.
- Torres, N. V., Riol-Cimas, J. M., Wolschek, M, Kubicek, C. P. (1996) Glucose transport by *Aspergillus niger*. The low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 44:790-794.
- Vainstein, M. H., Peberdy, J. F. (1990) Solubilization of a cell wall invertase in *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**. 71: 265-270.
- Viniegra-González, G (1988). Perspectives and Limitations of Solid-State Fermentation in Mexico. En: Raimbault, M. (Edit.). **Solid-Sate Fermentation in**

**Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials.** ORSTOM, Montpellier, France.  
pp 67-72.

Viniegra-González, G. (1996) Solid state fermentation: Definition, characteristics, limitations and monitoring. En **Advances in solid state fermentation** Roussos, S. Lonsane, B.K., Raimbault, M., and Viniegra-Gonzalez, G. Kluwer academic publishers Netherlands.

Walsh, M.C., Scholte, M., Valkier, J., Smiths, H.P., Van Dam, K. (1996) Glucose sensing and signalling properties in *Saccharomyces cerevisiae* require the presence of at least two members of the glucose transporter family. **Journal of Bacteriology**. 179: 2593-2597.

Wallis, G. L. F., Hemming, F. W., Peberdy, J. F. (1997) Secretion of two  $\beta$ -fructofuranosidases by *Aspergillus niger* growing in sucrose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 345(2): 214-222.

Wessels, J. G. H. (1999) Fungi in their own right. **Fungal Genetics and Biology**. 27:134-145.

Xu, D.B., Madrid, C. P., Röhr, M., Kubicek, C. P. (1989) The influence of type and concentration of the carbon source on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiological Biotechnology**. 30: 553-561.

Ye L., Krukceberg A.L., Berden, J.A. Van Dam, K. (1999) Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Sacharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. **Journal of Bacteriology**. 181 (15): 4673-4675.

Zhu, Y., Smits J. P., Knol W., Bol J. (1994) A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. **Biotechnology Letters**. 16(6): 643-648.