



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

“Producción de xilanasas y pectinasas por *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavipes* con desechos agroindustriales como materia prima a nivel biorreactor.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ERIKA MONSERRAT ALVARADO GONZÁLEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MARZO DEL 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JOSE GUILLERMO DE JESUS AGUILAR OSORIO

VOCAL: Profesor: AURORA IRMA ORTEGON AVILA

SECRETARIO: Profesor: FRANCISCO RUIZ TERAN

1er. SUPLENTE: Profesor: ELSI IDELI JUAREZ ARROYO

2° SUPLENTE: Profesor: FRANCISCO JAVIER DIAZ GARCIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 312, GRUPO DE FISIOLÓGIA DE HONGOS, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

JOSÉ GUILLERMO DE JESUS AGUILAR OSORIO

SUSTENTANTE :

ERIKA MONSERRAT ALVARADO GONZÁLEZ

Contenido

ABREVIATURAS.....	5
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....	6
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. HIPÓTESIS	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 OBJETIVO GENERALE	11
5. ANTECEDENTES	12
5.1 Fermentaciones	12
5.2 Biorreactor	13
5.3 Aspectos generales de los hongos.....	17
5.4 <i>Aspergillus</i>	18
5.5 <i>Aspergillus flavipes</i>	21
5.6 <i>Aspergillus niger</i> Tiegh. nom. Cons.	22
5.7 Enzimas involucradas.....	24
5.8 Desechos agroindustriales.....	26
5.9 Polisacáridos de la pared celular de las plantas	27
5.10 Degradación de la cadena del xilano.	30
5.11 Degradación de la cadena de pectina.....	32
5.12 Aplicaciones industriales.....	33
6. METODOLOGÍA.....	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS	38
7.1 Microorganismo	38
7.2 Sustratos complejos.....	38
7.3 Reactivos	38
7.4 Cultivo del microorganismo.....	39
7.5 Obtención y conteo de la cosecha de las esporas	39
7.6 Producción enzimática	40
7.7 Obtención del filtrado enzimático crudo.....	40
7.8 Cuantificación de azúcares reductores.....	40

7.9	Ensayos para determinación de las actividades enzimáticas	41
7.10	Determinación de proteína.....	42
7.11	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE	42
7.12	Zimogramas	42
7.13	Determinación de biomasa	43
8.	Resultados y discusión.....	48
8.1	Producción de los filtrados enzimáticos.....	48
8.1.1	Selección de sustratos para la producción de enzimas a nivel matraz con <i>A. niger</i> : producción de xilanasas.....	48
8.1.2	Selección de sustratos para la producción de enzimas a nivel matraz con <i>A. niger</i> : producción de pectinasas	54
8.1.3	Selección de sustratos para la producción de enzimas a nivel matraz con <i>A. flavipes</i> : producción de xilanasas	58
8.1.4	Selección de sustratos para la producción de enzimas a nivel matraz con <i>A. flavipes</i> : producción de pectinasas.....	62
8.1.5	Segunda fase a nivel matraz; selección de sustratos	65
8.2	Selección de condiciones de fermentación a nivel biorreactor	68
8.3	Medición de Biomasa por hidrólisis ácida.	73
8.4	Concentración de los filtrados enzimáticos	76
8.5	Identificación de enzimas.....	78
9.	Conclusiones.....	80
10.	Bibliografía.....	81

ABREVIATURAS

A.	<i>Aspergillus</i>
°C	Grados Celcius
CL	Cáscara de limón
CP	Concentrado de pectinasas/Concentrado pectinolítico
CPI	Cáscara de plátano
CX	Concentrado de xilanasas/Concentrado xilanolítico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
Frac.(s)	Fracción, fracciones
FP	Filtrado de pectinasas
FX	Filtrado de xilanasas
h	Horas
kDa	Kilodalton
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro
min	Minutos
MPM	Marcador de peso molecular
OM	Olote de maíz
ST	Salvado de trigo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-	Electroforesis desnaturalizante en geles de
PAGE	poliacrilamida
ST	Salvado de trigo
U	Unidades enzimáticas

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Mecanismo de agitación de un biorreactor
Figura 2	Morfología microscópica de <i>Aspergillus flavipes</i> .
Figura 3	Morfología macroscópica de <i>Aspergillus flavipes</i> en medio sabouraud.
Figura 4	Morfología microscópica de <i>Aspergillus niger</i>
Figura 5	Morfología macroscópica de <i>Aspergillus niger</i> en medio sabouraud
Figura 6	Representación esquemática del xilano
Figura 7	Representación esquemática de la pectina
Figura 8	Esquema de procedimiento para la cuantificación de biomas
Figura 9	Curva de crecimiento bacteriano.
Figura 10	Producción de xilanasas con <i>A. niger</i> . Comparación fuente de nitrógeno con salvado de trigo como fuente de carbono.
Figura 11	Producción de xilanasas con <i>A. niger</i> . Comparación fuente de nitrógeno con olote de maíz como fuente de carbono.
Figura 12	Producción de xilanasas con <i>A. niger</i> . Comparación fuente de nitrógeno con cáscara de limón como fuente de carbono
Figura 13	Producción de xilanasas con <i>A. niger</i> . Comparación fuente de nitrógeno con Cáscara de plátano como fuente de carbono.
Figura 14	Producción de xilanasas con <i>A. niger</i> . Comparación actividad máxima
Figura 15	Producción de exo-pectinasas con <i>A. niger</i> . Comparación fuente de nitrógeno con salvado de trigo como fuente de carbono
Figura 16	Producción de exo-pectinasas con <i>A. niger</i> . Comparación fuente de nitrógeno con olote de maíz como fuente de carbono
Figura 17	Producción de exo-pectinasas con <i>A. niger</i> . Comparación fuente de nitrógeno con cáscara de limón como fuente de carbono
Figura 18	Producción de exo-pectinasas con <i>A. niger</i> . Comparación fuente de nitrógeno con cáscara de plátano como fuente de carbono
Figura 19	Producción de exo-pectinasas con <i>A. niger</i> . Comparación actividad máxima
Figura 20	Producción de xilanasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación fuente de nitrógeno con salvado de trigo como fuente de carbono
Figura 21	Producción de xilanasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación fuente de nitrógeno con olote de maíz como fuente de carbono
Figura 22	Producción de xilanasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación fuente de nitrógeno con cáscara de limón como fuente de carbono
Figura 23	Producción de xilanasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación fuente de nitrógeno con cáscara de plátano como fuente de carbono
Figura 24	Producción de xilanasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación actividad máxima
Figura 25	Producción de exo-pectinasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación fuente de nitrógeno con salvado de trigo como fuente de carbono
Figura 26	Producción de exo-pectinasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación fuente de nitrógeno con olote de maíz como fuente de carbono
Figura 27	Producción de exo-pectinasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación fuente de nitrógeno con cáscara de limón como fuente de carbono
Figura 28	Producción de exo-pectinasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación fuente de nitrógeno con cáscara de plátano como fuente de carbono
Figura 29	Producción de exo-pectinasas con <i>A. flavipes</i> . Comparación actividad máxima
Figura 30	Actividad pectinolítica máxima. Segunda fase
Figura 31	Actividad xilanolítica máxima. Segunda fase
Figura 32	Comparación de la actividad xilanolítica máxima con <i>A. niger</i> , olote de maíz, nitrato de sodio y variando la aireación y agitación pH 5

Figura 33	Comparación de la actividad exo-pectinolítica máxima con <i>A. flavipes</i> , cáscara de limón y sulfato de amonio variando la aireación y agitación pH 3.5
Figura 34	Actividad de producción de pectinasas con <i>Aspergillus flavipes</i> , con las condiciones de cáscara de limón, sulfato de amonio, 200 rpm, 1 vvm.
Figura 35	Actividad de producción de xilanasas con <i>Aspergillus niger</i> , con las condiciones de olote de maíz, nitrato de sodio, 200 rpm, 1 vvm.
Figura 36	Cambio del pH a lo largo de la fermentación para la producción de xilanasas con <i>A. niger</i> y pectinasas con <i>A. flavipes</i> .
Figura 37	Curva de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> , con las condiciones de olote de maíz, nitrato de sodio, 200 rpm, 1 vvm.
Figura 38	Curva de crecimiento de <i>Aspergillus flavipes</i> , con las condiciones de cáscara de limón, sulfato de amonio, 200 rpm, 1 vvm.
Figura 39	Comparación de las actividades de cada filtrado enzimático medidos antes y después de concentrar las muestras.
Figura 40	Perfil electroforético y zimográfico de xilanasas con gel SDS-PAGE al 10%. A) Marcador molecular B) gel electroforético de xilanasas C)
Figura 41	Zimograma xilanasas Perfil electroforético y zimográfico de pectinasas con gel SDS-PAGE al 10%. A) Marcador molecular B) gel electroforético de pectinasas C) Zimograma pectinasas
Tabla 1	Ejemplos de enzimas de <i>Aspergillus</i> y sus aplicaciones en la industria de alimentos y bebidas. (Adaptada de Wösten et. Al., 2006).
Tabla 2	Condiciones óptimas en la primer fase de fermentación
Tabla 3	Condiciones probadas a nivel biorreactor

RESUMEN

En la industria de alimentos el sector enzimático tiene un papel fundamental. Los hongos filamentosos por piezas importantes en estos procesos al ser organismos capaces de producir y secretar un amplio espectro de enzimas como parte de su metabolismo natural. Las enzimas pectinolíticas y xilanolíticas son de gran importancia en el sector alimenticio, también son empleadas en la industria farmacéutica entre muchas otras. La producción de estas enzimas será el tema principal de esta investigación, variando el sustrato inicial para su producción.

Aspergillus y sus especies están entre los hongos económicamente más importantes y los mejor conocidos, siendo ampliamente usado para la síntesis de químicos, transformaciones biosintéticas y producción de enzimas. Por ende se trabajó con este género de hongo, seleccionando dos cepas pertenecientes al banco fúngico de nuestro grupo de investigación: *A. flavipes* FP-500 y *A. niger* FP-180 utilizando y seleccionando diversas fuentes de carbono provenientes de desechos agroindustriales y se probaron dos fuentes de nitrógeno así como el resto de las condiciones de la a fin de obtener una mejor producción enzimática en cultivo sumergido. A los filtrados enzimático libres de células se les determinaron actividades xilanolítica y pectinolítica. Con las mejores condiciones encontradas se realizó el escalamiento a nivel biorreactor.

1. INTRODUCCIÓN

La pared celular de plantas es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, está compuesta por tres grupos de polisacáridos principalmente: celulosa, hemicelulosa y pectina; las enzimas que degradan estos polisacáridos son: celulasas, hemicelulasas y pectinasas. Existen diversas aplicaciones de enzimas en la industria de alimentos, por lo que la producción de éstas ha cobrado un elevado valor agregado. En este estudio se buscó llevar a cabo el escalamiento de la producción de enzimas, a nivel biorreactor, buscando las condiciones para incrementar la cantidad de enzima producida.

Las enzimas pectinolíticas y xilanolíticas son de gran importancia en el sector alimenticio, las pectinasas son empleadas en la clarificación de vinos, jugos de fruta (Grassin, Fauquemberg, 1996); en la panificación y como mejoradores de la masa (Bajpai, 1997). Estas enzimas son el tema principal de esta investigación.

En este proyecto se utilizaron dos cepas de hongos, *Aspergillus niger* FP-160 y *Aspergillus flavipes* FP-500. El género *Aspergillus* tiene considerable importancia debido a la capacidad que presenta para producir enzimas, por lo que es importante entender y aprovechar la capacidad productora de enzimas de estos microorganismos.

Se trabajó con desechos agroindustriales que están como fuentes de carbono, eligiendo en el transcurso del proyecto el que otorga la mayor producción enzimática. Por otro lado, y debido a la composición rica en polisacáridos, se pueden obtener más de un sistema enzimático. Se evaluaron condiciones diversas de cultivo y sustratos y se seleccionaron las mejores para incrementar la producción tanto a nivel matraz como de biorreactor.

2. JUSTIFICACIÓN

Los desechos agroindustriales representan una fuente importante de material ligno-celulósicos considerados basura no sólo en nuestro país sino a nivel mundial. En el procesamiento de los alimentos o en industrias donde se utilizan como materia prima productos agrícolas, estos se van generando a lo largo de estos procesos. Por lo anterior es necesario buscar la forma en que se aprovechen esos desechos.

Una alternativa de utilización de estos desechos agroindustriales es la producción de enzimas, mediante procesos fermentativos en los que estos materiales sean aprovechados como fuente de carbono para los microorganismos. Esto determina la importancia de esta investigación. Por otro lado, se utilizó cepas fúngicas autóctonas que han sido utilizadas para diversos estudios, y de las que se esperan buenos resultados en la producción de las enzimas de interés en este estudio.

3. HIPÓTESIS

Debido a la habilidad que tienen los organismos del reino fúngico de segregar enzimas capaces de degradar diversos polisacáridos del medio y así obtener los nutrimentos necesarios para proliferar y tomando en cuenta la composición de los desechos agroindustriales, rica en polisacáridos, se espera que los hongos utilizados produzcan las enzimas estudiadas para la degradación de esos polisacáridos, entre las que se encontrarán las xilanasas y pectinasas, así como algunas enzimas accesorias que coadyuvarán a la obtención de azúcares para el crecimiento de los hongos y la producción de las enzimas. Se obtuvieron cocteles ricos de enzimas degradadoras de polisacáridos presentes en los desechos agroindustriales utilizados como sustrato.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERALE

Evaluar diferentes desechos agroindustriales en la producción de enzimas pectinolíticas y xilanolíticas a nivel de matraz y biorreactor utilizando *Aspergillus niger* FP-160 y *Aspergillus flavipes* FP-500.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la producción de xilanasas y pectinasas a nivel matraz, utilizando las cepas *Aspergillus niger* FP-160 y *Aspergillus flavipes* FP-500, en medio mínimo.
- Evaluar la producción de xilanasas y pectinasas utilizando diferentes desechos agroindustriales como: cáscara de limón, olote de maíz, cáscara de plátano y salvado de trigo como fuente de carbono, probando cada una de las cepas a nivel matraz.
- Evaluar el efecto del nitrato de sodio y del sulfato de amonio como fuente de nitrógeno probando cada cepa y cada fuente de carbono sobre la producción de xilanasas y pectinasas.
- Seleccionar las mejores condiciones de agitación a nivel matraz.
- Escalar las mejores condiciones seleccionadas a nivel matraz al biorreactor, evaluando y seleccionando las mejores condiciones de aireación y agitación.
- Evaluar la producción enzimática con las condiciones óptimas seleccionadas en el bioreactor.

5. ANTECEDENTES

5.1 Fermentaciones

El concepto de fermentación se ha ido modificando con el tiempo y, actualmente, abarca una gran cantidad de procesos muy simples como los que se desarrollan a escala industrial- con controles bien establecidos y de gran utilidad para el hombre-, por lo que resulta complejo describirlo. Sin embargo, prevalecen dos criterios para su definición, uno bioquímico y otro microbiológico (Stanbury 2000)

Para fines de este trabajo se utilizará el concepto microbiológico de fermentación. Desde este punto de vista, en la actualidad, se entiende por fermentación aquel proceso en el que los microorganismos producen metabolitos o biomasa, a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas por los microorganismos.

Un proceso de fermentación, visto como un todo, está compuesto por tres etapas:

- El desarrollo del inóculo
- Diseño y preparación del medio de cultivo
- La producción de biomasa y de productos de interés.

5.2 Biorreactor

Un fermentador, también conocido como reactor o biorreactor, es un recipiente donde se lleva a cabo el proceso de fermentación. Su función principal es mantener al medio y al microorganismo en las condiciones adecuadas para lograr la mayor producción de los compuestos de interés. Es deseable que un fermentador cumpla con una serie de requisitos, entre los que se encuentran:

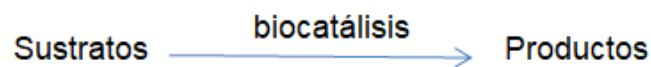
- Bajo consumo de energía.
- Capacidad para mantener un mezclado uniforme tanto del medio de cultivo como del microorganismo, con el mínimo de variaciones durante su operación.
- Adaptación fácil a diferentes procesos.
- Precio de acuerdo con las características del fermentador
- Transferencia buena de calor.
- Diseño mecánico simple.
- Controles de pH, oxígeno disuelto y temperatura.
- Facilidad en la toma de muestras.
- Sistema de eliminación de calor.
- Diseño que permita mantener condiciones de asepsia durante el proceso.

Generalmente, los fermentadores se construyen de vidrio o acero inoxidable. A escala de laboratorio, su volumen oscila desde uno hasta cincuenta litros y a escala industrial, pueden llegar hasta los trescientos mil litros. El volumen de trabajo es, aproximadamente, del 80% del volumen total (Stanbury 2000).

Existen muchos tipos de reactores; cada uno se encuentra diseñado de manera que pueda adaptarse a las condiciones de operación necesarias para optimizar la producción del compuesto de interés. Los utilizados en este proyecto son:

- El matraz Erlenmeyer
- El reactor de tanque agitado

Desde otro punto de vista, un biorreactor es cualquier dispositivo o recipiente que se utiliza para llevar a cabo una o más reacciones bioquímicas para convertir cualquier material de partida (o materia prima o sustrato) en algún producto. La conversión ocurre a través de la acción de un biocatalizador: enzimas, microorganismos, células de animales y plantas, o estructuras subcelulares como cloroplastos y mitocondrias. El sustrato de partida puede ser un producto químico orgánico simple (por ejemplo, azúcar y penicilina), un producto químico inorgánico tal como dióxido de carbono, o un material complejo pobremente definido tal como carne y estiércol animal. El producto de la conversión puede ser células (o biomasa), virus y productos químicos de diversos tipos. Los procesos que ocurren en un biorreactor se pueden resumir de la siguiente manera:



Hay muchos tipos de biorreactores disponibles y a veces, un tipo determinado puede operarse de diversas maneras para obtener resultados diferentes. Los diseños de biorreactores son necesarios para acomodar la gran diversidad de sustratos, productos y biocatalizadores así como los diferentes requisitos de los procesos de bioconversión (Todaro, 2014).

En la historia de los procesos de fermentación el “reactor” más utilizado a escala laboratorio ha sido el matraz Erlenmeyer. En la actualidad, es la herramienta más empleada para la selección de la cepa, la preparación del inóculo, el estudio inicial de las condiciones adecuadas para el desarrollo del microorganismo y la preparación del cultivo, antes de aumentar el tamaño del proceso (Hernandez Alicia, *et. al.*, Microbiología Industrial, 2006).

El constituyente principal de los microorganismos es el carbono, de ahí que no pueden prescindir de la fuente de este elemento; la más empleada la constituyen los carbohidratos, que además son fuente de oxígeno, hidrógeno y energía metabólica. Los carbohidratos participan en la biosíntesis del material celular, así como en la formación de los productos o metabolitos (Hernandez Alicia, *et. al.*, Microbiología Industrial, 2006).

Los biorreactores se utilizan en todo tipo de bioprocesos: los destinados a la fabricación de alimentos tales como la salsa de soya, tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales, y otros para hacer vacunas, antibióticos y muchos químicos. Los biorreactores que producen células microbianas y células de animales y plantas se conocen como fermentadores. Además de las células, en un fermentador también se pueden producir otros productos químicos o convertir (o biotransformar) un químico agregado al fermentador en una molécula diferente. Un fermentador puede contener un solo tipo de célula (es decir, operación monoséptica), o una población mixta de diferentes tipos de células. Los fermentadores que operan de forma monoséptica están diseñados como unidades selladas, con barreras que impiden la entrada de microorganismos contaminantes del medio ambiente. Otros tipos de biorreactores pueden contener solo entidades no viables (es decir, que no se pueden multiplicar) que incluyen células, enzimas aisladas e inmovilizadas mediante diversos métodos de inmovilización.

En la mayoría de las situaciones de bioprocesamiento, las células y los biocatalizadores se sumergen y suspenden en un caldo que mantiene cultivos vivos y disuelve los productos químicos que se modifican por la acción del biocatalizador. Los biorreactores para procesos sumergidos son generalmente diferentes a los utilizados en cultivos en estado sólido. Las fermentaciones en estado sólido se llevan a cabo con un sustrato sólido humedecido en ausencia de agua libre, por ejemplo, durante el compostaje, fabricación de quesos duros y fermentación de granos de

cacao para chocolate. El procesamiento sumergido se usa ampliamente en el tratamiento de aguas residuales y la producción de vacunas, antibióticos y muchos otros productos útiles. Los biorreactores para procesos sumergidos y en estado sólido se discuten a continuación (Todaro, 2014)

a. Cultivo sumergido

Los biorreactores agitados contienen una bomba cilíndrica con un eje central impulsado por un motor que soporta uno o más agitadores (Figura 1). Los baffles recorren toda la altura de trabajo del recipiente y evitan la formación de un vórtice del líquido y genera un flujo turbulento que favorece el intercambio de oxígeno en el biorreactor. El ancho del baffle es 1/10 o 1/12 del diámetro del tanque. Se deja una separación de aproximadamente 1.5% del diámetro del tanque entre la pared y el baffle para así evitar el estancamiento del fluido cerca de la pared. La relación de aspecto de trabajo del recipiente está entre 3 y 5, excepto en las aplicaciones de cultivo de células animales en las que las relaciones de aspecto normalmente no exceden de 2 (Todaro 2014).

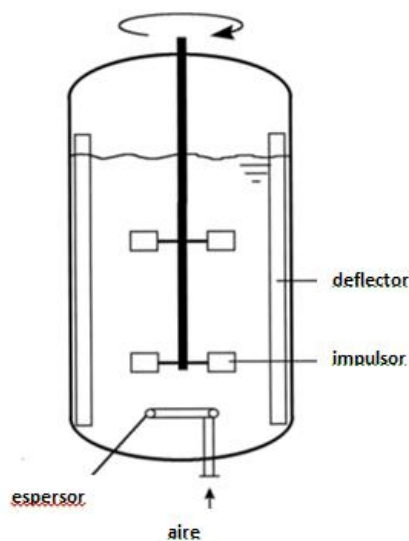


Figura 1. Mecanismo de agitación de un biorreactor.

b. Cultivo en estado sólido

El cultivo en estado sólido difiere marcadamente del cultivo sumergido. Los sustratos de las fermentaciones en estado sólido son sólidos particulados que contienen poco o nada de agua libre, (Todaro, 2014).

5.3 Aspectos generales de los hongos

Los hongos son parte del quinto reino según la clasificación del ecologista Whittaker (Hagens B., 2012). El reino de los hongos engloba una gran variedad y versatilidad dentro de las millones de especies de hongos que encontramos en la naturaleza. Podemos encontrar hongos en casi todos los ecosistemas de la tierra, pueden crecer en condiciones aerobias y anaerobias y se pueden aislar en el desierto o en el océano (Bauchop, 1989). Pueden crecer en un amplio espectro de temperatura, arriba de 45°C y junto con las bacterias juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica, contribuyendo con ello al desarrollo de los ciclos bioquímicos de los seis “elementos de la vida”- carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo y azufre.

Los hongos carecen de clorofila, y por lo tanto deben obtener sus nutrientes ya elaborados. La pared celular de los hongos está formada por quitina, celulosa o ambas, permitiéndoles un alto grado de interacción con el sustrato, esto es de suma importancia, tanto para la absorción de nutrientes así como para la secreción de enzimas o metabolitos.

Una de las características determinantes de todo el reino fúngico son sus estrategias nutricionales. Estos organismos secretan ácidos y enzimas dentro del ambiente que los rodea, rompiendo moléculas poliméricas en otras moléculas más simples que pueden ser absorbidas por las células fúngicas. Los hongos, así como los animales, son

heterótrofos. Mientras los animales ingieren la comida y luego la digieren, se podría decir que los hongos primero digieren el alimento y luego la ingieren. El acceso a los nutrientes es ayudado por las fuerzas mecánicas de las puntas de las hifas de los hongos que crecen para este fin en y a través del sustrato.

La concentración del microorganismo es un parámetro vital que se debe conocer en un proceso de fermentación, pues suministra no solo datos relacionados con la curva de crecimiento del microorganismo, sino con la cantidad de microorganismos con la cual iniciar el proceso. Cuando el producto deseado es la biomasa, la concentración de microorganismo representa la eficiencia del proceso. Si el interés va dirigido hacia los metabolitos, el mismo parámetro (la concentración de microorganismos) es una medida indirecta de su producción. (Hernández Alicia, *et. al.*, Microbiología Industrial, 2006).

5.4 *Aspergillus*

El género *Aspergillus*, pertenece al orde de los Eurotiales, a la clase de Euromicetes y a la familia Ascomicota (Geiser, 2006). Muchas especies de *Aspergillus* han sido clasificadas de manera tradicional, basados en las características de la cadena y su morfología creciendo en distintos medios de cultivo. Dentro del género *Aspergillus* se pueden encontrar hongos saprófitos, sin embargo también hay hongos oportunistas patógenos de humanos (*Aspergillus fumigatus*) o filopatógenos (*Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*) algunas especies son conocidas por producir aflatoxinas (*Aspergillus flavus*). Su uso en la industria para la producción de enzimas y metabolitos (*Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*) asimismo el estudio de *Aspergillus nidulans* como organismo modelo, hacen de este grupo de hongos filamentosos uno de los más conocidos. El genoma de los diferentes *Aspergillus*, su comparación y el conocimiento de su biología ayuda a elucidar la

estrategia que utiliza esta especie para la degradación de la biomasa de plantas para la obtención de carbono (Gugnani, 2003).

Es una de las más antiguas especies de hongos en ser nombrado, *Aspergillus* recibió su nombre de Micheli en 1729. Al visualizar la estructura de las esporas al microscopio, Micheli recordó el dispositivo usado por el clero católico romano para rociar agua bendita durante una parte de la liturgia llamado “asperge”. *Aspergillus* se ha convertido en una de las especies mejor conocidas y más estudiadas del grupo de hongos. Su prevalencia en el ambiente natural, facilidad para cultivarlo en medios de laboratorio y la importancia económica de muchas de sus especies aseguraron que muchos micólogos y microbiólogos industriales se vieran atraídos a su estudio (Bennett J.W., 2010).

El género *Aspergillus* es bien conocido por su amplio espectro de producción de enzimas en el medio adecuado. Al ser microorganismos que se desarrollan en diversos medios tienen la capacidad de producir y secretar enzimas para poder así degradar las fuentes de carbono y poder desarrollarse; es dicha habilidad la que se aprovecha en la industria.

El género *Aspergillus* es un grupo de hongos filamentosos con un gran número de especies. El primer registro de este hongo puede ser encontrado en Micheli's *Nova Plantarum Genera*, y una descripción más detallada de *Aspergillus* apareció a mediados del siglo XIX. En 1926 la primera clasificación de este hongo fue propuesta describiendo 11 grupos dentro del género. Una reexaminación del género fue publicado por Thom and Raper, identificando 14 grupos distintos. Algunos de estos grupos consistían en hongos patogénicos (ej. *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. parasiticus*), pero los más importantes en aplicaciones industriales son miembros del grupo negro de *Aspergillus* (*A. niger* y *A. tubingensis*). Gracias a la tradicional morfología a las nuevas técnicas moleculares y bioquímicas aplicadas en la reclasificación de este grupo de hongos, resulta una clara distinción de ocho grupos de *Aspergillus* negros (*A.*

niger, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. heteromorphus* y *A. allipticus*). Muchos productos obtenidos de estas especies han sido denominados como GRAS (Generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés), lo que les permite ser utilizados en la industria de alimentos.

La mayoría de la especies de *Aspergillus* logran adaptarse debido a su capacidad de degradar polímeros complejos de las plantas. Además, este hongo es utilizado para muchos procesos industriales incluyendo las enzimas (amilasas), agentes químicos (ácido cítrico) y alimentos (salsa de soya).

Las especies de *Aspergillus* son ejemplos típicos del estilo de vida de los hongos. Son comúnmente aislados del suelo y la hojarasca. El proceso de descomposición de estos hongos es muy importante en el ciclo natural de los elementos químicos, particularmente en el ciclo del carbón donde contribuyen en la reposición del dióxido de carbono y otros compuestos inorgánicos (Carroll y Wicklow, 1992).

Especies del género *Aspergillus* tiene un extenso repertorio químico. Productos básicos producidos en las “fabricas” de *Aspergillus* incluyen a los ácidos cítrico, glucónico, itacónico y kojico.

La enzimología comercial moderna es un próspero bio-negocio en el cual *A. niger* y *A. oryzae* son los mayores productores de enzimas hidrolíticas (Godfrey y West, 1996). Por su alta capacidad secretora, sus enzimas extracelulares pueden ser fácilmente explotadas para la producción de enzimas que se utilizan en la panadería, bebidas y las fabricas productoras de cerveza, en la elaboración de alimento para animales, y en la industria de la pulpa del papel. Nuevos y más extensos usos para las enzimas fúngicas han estado en la vista de la biotecnología contemporánea porque los expertos se están concentrando en métodos “verdes” de la transformación de la biomasa.

5.5 *Aspergillus flavipes*

Teleomorfo: *Fennelia flavipes* (Wiley & Simmons, 1997). Las colonias en CYA tiene un diámetro de 15-30 mm, son profundas pero velutinosas y ocasionalmente flocosas en el centro, el micelio es blanco o amarillo, las cabezas de la conidia nace uniformemente sobre la superficie de la colonia a veces con exudado claro presente, al reverso de la placa el color es amarillo pálido o claro.

Esta especie crece de 6-7°C máxima de 38-40°C y óptimo de 26-28°C (Domsch, *et al.*, 1980). Es capaz de crece en al menos 25% (m/v) NaCl, que corresponde a 0.82 a_w (Tresner & Hayes, 1971). Esta especie no tiene micotoxinas identificadas. *Aspergillus flavipes* es comúnmente encontrada en suelos tropicales (Domsch, *et al.*, 1980), pero no tan común en alimentos.

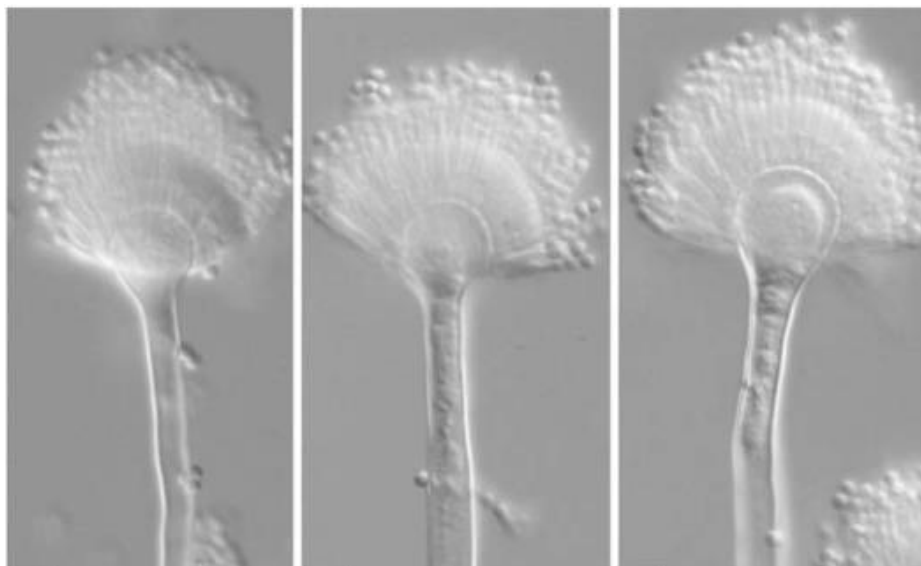


Figura 2. Morfología microscópica de *Aspergillus flavipes* (Pitt & Hocking, 2009).

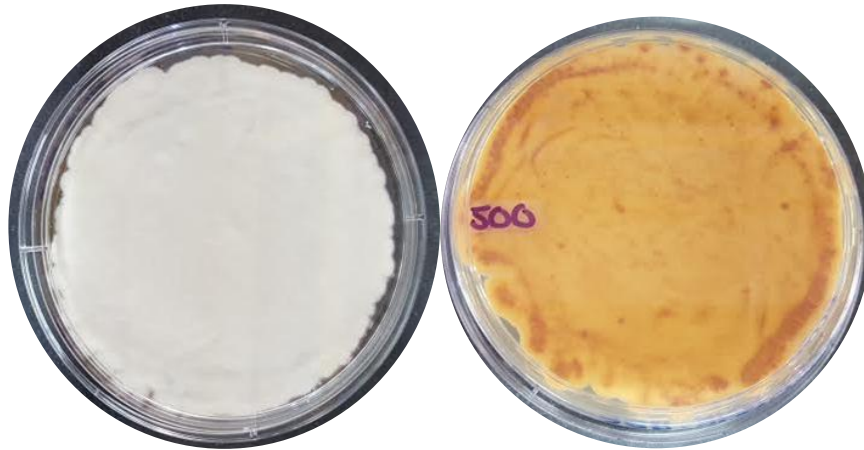


Figura 3. Morfología macroscópica de *Aspergillus flavipes* en medio Sabouraud. Facultad de Química, UNAM, Edificio E, Laboratorio 312.

5.6 *Aspergillus niger* Tiegh. nom. Cons.

Una de la especies mejor conocidas del reino Fungi es *Aspergillus niger*, distinguida por sus conodias esféricas negras, derivadas de colonias que muestran poco o ningún otro color.

La temperatura de crecimiento mínima es de 6-8°C, máxima de 45-47°C y óptima de 35-37°C (Panassenko, 1967; Leong et al., 2006b). *A. niger* es xerófilo: Ayerst (1966) reportó germinación a 0.77 a_w a 35°C, es capaz de crecer a pH menores a 2.0 con un alto a_w (Pitt, 1981). Se encontró que las microondas no tienen efectos en la conidia de *A. niger* y es relativamente resistente a la radiación UV, pero menos sensible que *A. carbonarius* o *A. alternata* (Valero et al., 2007b)

Aspergillus niger ha sido usualmente reconocido como un hongo benigno y ha sido ampliamente utilizado para la producción de enzimas e ingredientes para el procesamiento de alimentos. Se mantiene como un microorganismo GRAS.

Es el hongo más comúnmente reportado en los alimentos, es prevalente en climas calientes y alimentos empacados. Las esporas negras proveen protección de la luz solar y luz UV, proveyendo una ventaja competitiva en dichos hábitats (Valero et al., 2007b).

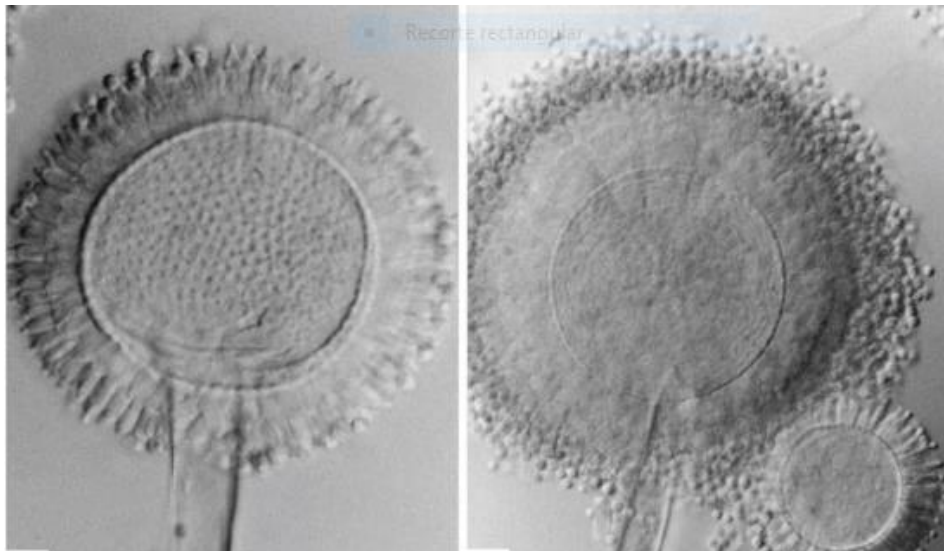


Figura 4. Morfología microscópica de *Aspergillus niger* (Pitt & Hocking, 2009).

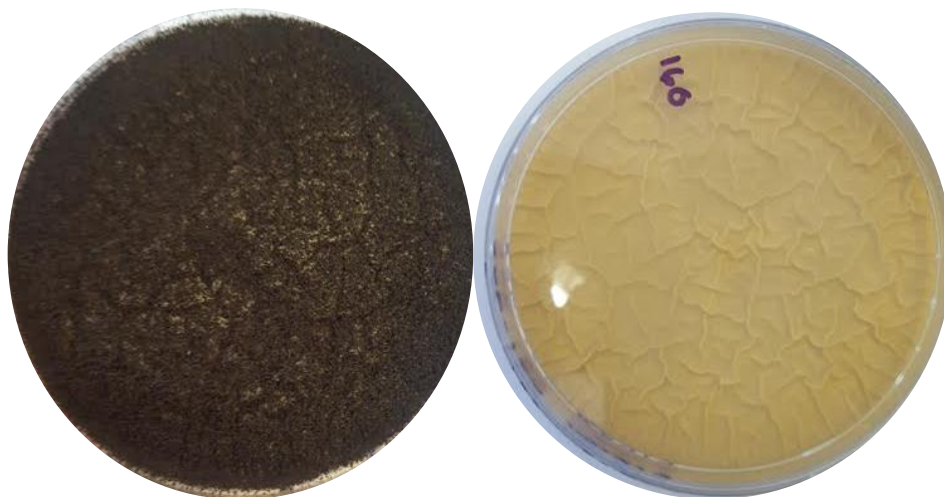


Figura 5. Morfología macroscópica de *Aspergillus niger* en medio Sabouraud. Facultad de Química, UNAM, Edificio E, Laboratorio 312

5.7 Enzimas involucradas.

Las enzimas tienen numerosas aplicaciones en la industria de alimentos y bebidas. Entre ellas están las α y β amilasa, proteasas, invertasa, pululanasa, glucosa-isomerasa, dextranasa, lipasa, lactasa, amiloglucosidasa, glucosa-oxidasa, pectinasa y otras. Las enzimas microbianas también tienen aplicaciones en otros sectores industriales (Woods Lea, Tucker G.A. 1992).

Los productos comerciales preparados a base de celulasas y xilanasas que están disponibles en el mercado, han sido obtenidos de hongos y bacterias de 4 géneros: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola* y *Bacillus* (Bhat, 2001; Ovando y Waliszewski, 2005; Polizeli et al., 2005).

Una de las aplicaciones más importantes de las xilanasas es en la industria de la pulpa y del papel. El pulpeo kraft involucra el cocimiento alcalino de la pulpa para remover el 95% de la lignina presente en la madera ya que las xilanasas son capaces de romper los enlaces con el ácido ferúlico, comúnmente unido a las cadenas de xilano, logrando así desestabilizar la unión a la lignina y haciendo más fácil su remoción. De este modo es más sencillo lograr el blanqueamiento del papel con ayuda de hipoclorito de sodio.

Las xilanasas, también se usan en la industria alimentaria en la clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café, extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas, maceración de materia vegetal y acondicionamiento de piensos para aves y cerdos.

En la industria de la panificación, las xilanasas se adicionan a la masa para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor. El efecto de las xilanasas es incrementar el volumen específico de los panes sin provocar un efecto colateral negativo en el manejo de la masa y puede atribuirse a la distribución de

agua de la fase del pentosano hacia la del gluten, ocasionando que el pan se vuelva menos seco y permanezca más tiempo fresco (N. Kulkarni, A. Shendye, R. Mala, 1999 y Ponce y Pérez, 2002)

Las endo xilanasas y exo xilosidasas catalizan la hidrólisis del xilano. Existe un creciente interés en la producción de enzimas xilanolíticas para aplicaciones industriales tales como, la bioconversión de residuos agroindustriales a biocombustibles, edulcorantes bajos en calorías y productos farmacológicos (Cruz C, *et al*, 2009)

Las enzimas pectinolíticas son muy usadas en la industria de alimentos. Este complejo de enzimas es extensamente usado para la producción de jugos de frutas y vino o de textiles, papel y sustituyentes para comida de animales.

Existen muchos microorganismos que producen pectinasas, tales como bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Sin embargo, las pectinasas más comerciales son las producidas por hongos filamentosos, primordialmente del género de *Aspergillus*. Estos hongos ofrecen la ventaja de secretar el 90% de las enzimas que producen al medio de cultivo, lo que simplifica la recuperación y purificación de las enzimas. Además *A. niger* es el organismo más ampliamente usado para la producción de pectinasas porque ha recibido la clasificación GRAS por parte de la FDA (Food and Drug Administration), que es la agencia gubernamental responsable de la regulación de alimentos y fármacos. En escala industrial, la producción de pectinasas mayormente se produce en medio sumergido, aunque el cultivo en medio sólido también ha sido ya investigado y probado en laboratorio y en una escala piloto. Una razón de que se haya mejorado el cultivo en sólido es por la alta concentración de biomasa que puede ser alcanzado con una baja represión de catabolitos (Grebechova R. Prieto L., 2006).

Las pectinasas poseen varias aplicaciones en diversas industrias. La industria que más se ha beneficiado con ellas es la alimentaria,

particularmente la industria procesadora de frutas y vegetales. El uso más antiguo y aún hoy más difundido es, junto con otro tipo de enzimas, para la optimización de los procesos de filtración y clarificación de jugos (manzana, uva) (Kashyap et al., 2001).

La acción de estas enzimas sobre protopectina, permite su aplicación para la extracción de pectina de los demás componentes del tejido vegetal, para la posterior purificación del producto, el cual es un aditivo alimenticio altamente utilizado como gelificante y estabilizante (Contreras Esquivel et al., 1997; Zapata Zapata et al., 2008). Además, esta acción permite la maceración de los tejidos vegetales (Nakamura et al., 1995; Zapata Zapata et al., 2007), cuyo objetivo es producir pulpas de frutas y vegetales para ser utilizadas como ingredientes en alimentos, fundamentalmente para bebés y ancianos.

5.8 Desechos agroindustriales

En la década de los años 70, una parte importante de los biotecnólogos de todo el mundo enfocaron sus investigaciones hacia la utilización y aprovechamiento de los residuos agroindustriales para la producción de compuestos útiles como insumos de otros procesos industriales; los primeros años la prioridad se enfocó hacia la generación de productos con valor agregado, años más tarde se sumó la prioridad de utilizar los residuos para reducir el impacto ambiental que ocasiona su disposición, y a partir del presente siglo la prioridad está enfocada a la producción de bioenergéticos y a la elaboración de nuevas formulaciones de alimentos para animales.

Ahora bien, la selección del medio es sumamente importante ya que de éste depende si la producción de enzimas es necesaria para el desarrollo del hongo o no. La inducción de la síntesis de pectinasas y xilanasas extracelulares por la fuente de carbono ha sido bien

documentada (Aguilar y Huitrón, 1987; Coughlan *et al.*, 1993; Maldonado y Strasser, 1998; De Vries *et al.*, 2000; Subramanyan y Prema, 2002; Malvessi y Silveira, 2004).

El olote, ampliamente rico en xilano (28-35 % base seca)(Saha 2003; Gupta y Kar, 2008), se desecha de diversas maneras, por esparcimiento sobre la tierra, por incineración al aire libre o mezclado con otros compuestos en la alimentación ganadera como forraje, generando ganancias muy bajas o nulas (SAGARPA 2010). A causa de esta concentración de xilano, el olote de maíz se ha venido empleando como sustrato en fermentaciones en medio líquido, para la producción dirigida de enzimas degradadoras de hemicelulosa y otros procesos de valor agregado (Gupta y Kar, 2008), pero se requiere de mayor información para el empleo de olote de maíz como sustrato-soporte en fermentación en estado sólido con la finalidad de producir metabolitos de interés.

De acuerdo con la FAO, a nivel mundial se desperdicia aproximadamente una tercera parte de los alimentos generados para consumo humano (Galanakis 2012). Este tipo de residuos se genera desde el campo de cultivo hasta la etapa de comercialización. En el mundo, los residuos vegetales son el recurso renovable más grande que existe y están compuestos en su mayor parte por celulosa y hemicelulosa, sustancias que son degradadas por microorganismos. (Casas Godoy, 2014)

5.9 Polisacáridos de la pared celular de las plantas

Los polisacáridos de pared celular provenientes de las plantas, son los compuestos orgánicos más abundantes que existen en la naturaleza. Representan el 90% del total de la pared celular de la planta y pueden dividirse en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina (McNeill, et al., 1984). La celulosa representa el mayor componente de los polisacáridos dentro de la pared celular y consiste en un polímero lineal de D-β-1,4-

glucosa. El polímero de celulosa está presente como una estructura ordenada (fibra), y su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular.

La hemicelulosa son polisacáridos más heterogéneos y es la segunda estructura orgánica más abundante en la pared celular vegetal. El mayor polímero de la hemicelulosa en cereales y madera es el xilano. El xilano consiste de un esqueleto principal de D- β -1,4-xilosa y puede estar ramificado por diferentes grupos tales como L-arabinosa, D-galactosa, acetil, feruloil, p-coumaroil y residuos de ácido glucurónico (Wilkie, et. al., 1977).

La estructura del xilano encontrado en la pared celular vegetal, puede diferir dependiendo de su origen, pero siempre la cadena principal se mantiene. La representación esquemática del xilano presentada (Figura6) también muestra las diferentes estructuras que pueden unirse a la cadena principal del xilano y que resulta en la gran variedad de estructuras del xilano que se encuentran en las plantas. Aunque la mayoría de los xilanos son estructuras ramificadas, también se han extraído algunos polisacáridos lineares. El xilano de los cereales contiene grandes cantidades de L-arabinosa y frecuentemente se refiere a ellos como arabinoxilano, mientras que el xilano de las maderas duras, regularmente se le refiere como glucuroxilano, esto debido a la alta cantidad de ácido D-glucurónico unido a la cadena principal. La arabinosa está conectada a la cadena principal del xilano con enlaces α -1,2 o α -1,3, unidos como residuos simples o como cadenas cortas laterales. Éstas cadenas laterales pueden contener también xilosa unidas a la arabinosa y a la galactosa con enlaces β -1,2, o unidos a la arabinosa con enlaces β -1,5 o al xilano mismo de la cadena principal, con enlaces β -1,4. Los residuos acetilo están unidos al O-2 o al O-3 de la xilosa de la cadena principal del xilano, pero el grado de acetilación difiere dependiendo del origen del que provenga el xilano. El ácido glucurónico y su 4-O-metil, están unidos a la cadena de xilano vía un enlace α -1,2, mientras que los residuos aromáticos (feruloil y p-coumaroil) se ha detectado que se unen sólo al O-

5 de los residuos terminales de arabinosa. Como consecuencia de todas están diferentes uniones, el xilano forma un grupo de polisacáridos muy heterogéneo (Carpita, 1993)

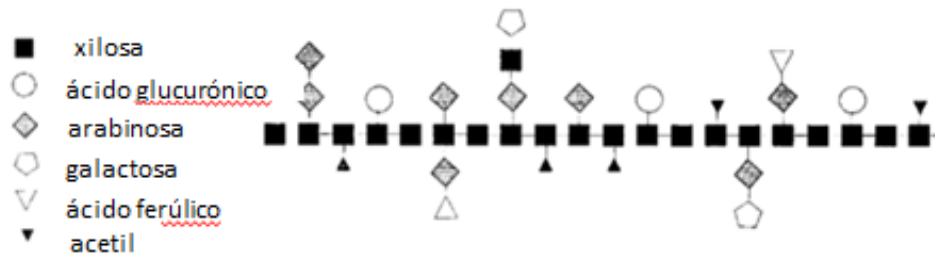


Figura 6. Representación esquemática del xilano

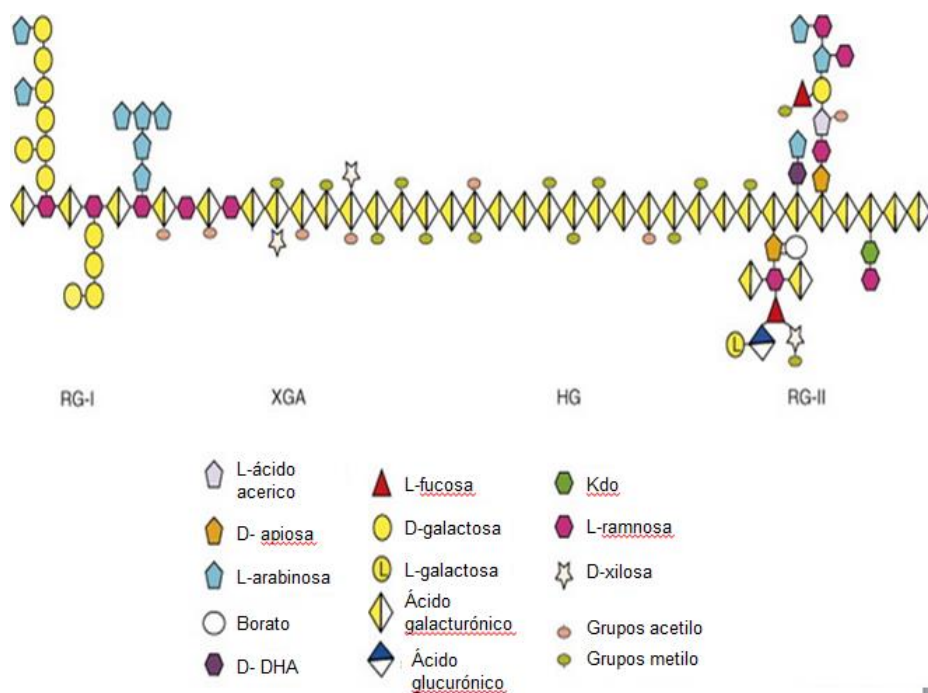


Figura 7. Representación esquemática de la pectina

La pectina forma otro grupo de heteropolisacáridos y consiste en una cadena principal de D- α -1,4-ácido galacturónico. En las regiones específicas "hairy", la cadena principal de ácido galacturónico es interrumpido por residuos de L-ramnosa unidos con enlaces α -1,2.

Cadenas largas consistentes principalmente de residuos de L-arabinosa y D-galactosa pueden unirse a los residuos de ramnosa.

Las pectinas son un grupo complejo de heteropolisacáridos que contienen dos diferentes regiones definidas. Las regiones suaves consisten de una cadena principal de residuos de ácido galacturónico unidos con enlaces α -1,4 que pueden ser acetilados en los O-2 u O-3 o metilados en el O-6. En las regiones "hairy", se pueden identificar dos diferentes estructuras, xilogalacturonano consistentes por D-xilosa sustituida con una cadena principal de galacturonano y ramnogalacturonano I. En el ramnogalacturonano (Figura 7) el residuo de ácido D-galacturónico en la cadena principal es interrumpido por residuos de ramnosa con enlaces α -1,2, en los que cadenas largas de arabinano y galactano se pueden unirse en el O-4. Las cadenas de arabinano consisten en una cadena principal conformada de residuos de L-arabinosa unida con enlaces α -1,5 que pueden ser sustituidas por residuos de L-arabinosa con enlaces α -1,3 y por residuos de feruloil unidos terminalmente al O-2 de los residuos de arabinosa. Las cadenas laterales de galactano contienen una cadena principal compuesta de residuos de D-galactosa unidas con enlaces β -1,4, que pueden ser sustituidas por residuos de feruloil en el O-6. Aproximadamente del 20 al 30% de los residuos de feruloil en la pectina de la remolacha, están unidos a las cadenas laterales del arabinano, mientras que otros residuos de feruloil están unidos a las cadenas laterales del galactano.

5.10 Degradación de la cadena del xilano.

La biodegradación de la cadena principal del xilano, depende de dos clases de enzimas. Las endoxilanasas pueden dividir la cadena principal de xilano en oligosacáridos más pequeños, que luego pueden degradarse aún más a xilosa por las β -xilosidasas. Ambas clases de enzimas, así como sus genes codificadores, se han caracterizado a partir

de muchos organismos. Se han identificado varias endoxilanasas en *Aspergillus*. Aunque se detecta variación en su masa molecular o pH óptimo, la mayor diferencia entre las enzimas está en su pI, que varía de 3,5 a 9,0 (Fujimoto, H., et. al., 1995) (Ito, K., et. al., 1992). Las endoxilanasas también difieren en su especificidad hacia el polímero de xilano. Algunas enzimas se cortan aleatoriamente entre residuos de xilosa no sustituidos, mientras que la actividad de otras endoxilanasas depende fuertemente de los sustituyentes en los residuos de xilosa que están cerca de los residuos atacados. En varios *Aspergillus*, se ha identificado tres endoxilanasas diferentes.

La mayoría de estas enzimas también se producen cuando se utiliza xilosa como única fuente de carbono, pero a niveles más bajos que en xilano. Varios genes que codifican endoxilanasas de *Aspergillus* han sido clonados. Las enzimas codificadas se han asignado a las familias de glicosidasas 10 y 11, y todas funcionan a través de un mecanismo de retención. Con base en los datos de las endoxilanasas de *A. kawachii*, parecería que las endoxilanasas ácidas pertenecen a la familia 11, mientras que las endoxilanasas neutras pertenecen al grupo 10. Sin embargo, se necesitan más datos sobre otras endoxilanasas neutras y ácidas para confirmar esto.

Las β -xilosidasas se han identificado en varios *Aspergillus*. Estas enzimas son altamente específicas para pequeños oligosacáridos de xilosa no sustituidos (grado de polimerización de hasta 4), y su acción da como resultado la producción de xilosa. Aunque esta actividad es de gran importancia para la degradación completa del xilano, la ausencia de las enzimas no interfiere con la inducción del sistema xilanolítico.

Con base en la secuencia de los genes correspondientes, las β -xilosidasas de *Aspergillus spp.* han sido asignadas a la familia de glicosidasa 3 y tienen un mecanismo de retención. Para algunas β -xilosidasas, se ha detectado actividad de transxilosilación, que permite la producción de nuevos oligosacáridos que contienen xilosa. También se

demonstró la producción de xilooligosacáridos a partir de la xilosa, usando β -xilosidasa en una reacción de condensación, lo que sugiere una posible aplicación de estas enzimas en la síntesis de oligosacáridos específicos.

5.11 Degradación de la cadena de pectina

Las diferencias estructurales entre la cadena principal de las regiones peludas y lisas de la pectina, tienen importancia en las enzimas que se involucran en la degradación de estas mismas regiones. La columna vertebral de la región lisa puede ser hidrolizada por pectinasas y poligalacturonasas. Para *Aspergillus*, se han identificado varias familias de genes que codifican estos tipos de enzimas (Harmsen, J., et. al., 1990) (Bussink, H.J.D., et. al., 1992). Otras clases de enzimas están involucradas en la degradación de la columna vertebral de la región peluda.

Las enzimas de degradación de la cadena principal de la pectina se pueden dividir en hidrolasas y liasas. Se han identificado en *Aspergillus*, seis tipos de hidrolasas.

Las pectinas, pectatos y ramnogalacturonas liasas, rompen la cadena principal de la pectina mediante la β -eliminación, lo que da como resultado la formación de un extremo no reductor 4,5-insaturado. Las pectinasas prefieren sustratos con un alto grado de metilesterificación, mientras que las pectato liasas prefieren aquellas con un bajo grado de esterificación. Se puede hacer una distinción más clara entre estos dos tipos de enzimas con base en el requerimiento absoluto de iones de Ca^{2+} para la catálisis, que disminuye de forma muy similar a la falta de ion de Ca^{2+} por las pectinas liasas.

Las liasas que trabajan en las regiones lisas (pectina y pectato liasas) y en las regiones peludas (ramnogalacturonas liasas) de pectina se han asignado a dos familias de glicosidasas diferentes, lo que indica

que las diferencias en la estructura de los sustratos también requieren una estructura enzimática diferente. A este respecto, las liasas son diferentes de las galacturonas hidrolasas que pertenecen a la misma familia de glicosidasas.

5.12 Aplicaciones industriales

Tabla 1. Ejemplos de enzimas de *Aspergillus* y sus aplicaciones en la industria de alimentos y bebidas. (Adaptada de Wösten et. Al., 2006).

Enzima	Fuente	Aplicaciones	Referencias
α-amilasa	<i>A. niger</i>	Preparación de jarabe de almidón y dextrosa; preparación de alcohol y cerveza.	(Wong y Robertson, 2003)
	<i>A. oryzae</i>		
Catalasa	<i>A. niger</i>	Preservación del color, textura, sabor y aroma en alimentos congelados.	(Diehl et. al., 1936)
Celulasa	<i>A. niger</i>	Panadería y pastelería; producción de vino y jugo; mejora de la digestibilidad.	(Tenkanen et. al. 2003)
	<i>A. aculeatus</i>		
Feruloil-esterasa	<i>A. niger</i>	Liberación del ácido ferúlico en la producción de vainilla.	Williamson, 1998
	<i>A. tubingensis</i>		
	<i>A. oryzae</i>		
Glucoamilasa	<i>A. niger</i>	Sacarificación de arroz y papa al vapor; preparación de jarabe de glucosa.	(Reilly, 2003)
	<i>A. oryzae</i>		
Glucosa oxidasa	<i>A. niger</i>	Remueve la glucosa residual u oxígeno para aumentar la vida de anaquel; estabilidad de sabor y color; reducción de porcentaje de alcohol en vino.	(Frederick et. al. 1990)
Lipasa	<i>A. niger</i>	Manufactura de queso, sabores a queso y otros productos lácteos.	(Wong, 2003)
	<i>A. oryzae</i>		
Fitasa	<i>A. niger</i>	Degradación de fitato en alimento animal; procesamiento de almidón.	Misset, 2003
	<i>A. oryzae</i>		

	<i>A. melleus</i>		
Proteasa	<i>A. niger</i>	Ablandamiento de la masa; mejora de la textura, elasticidad y volumen del pan; fabricación de cerveza; producción de miso y tofu; desarrollo de sabor en quesos; mejora de la digestibilidad: preparación de leche de soya y sopas deshidratadas; clarificación de vino.	(Whitaker, 2003)
Xilanasa	<i>A. niger</i>	Producción de aditivos alimentarios: mejora en la digestibilidad: preparación de productos de panadería; clarificación de jugos de frutas.	(Biely, 2003)

Las paredes celulares de las plantas son una parte importante de la biomasa bruta que se utiliza en una amplia variedad de procesos industriales. Un primer paso en el proceso industrial de biomasa frecuentemente implica la degradación parcial de la fracción polimérica. Por lo tanto, es obvio que las enzimas capaces de degradar la pared celular de la planta, se pueda aplicar en muchos de estos procesos y proporcionen una buena alternativa al proceso químico. Las aplicaciones de las enzimas xilanolíticas, se pueden encontrar en una gran variedad de procesos industriales. En la industria de la pulpa y el papel, las preparaciones de enzimas xilanolíticas libres de celulasa son de gran valor en el blanqueo de pulpas. La degradación enzimática de los complejos de hemicelulosa-lignina presentes en las pastas papeleras deja intactas las fibras de celulosa y reduce fuertemente la cantidad de productos químicos de blanqueo requeridos (hipoclorito).

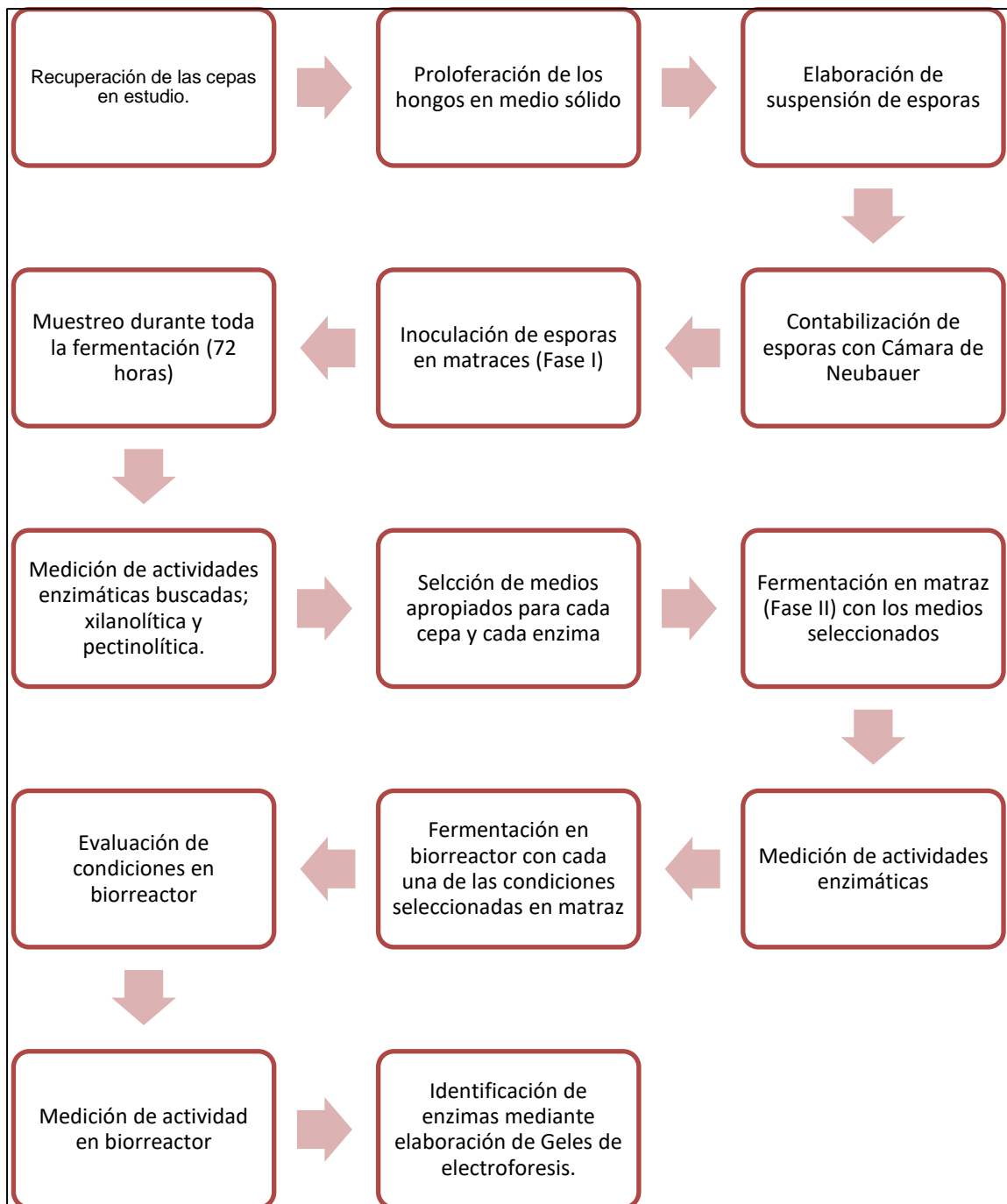
Esto no solo da como resultado una reducción en los costos de los productos químicos, sino que también reduce los problemas ambientales causados por el uso excesivo de cloro. La causa más importante por la que se utiliza en el blanqueamiento asistido por enzimas, es la endoxilanasa; aunque también se ha demostrado que la adición de otras

enzimas xilanolíticas es efectiva. Una segunda área en la que las preparaciones de enzimas xilanolíticas son ampliamente utilizadas, es en la industria de la panificación. En este contexto, su efecto principal es en la insolubilización de la fracción de hierro-oxinoxano, lo que da como resultado un aumento del volumen del pan y una mejor calidad de la masa. Otras aplicaciones en las que se usan enzimas xilanolíticas incluyen, aumentar la eficiencia de conversión alimenticia de la alimentación animal, clarificar los jugos y producir xilosa, xilobiosa y xilolómeros. Los oligosacáridos producidos se utilizan como aditivos alimentarios funcionales o edulcorantes alternativos con propiedades benéficas.

Las α -galactosidasas se utilizan para mejorar la capacidad gelificante de los galactomananos, que tienen aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. Además, reducen la concentración de rafinosa y otros oligosacáridos en la leche de soja, la harina de caupí y el jarabe de remolacha azucarera. Las pectinasas son de gran importancia en la industria de las bebidas debido a su capacidad para mejorar el prensado y la clarificación de los zumos de fruta concentrado (Grassin, C., and P. Fauquembergue. 1996). La pectina metilesterasa y otras enzimas pectinolíticas también se usan para la producción de puré de zanahoria. La eliminación de la corteza es el primer paso en todo el proceso de la madera y tradicionalmente es una etapa que consume mucha energía. Se puede obtener una reducción en la cantidad de energía requerida mediante el uso de enzimas pectinolíticas para ayudar en el proceso. Otras aplicaciones para las enzimas pectinolíticas incluyen aumentar el rendimiento de los aceites de cáscara de limón y la producción de oligouronidos. Los monosacáridos que son los componentes básicos del polímero de la pectina, tienen diferentes aplicaciones en alimentos y no alimentos, de ahí que la liberación enzimática de estos compuestos sea una herramienta importante en los procesos industriales. La arabinosa es un precursor de la L-fructosa y de la L-glucosa, que pueden utilizarse como edulcorante, y por otra parte se puede transformar en 5-deoxi-L-arabinosa, compuesto

que tiene propiedades anti-Parkinson. El ácido galacturónico se puede convertir de manera rápida en L-ácido ascórbico o se puede utilizar para producir agentes activos de superficie a través de esterificación con diversos ácidos grasos. Las transformaciones químicas de ramnosa dan como resultado aromas tales como "furaneol", que se utiliza como saborizantes en caramelos y frutas. Todas las aplicaciones industriales registradas hasta la fecha, utilizan las enzimas durante el procesamiento del material de la planta cruda. Recientemente, las modificaciones in vivo de los polisacáridos de la pared celular de la planta usando enzimas de *Aspergillus* han recibido un creciente interés. Se han obtenido plantas transgénicas que contiene el gen que codifica la endogalactanasa de *A. aculeatus*. El contenido de galactosilo del ramnogalacturonano I en estas plantas, se redujo en un 70%, lo que indica que existen aplicaciones potenciales de la introducción de genes de *Aspergillus* en plantas para modificaciones de polisacáridos in vivo.

6. METODOLOGÍA



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microorganismo

El trabajo se llevó a cabo utilizando dos cepas, *Aspergillus flavipes* FP-500 y *Aspergillus niger* FP-160. Ambos aislados de fruta en descomposición y forman parte del cepario del grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos, Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM. Fueron recuperados en agar papa dextrosa y realizando resiembras consecutivas para la preservación del hongo

7.2 Sustratos complejos

Para producir las enzimas se utilizaron residuos agroindustriales (sustratos complejos). El salvado de trigo fue adquirido en un comercio naturista. La cáscara de limón se obtuvo a partir de limones recién exprimidos, dicha cáscara fue lavada, deshidratada, triturada y tamizada. El lavado se realizó sumergiendo las cáscaras en etanol 70° durante 3 h. con agitación, luego se enjuagaron con etanol 96° y dejaron secar. El olote de maíz se obtuvo a partir de elotes que se desgranaron para su comercialización, éste se secó y trituró en un molino de martillos. La cáscara de plátano (*Musa balbisiana*) se obtuvo recolectándola de un comercio dedicado a la venta de frituras a base de plátano, la cáscara fue secada y posteriormente molida. Todos los sustratos fueron tamizados a través de una malla de 15-20 mm.

7.3 Reactivos

El agar dextrosa Sabouraud (dextrosa, peptona de carne y peptona de caseína) se obtuvo de BD Bioxon. La pectina cítrica (76 % ácido galacturónico, 8.6 % grupos metoxilo), xilano de abedul, alfa celulosa, xilosa, glucosa, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), reactivo 4,nitro-fenol- β -D-xilopiranosido, reactivo de Bradford, glicina, mercapto-etanol, tris-

(hidroximetil) amino-metano (TRIZMA-BASE), persulfato de amonio, TEMED y papel Whatman No. 4 (retención de partículas de 20-25 μm) de laboratorios SIGMA-ALDRICH. El Tween 80 de la compañía Aldrich Chemical. El fosfato de potasio mono y di básico, sulfato de amonio, metabisulfito de sodio, cloruro de sodio, tartrato de sodio, tartrato de potasio, fenol, metanol, hidróxido de sodio, ácido acético y ácido clorhídrico de J.T. Baker. La acrilamida, metileno-bis-acrilamida, azul de Coomassie R-250, SDS y el marcador PM (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) de los laboratorios BIO-RAD. El ácido D-galacturónico de FLUKA. El almidón soluble de PROLABO. Ácido fosfórico J.T. BAKER.

7.4 Cultivo del microorganismo

La recuperación de la cepa se realizó por medio de una siembra en agar Sabouraud comercial BDBioxon [®] (dextrosa, peptona de carne, peptona de caseína) a partir de las perlas de silica gel que contenían las esporas disecadas de cada una de las cepas. Se inocularon dos o tres perlas en cada caja Petri y se incubaron a 37^aC hasta que se percibiera crecimiento. Una vez con crecimiento se observó si presentaba las características macroscópicas de las cepas en uso; para ello se procedió a una resiembra por picadura para observar la morfología de una colonia. Una vez que se ha comprobado que es la cepa que se esperaba, se procede a resiembras sucesivas para la conservación del hongo y los trabajos necesarios, cada una a condiciones de incubación de 37^aC / 72 h. Las cepas se mantenían viables en refrigeración.

7.5 Obtención y conteo de la cosecha de las esporas

Las esporas (conidios) se extrajeron del hongo crecido en las placas de agar Sabouraud y suspendieron en 10 mL de solución salina isotónica (0.9 % p/v NaCl) con Tween 80 (0.005% v/v) estéril. Después de los lavados necesarios con solución salina isotónica se procede al conteo de

las esporas. La concentración de esporas en la suspensión final se calculó por el método de conteo directo con la cámara de Neubauer (American Optical, Inc. USA). Se inoculó una concentración final de 10^6 esporas de *Aspergillus flavipes* FP-500 y *Aspergillus niger* respectivamente por mililitro de medio de cultivo tanto en matraces como en el biorreactor.

7.6 Producción enzimática

Las enzimas se obtuvieron mediante fermentación sumergida empleando matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL de medio de cultivo. Los medios de cultivo líquido tuvieron la fuente de carbono suspendida en medio mínimo, cuatro desechos agroindustriales en prueba (cáscara de plátano, cáscara de limón, olote de maíz y salvado de trigo) y probando dos fuentes de nitrógeno, el pH fue ajustado con NaOH 1M. La esterilización de los medios se realizó a 121 °C y 15 psi por 20 min. La fermentación se realizó a 37 °C por 72 h. en una incubadora con agitación orbital constante a 200 rpm (Newbrunswick Sci.Co., USA).

7.7 Obtención del filtrado enzimático crudo

Tras la fermentación, el caldo de fermentación fue cosechado y centrifugado en tubos de 50 mL a 4500 rpm por 15 minutos para separar los sólidos y se filtra para obtener el caldo enzimático crudo traslúcido.

7.8 Cuantificación de azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores se cuantificó utilizando DNS con el azúcar correspondiente (glucosa, ácido D-galacturónico o xilosa) como referencia para la curva patrón utilizada en cada caso (Miller, 1959).

7.9 Ensayos para determinación de las actividades enzimáticas

Actividad exo-pectinolítica. Se determinó a partir de la cuantificación de azúcares reductores liberados por la actividad enzimática empleando una curva de ácido D-galacturónico como patrón. La mezcla de reacción constó de 0.5 mL de solución de pectina cítrica 1% p/v, 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM (pH 5.0) y 0.1 mL de filtrado enzimático. La reacción se inició adicionando 0.1 mL de filtrado extracelular a la mezcla, la cual se incubó durante 20 min. a 45 °C y al término se adicionaron 2 mL de reactivo DNS. Los tubos se colocaron en baño María a ebullición durante 5 min. y se añadió después 5 mL de agua destilada. Se centrifugaron las muestras a 500 rpm durante 5 min. y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 575 nm. Las lecturas de absorbancia fueron efectuadas empleando un espectrofotómetro UV-visible Cary 50. El blanco fue incubado sin muestra y al término de los 20 min. se añadió primero los 2 mL de DNS y después 0.1 mL de filtrado enzimático. La actividad se expresó en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima que produce un micromol de ácido D-galacturónico en las condiciones antes descritas (Martínez-Trujillo *et al.*, 2009).

Actividad xilanolítica. Se determinó por medio de la cuantificación de azúcares reductores empleando una curva patrón de xilosa, para ello se adicionó a un tubo de ensayo 0.5 mL de xilano de abedul (1% p/v), 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM (pH 5.0) y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células. Se incubó la mezcla de reacción en un baño a 50 °C durante 20 min. Al término se adicionó 1 mL de reactivo DNS y se calentó la mezcla a ebullición durante 5 min. Finalmente se añadió 5 mL de agua destilada, se agitaron las muestras en el vórtex a máxima velocidad y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 575 nm. En el caso de los blancos la mezcla de reacción fue incubada sin filtrado enzimático, el cual se añadió posterior al DNS. Se definió como una unidad de actividad xilanolítica (U) la cantidad de enzima necesaria para catalizar la

producción de un micromol de xilosa en las condiciones de ensayo dadas (Martínez-Trujillo *et al.*, 2009).

7.10 Determinación de proteína

Mediante el método de Bradford, se determinó cuantitativamente la proteína en microplaca, en cada pozo se agregó 100 μ L de muestra y 200 μ L de reactivo de Bradford, la placa se agitó y se leyó a una longitud de onda de 595 nm, la cantidad de proteína total se calculó con el uso de una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina. También se determinó la proteína a partir de las fracciones obtenidas en los cromatogramas realizados determinando la $Ab_{S_{280nm}}$ en el espectrofotómetro UV-visible Cary 50.

7.11 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE

La preparación de los geles de poliacrilamida (10%) de 8 x 8 cm con SDS se realizó en condiciones desnaturizantes. La electroforesis se corrió a amperaje constante (15 mA por gel) por espacio de aproximadamente 1.5 h. a través de una unidad de geles verticales de 1.0 mm (Mini-PROTEAN Tetra Cell de BIO-RAD). Después de ese tiempo, los geles se tiñeron en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.025%, metanol al 40% v/v y ácido acético al 7% v/v durante 1 h. y luego se destiñeron con ácido acético (10% v/v).

7.12 Zimogramas

Después de la electroforesis SDS-PAGE, el gel para zimograma se incubó en una solución amortiguadora de renaturalización (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5) a 37 °C por 1 h con un recambio a los 30 min.; luego se incubó a 37 °C durante 30 min. en una solución amortiguadora de acetatos 100 mM (pH 5.0); en seguida se sumergió en el sustrato

correspondiente (pectina cítrica o xilano de abedul) al 1% p/v en buffer de acetatos (pH 5.0) e incubó a 37 °C por 1 h. Después se enjuagó con agua destilada hasta eliminar el exceso de sustrato, se deshidrató con alcohol etílico (96°) a temperatura ambiente por 15 min. y finalmente se rehidrató con agua destilada por 20 min. Para los zimogramas pectinolíticos, el gel se tiñó con una solución de rojo de Rutenio (0.05% p/v) por 30 min. con agitación suave y destiño con agua destilada, mientras que para los zimogramas xilanolíticos, el gel se tiñó con una solución de rojo Congo (0.1% p/v) durante 30 min. con agitación suave y se destiño con una solución de NaCl 1M por 15 min., y posteriormente se acidificó con ácido acético (10% v/v). En los geles de zimogramas de actividad, los halos de degradación se distinguen en la imagen escaneada como zonas blancas, que en realidad son translúcidas, en las cuales al haber sido degradado el sustrato (pectina o xilano), el colorante no puede fijarse y por tanto al desteñir el gel se tornan incoloras, revelando que en ese punto se encuentra una pectinasa o xilanasas, según sea el caso.

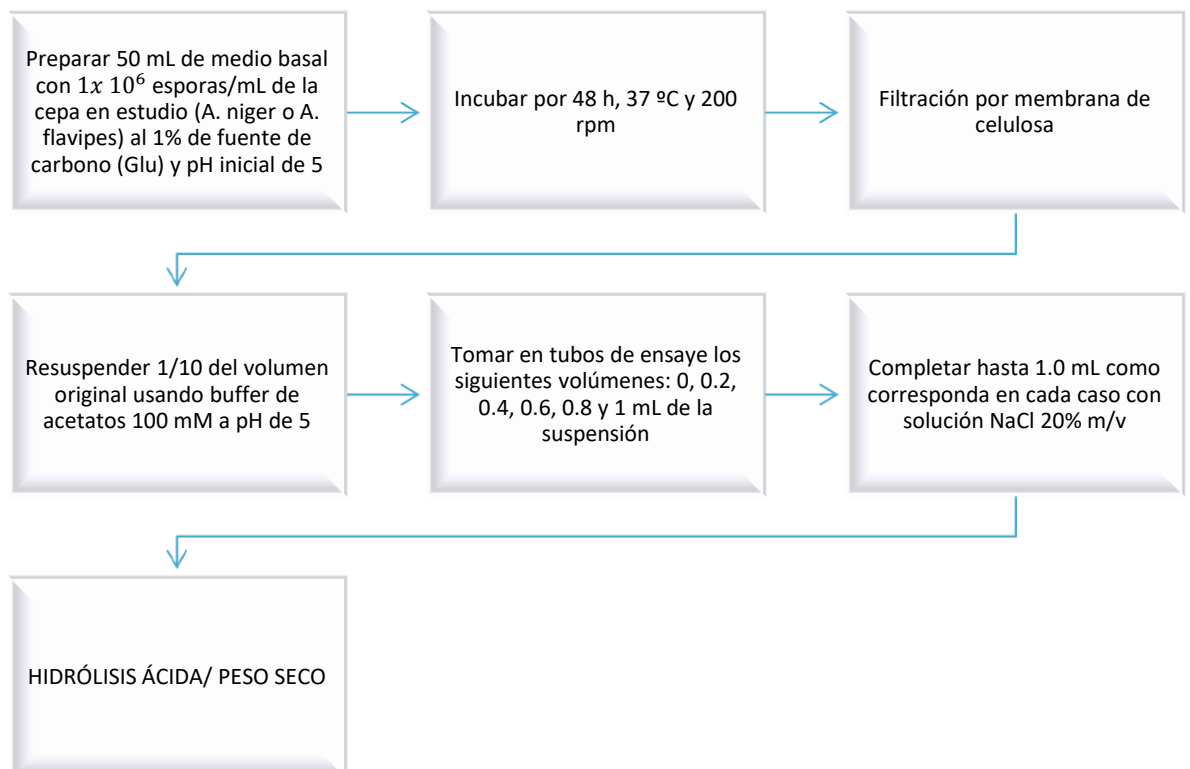
7.13 Determinación de biomasa

Al tratarse de un medio que contiene la fuente de carbono de un medio complejo no se ha medido la biomasa de la forma tradicional por filtrado y diferencia de peso, sino se optó por una hidrólisis ácida con ácido fosfórico. Para lo anterior se realizó un cultivo sumergido en matraz al 1% de glucosa como fuente de carbono a un pH de 5 y se deja incubar por 48 h, 37°C y 200 rpm; lo anterior con el fin de obtener un crecimiento óptimo de la cepa creando así pellets.

El crecimiento resultante de esta fermentación se filtra con ayuda de una membrana de celulosa y se resuspende en un volumen 1/10 del volumen original utilizando buffer de acetatos 100 mM pH 5. De esta suspensión se toman diluciones desde 0.0 mL hasta 1.0 mL por duplicado. A una serie se le determina peso seco y a la otra serie se le realiza una hidrólisis ácida mezclando partes iguales del filtrado y de

ácido fosfórico 1.5 M, hervir 20 min en baño maría. El sobrenadante contiene a la proteína extraída del hongo que se recupera centrifugando por 10 min. Se procede a la medición de proteína con el método de Bradford y se relaciona con una curva comparando con la serie de peso seco.

Al utilizar las fuentes de carbono con sustratos complejos como los desechos agroindustriales las técnicas clásicas de medición de la biomasa como es el peso seco, se vuelven inservibles, ya que es imposible filtrar el caldo de la fermentación sin tener falsos positivos grandes y obvios. Por lo anterior hemos utilizado una técnica diferente que correlaciona la proteína celular obtenida y el peso seco de ésta.



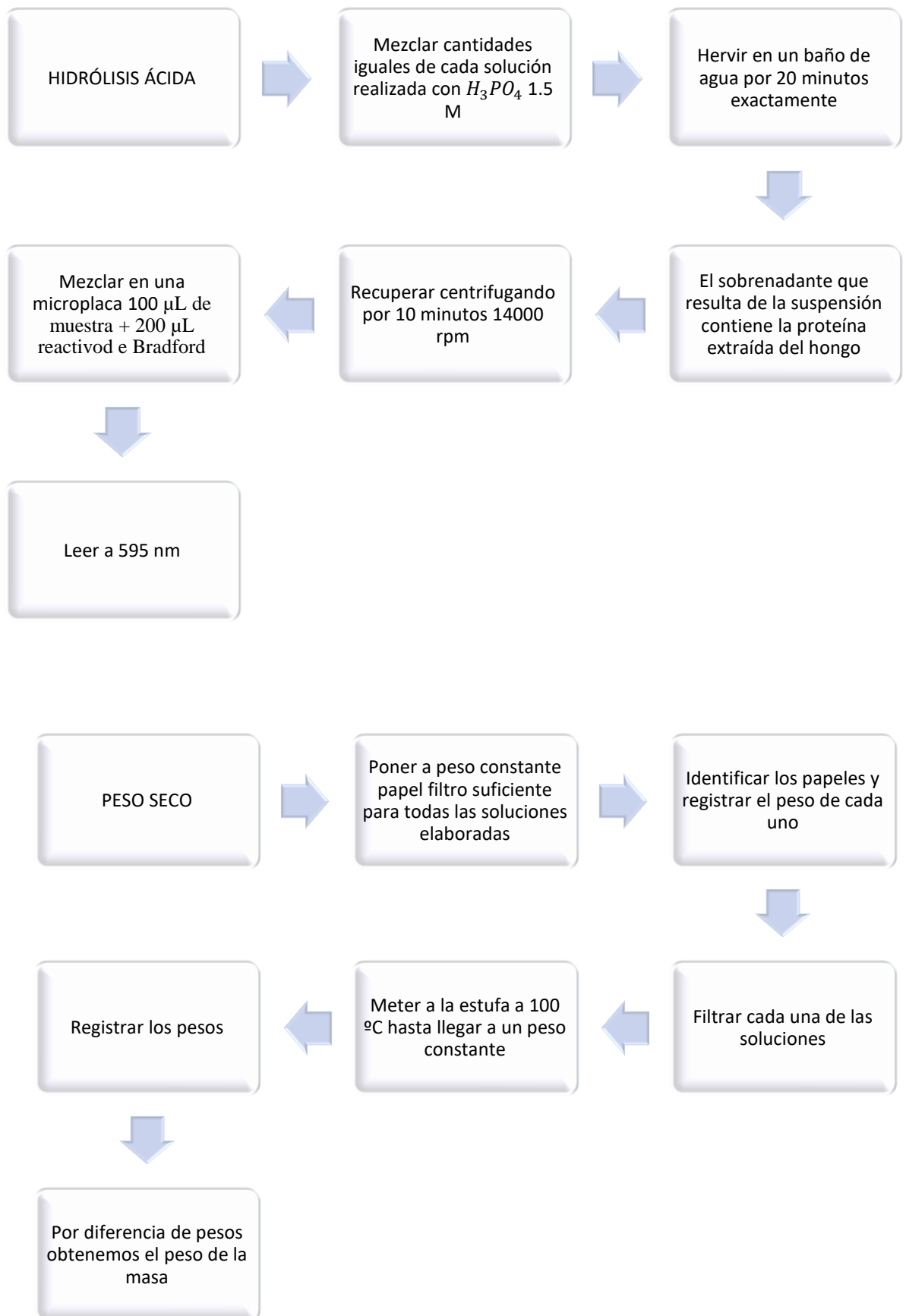


Figura 8. Esquema de procedimiento para la cuantificación de biomasa

Una vez realizadas las dos determinaciones para ambas cepas se correlacionan con una tendencia lineal. Con la ecuación de la recta se relacionan la absorbancia obtenida a 595 nm que es utilizada para determinar la proteína del hongo y el peso seco de la cepa a dicha concentración.

Por lo anterior se necesitan las ecuaciones de la recta de la curva patrón de cada una de las cepas:

- *Aspergillus flavipes*:
 $y = 0,957x + 0,0325$
 $x = (y - 0,0325) / 0,957$
- *Aspergillus niger*
 $y = 1,0902x - 0,4203$
 $x = (y + 0,4203) / 1,0902$

Donde en los valores de “y” sustituiremos los valores de la absorbancia al medir la proteína extraída con hidrolisis ácida a cada uno de los tiempos de todas las fermentaciones realizadas.

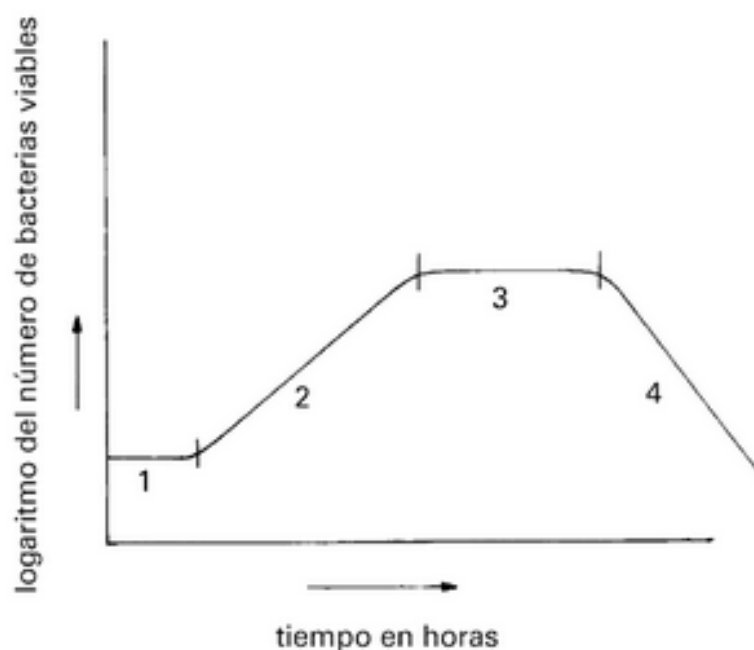


Figura 9. Curva de crecimiento bacteriano.

1. Fase de latencia en la que no hay aumento de población, las células sufren cambios en su composición química y aumentan de tamaño, aumento de sustancias intracelulares.
2. Fase logarítmica o exponencial en la que las células se duplican al mismo ritmo. Actividades metabólicas constantes, condición de crecimiento equilibrado.
3. Fase estacionaria en la que se van agotando los nutrientes y acumulando productos tóxicos, en la que algunas células mueren y otras crecen y se dividen. El número de células viables se mantiene constante o baja.
4. Fase de muerte o lisis en la que mueren más células que las que se producen. La tasa de muerte se acelera haciéndose exponencial. Todas las células mueren en cuestión de horas o días dependiendo de la especie.

8. Resultados y discusión

8.1 Producción de los filtrados enzimáticos

8.1.1 Selección de sustratos para la producción de enzimas a nivel matraz con *A. niger*: producción de xilanasas

La primera etapa se realizó a nivel matraz. En las Figuras 10-14 se muestran los resultados de la actividad enzimática obtenida con *Aspergillus niger* utilizando salvado de trigo, olote de maíz, cáscara de plátano o cáscara de limón como única fuente de carbono y el efecto de dos fuentes de nitrógeno inorgánicas.

Como se puede ver en la Figura 10, la producción de xilanasas se favorece cuando se utiliza el nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. La actividad xilanolítica obtenida con sulfato de sodio es casi la mitad respecto de la obtenida con nitrato.

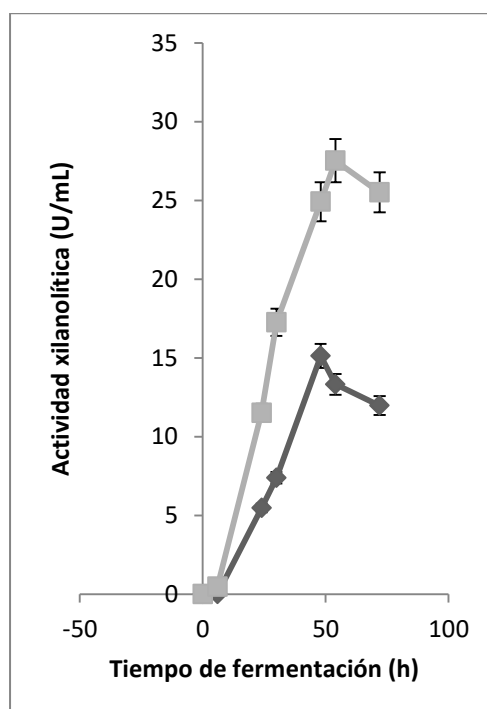


Figura 10. Producción de xilanasas con *A. niger*. salvado de trigo como fuente de carbono y sulfato de amonio y nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno. pH 5

Al igual que con salvado de trigo, con olote de maíz se obtiene una mayor actividad de xilanasas con nitrato de sodio como se muestra en la Figura 11; alcanzando una actividad similar en cuanto a cantidad obtenida con el salvado de trigo.

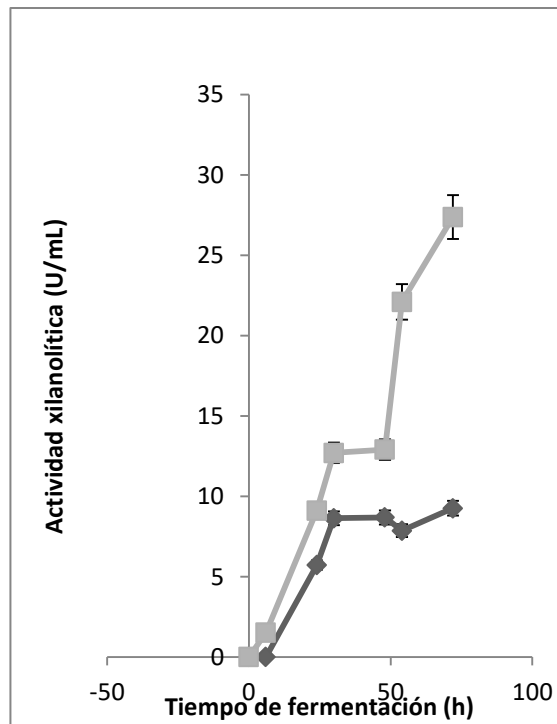


Figura 11. Producción de xilanasas con *A. niger*. olote de maíz como fuente de carbono y sulfato de amonio y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. pH 5

Por el contrario, en la Figura 12 al haber ensayado con cáscara de limón, la producción de xilanasas se ve favorecida con sulfato de amonio, aunque la diferencia respecto al nitrato de sodio no es estadísticamente representativa.

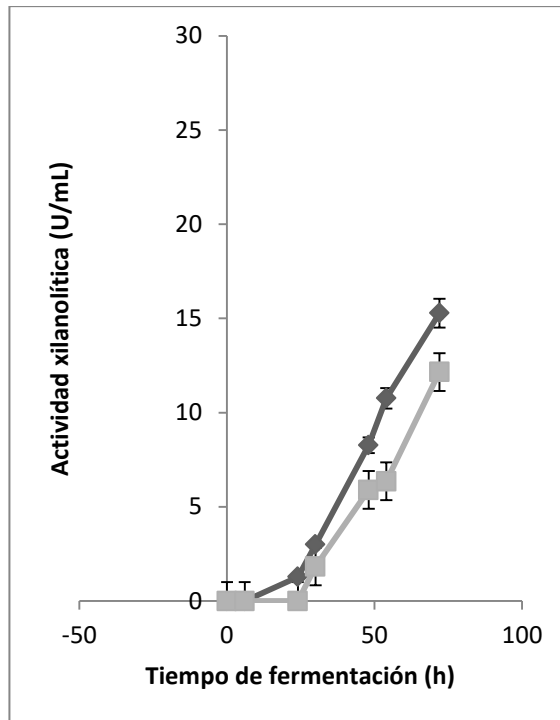




Figura 12. Producción de xilanasas con *A. niger*. cáscara de limón como fuente de carbono de amonio y  sulfato de amonio y  nitrato de sodio como fuente de carbono. pH 5

En la Figura 13 se presenta la actividad de enzimas xilanólíticas al haber ensayado con cáscara de plátano y se ve claramente que la fuente de nitrógeno no tiene un papel fundamental en esta producción ya que, no existe diferencia significativa entre ambos, es la fuente de carbono la que juega un papel fundamental y no es favorable con respecto a los otros desechos en prueba en dicha producción.

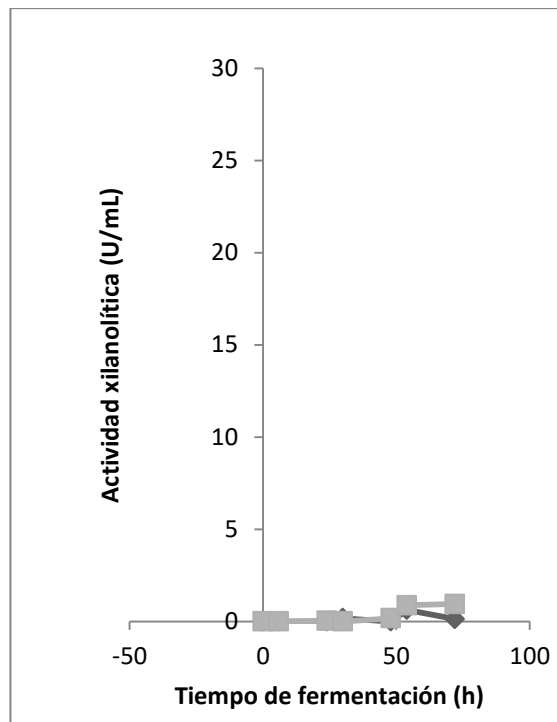
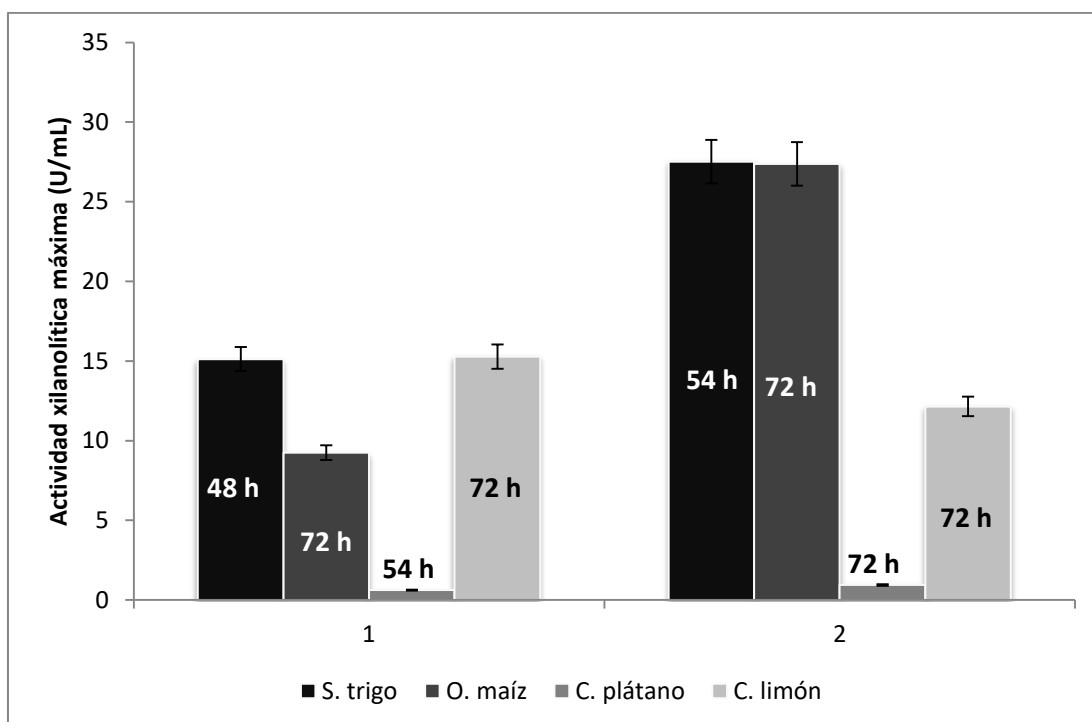


Figura 13. Producción de xilanasas con *A. niger*. cáscara de plátano como fuente de carbono y sulfato de amonio y nitrito de sodio como fuente de nitrógeno. pH 5

Son el olote de maíz y el salvado de trigo las fuentes con las que más se obtiene actividad enzimática teniendo valores de 27.38 U/mL y 27.52 U/mL como se puede observar con claridad en la figura 14. Aunque el salvado de trigo tiene una actividad ligeramente superior, la diferencia es mínima y tomando en cuenta la gran producción de maíz en nuestro país siendo uno de los diez mayores productores de dicho alimento a nivel mundial, se optó por utilizar el olote de maíz. Lo anterior se deduce ya que al ser un gran productor de este alimento, los desechos producidos son bastos en cantidad y por ende puede ser muy aprovechado en este sector de la investigación llevado a la industria. La abundancia y disponibilidad de este tipo de residuo, lo hace una opción viable para ser utilizado como sustrato para el crecimiento de diversos microorganismos y para la producción de enzimas de grado alimenticio. Por este motivo, el olote de maíz ha sido empleado como fuente de carbono para la producción de xilanasas tanto en fermentaciones sólidas como sumergidas por Camacho y Aguilar (2003), Da Silva *et al.* (2005), Dobrev *et al.* (2007), Achary y Prapulla (2008), Ahmad *et al.* (2012).



1: $(NH_4)_2SO_4$

2: $NaNO_3$

Figura 14. Producción de xilanasas con *A. niger*. Comparación actividades máximas.

Para la producción de enzimas xilanolíticas ponemos a prueba diversos factores para poder así decidir el medio óptimo para el escalamiento a nivel biorreactor, resultando que es el nitrato de sodio la fuente de nitrógeno con la que se observa más producción enzimática. Lo importante que debemos saber es que el nitrógeno sólo puede entrar a la célula como amonio. La asimilación se puede llevar a cabo por la glutamato deshidrogenasa o la glutamina sintetasa. Esto implica que cuando se usa nitrato, primero debe ser reducido por la nitrato reductasa, luego el nitrito resultante se reduce nuevamente por la nitrito reductasa a amonio. Dentro de la célula, se formará glutamato y glutamina. El glutamato se puede usar para transaminaciones y la glutamina para aminaciones normales, y así formar otros aminoácidos. Para los nucleótidos, hay algunos aminoácidos que son intermediarios, entonces de aquí mismo provienen.

El pH también fue monitoreado durante toda la fermentación teniendo variaciones normales con respecto a las fuentes de nitrógeno, ya que una de las fuentes es amonio y la otra un nitrato, relacionándose directamente con el trabajo que hace la célula para integrar el nitrógeno a su metabolismo, es decir, mientras en el amonio el nitrógeno entra directamente al metabolismo, todos los cationes liberados por la célula quedan libres en el medio. Mientras tanto en el caso del nitrato, hay una serie de reducciones necesarias para que la célula pueda aprovechar dicho nitrógeno y por lo que los cationes son necesarios y no quede libres acidificando el medio.

8.1.2 Selección de sustratos para la producción de enzimas a nivel matraz con *A. niger*: producción de pectinasas

Se observa que no existe diferencia significativa entre las dos fuentes de nitrógeno en la producción de enzimas pécticas con salvado de trigo (Figura 15). Lo único detectable es que en el caso del nitrato de sodio la producción se atrasó, es decir, el pico de actividad máxima se da en las últimas horas de la fermentación.

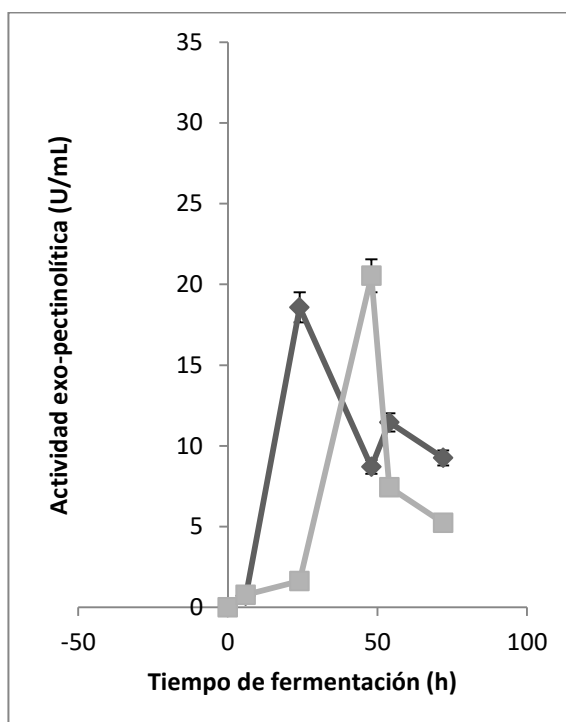


Figura 15. Producción de exo-pectinasas con *A. niger*. salvado de trigo como fuente de carbono, sulfato de amonio y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. pH 5

En cambio en el caso de olote de maíz (Figura 16), se ve la diferencia clara, donde la producción con el sulfato de amonio es superior a la de nitrato de sodio

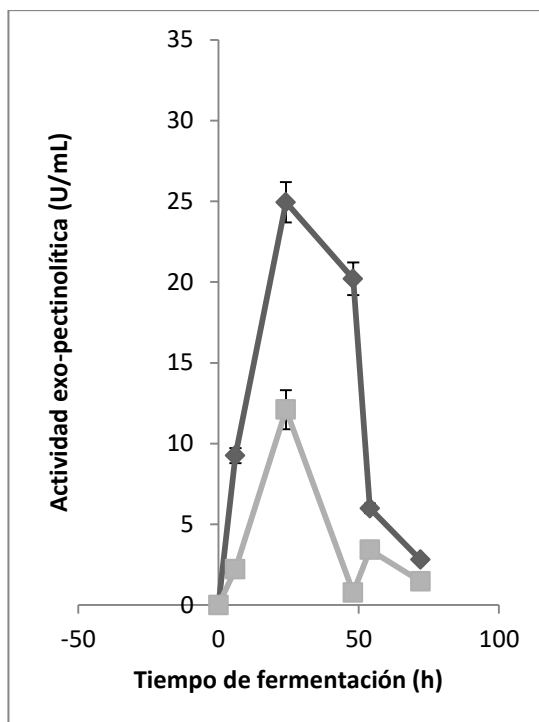


Figura 16. Producción de exo-pectinasas con *A. niger*, olote de maíz como fuente de carbono

◆ sulfato de amonio y ■ nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. pH 5.

Del mismo modo, se observa que la producción con sulfato de amonio es muy superior al de nitrato de sodio, alrededor de 6 veces mayor (Figura17).

Aunque con menor diferencia, lo mismo ocurre con la cáscara de plátano (Figura 18). El sulfato de amonio tiene mayor producción que el nitrato de sodio, aunque con poca diferencia.

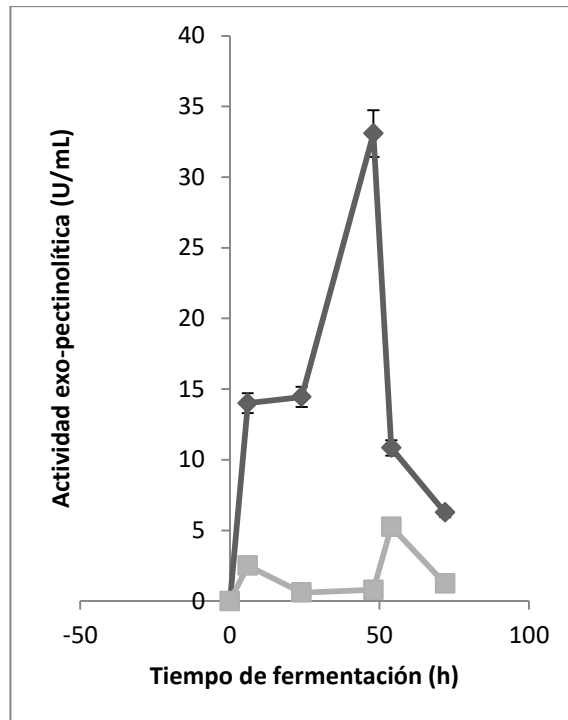


Figura 17. Producción de exo-pectinasas con *A. niger*, cáscara de limón como fuente de carbono —◆— sulfato de amonio y —■— nitrato de sodio como fuente de carbono. pH 5.

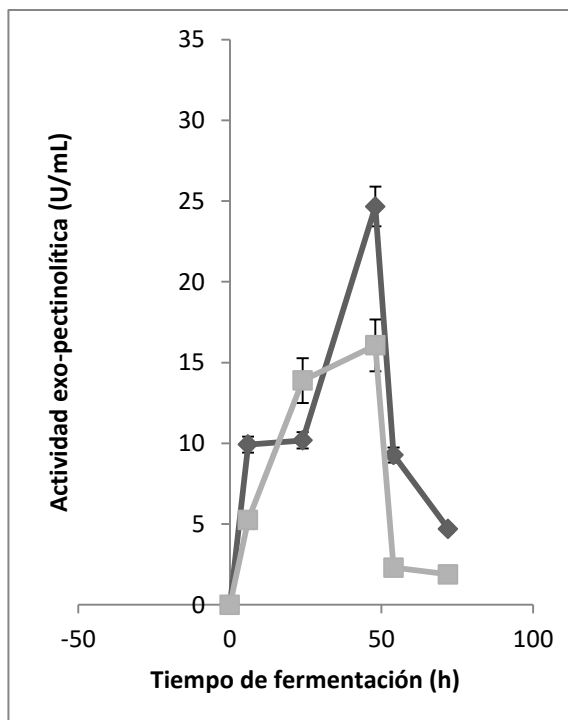
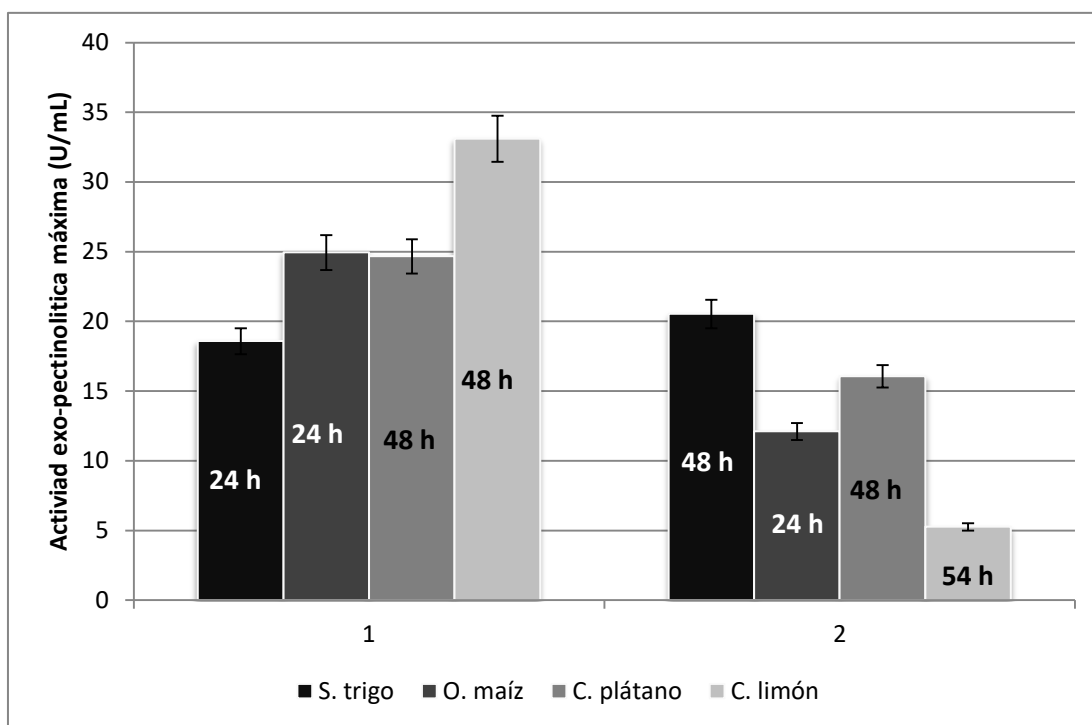


Figura 18. Producción de exo-pectinasas con *A. niger*, cáscara de plátano como fuente de carbono —◆— sulfato de amonio y —■— nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno. pH 5.



1: $(NH_4)_2SO_4$ 2: $NaNO_3$
 Figura 19. Producción de exo-pectinasas con *A. niger*. Comparación actividad máxima

La cáscara de limón tiene la mejor producción de enzimas pectinolíticas teniendo 33.09 U/mL (Figura 19). En cuanto a la fuente de nitrógeno se observa que la mejor fuente es el sulfato de amonio, ya que en todos los casos la producción de enzimas es superior. Aunque hay buena producción de la enzima se compara con la producción obtenida con la otra cepa en estudio *A. flavipes*, cuyos resultados se muestran a continuación.

8.1.3 Selección de sustratos para la producción de enzimas a nivel matraz con *A. flavipes*: producción de xilanasas

Para la producción de xilanasas con *A. flavipes* se observa (Figura 20) que de no ser por la reducción en las últimas horas de la fermentación en la producción con nitrato de sodio, en el resto serian prácticamente iguales. No obstante debido a esta reducción se considera al amonio con una producción ligeramente mayor.

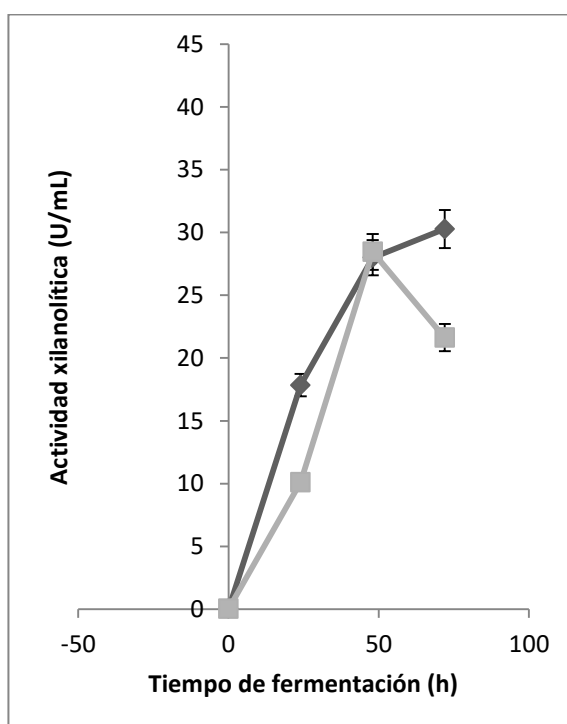


Figura 20. Producción de xilanasas con *A. flavipes*. Salvado de trigo como fuente de carbono
—◆— sulfato de amonio y —■— nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. pH 5

Asimismo no existe diferencia significativa entre las dos fuentes de nitrógeno. Durante toda la cinética de producción los valores fueron muy similares (Figura 21). Para el caso de la cáscara de limón la producción es ligeramente mayor con el sulfato de amonio, ya que al igual que con el salvado de trigo el descenso de la cinética con nitrato de sodio se da antes que con el sulfato de amonio (Figura 22).

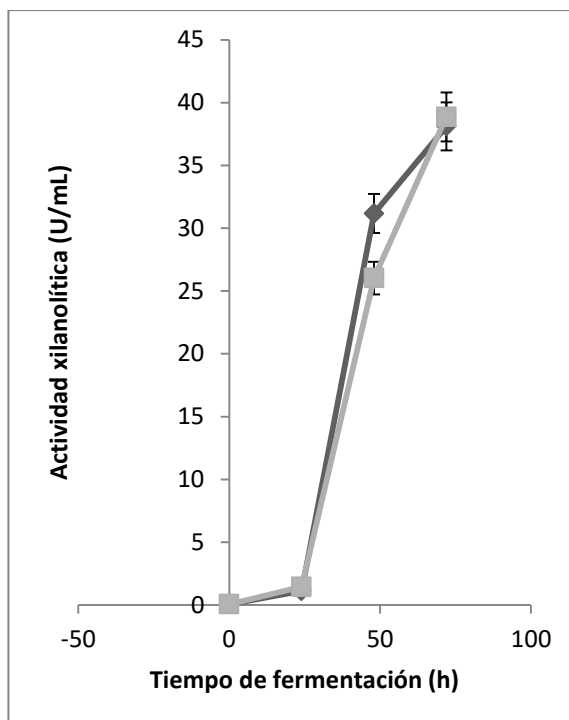


Figura 21. Producción de xilanasas con *A. flavipes*, olote de maíz como fuente de carbono

◆ sulfato de amonio y ■ nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno. pH 5.

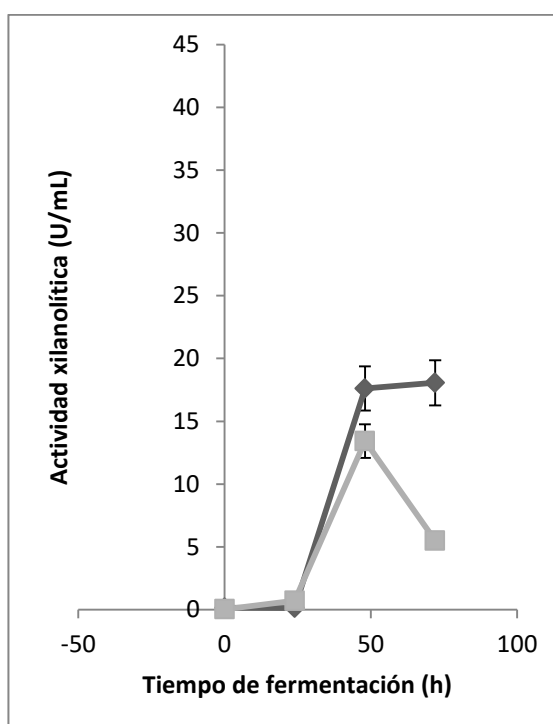


Figura 22. Producción de xilanasas con *A. flavipes*, cáscara de limón como fuente de carbono

◆ sulfato de amonio y ■ nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

También se observa que, aunque en general la producción de xilanasas con cáscara de plátano no es mucha, el nitrato de sodio presenta los mejores resultados (Figura 23).

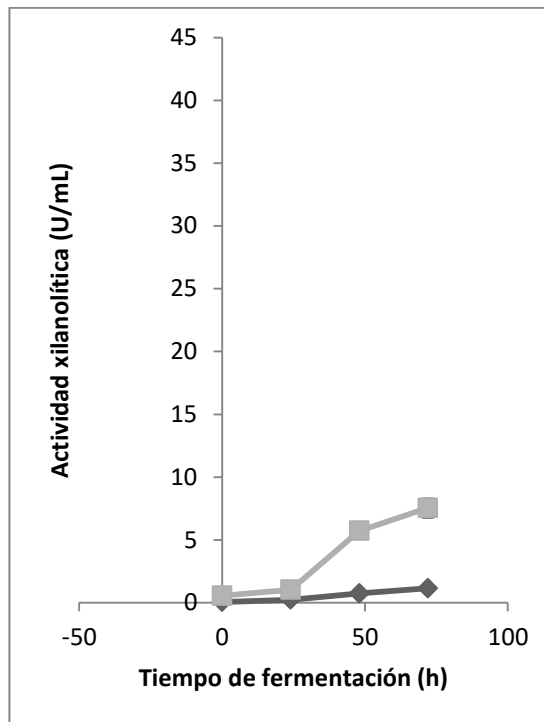
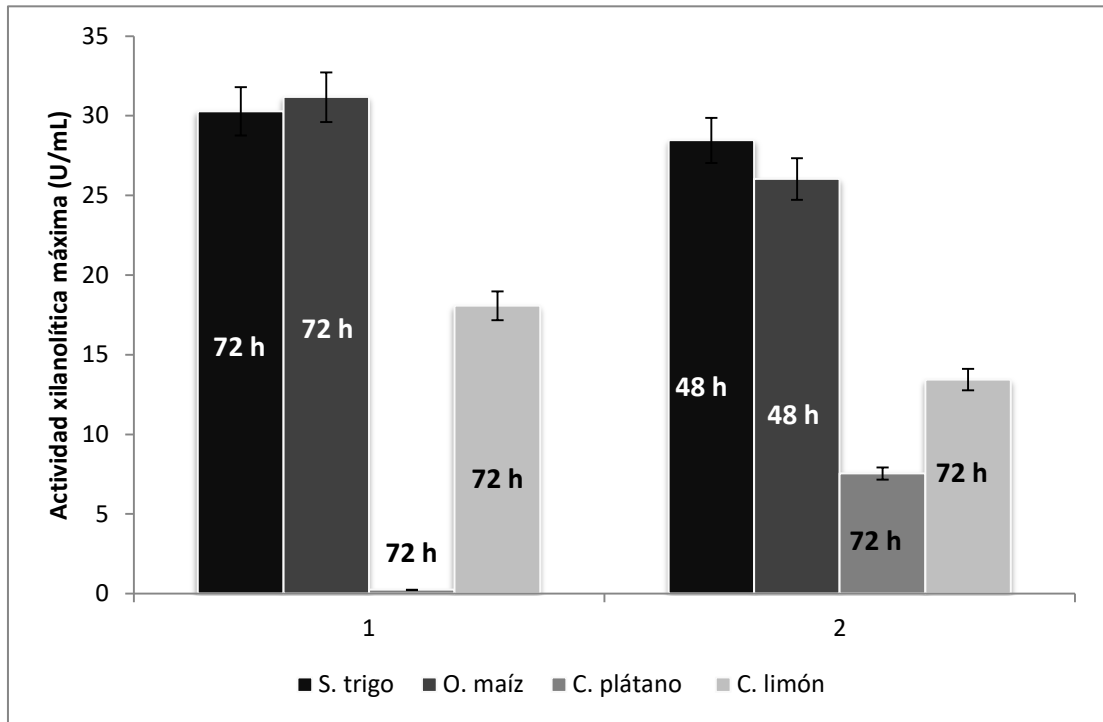


Figura 23. Producción de xilanasas con *A. flavipes*, cáscara de plátano como fuente de carbono —◆— sulfato de amonio y —■— nitrato de sodio como fuente de carbono.

Analizando la producción xilanólítica de *A. flavipes* tenemos una producción ligeramente inferior en comparación con la cepa *A. niger*, habiendo obtenido actividades alrededor de 26 U/mL con los mejores sustratos que fueron salvado de trigo y olote de maíz, mientras que para los sustratos cáscara de limón y cáscara de plátano la actividad obtenida fue muy por debajo de la actividad registrada (Figura 24). En cuanto a la fuente de nitrógeno no se encuentra diferencia significativa entre las dos fuentes de nitrógeno probadas en este trabajo, ya que con ambas se obtuvieron actividades prácticamente iguales.



1: $(NH_4)_2SO_4$

2: $NaNO_3$

Figura 24. Producción de xilanasas con *A. flavipes*. Comparación actividades máximas.

Con el objeto de realizar el escalamiento a nivel biorreactor, los resultados de las mediciones de las enzimas exo-pectinolíticas para establecer la mejor cepa y óptimas condiciones, fueron las siguientes.

8.1.4 Selección de sustratos para la producción de enzimas a nivel matraz con *A. flavipes*: producción de pectinasas

Con la actividad pectinolítica con el salvado de trigo (Figura 25), el nitrato de sodio presenta una cinética favorable, teniendo mayor producción enzimática.

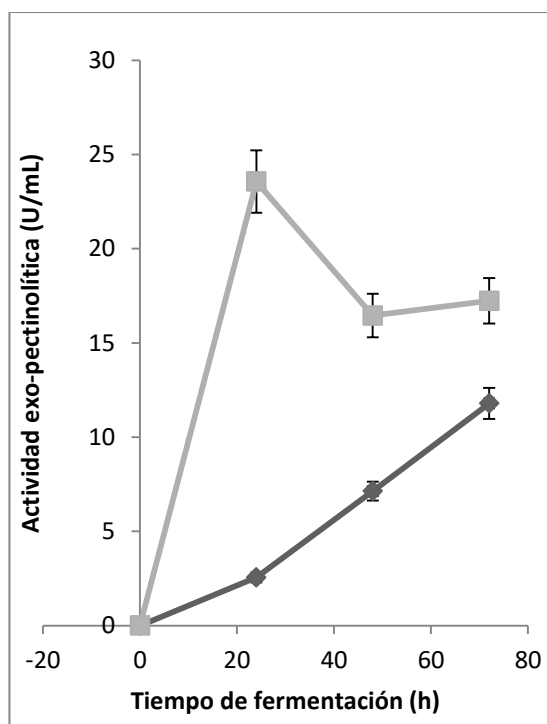


Figura 25. Producción de exo-pectinasas con *A. flavipes*, salvado de trigo como fuente de carbono —◆— sulfato de amonio y —■— nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. pH 5

Para el olote de maíz (Figura 26) la cinética entre ambas fuentes de nitrógeno varía ligeramente, aunque las actividades máximas son parecidas. Para el caso de la cáscara de limón (Figura 27), el sulfato de amonio es notablemente mayor con respecto al nitrato de sodio desde las primeras horas de la fermentación. En cambio con el nitrato de sodio la producción aumenta en las últimas horas de la fermentación aunque no alcanza los niveles que alcanza el sulfato de amonio.

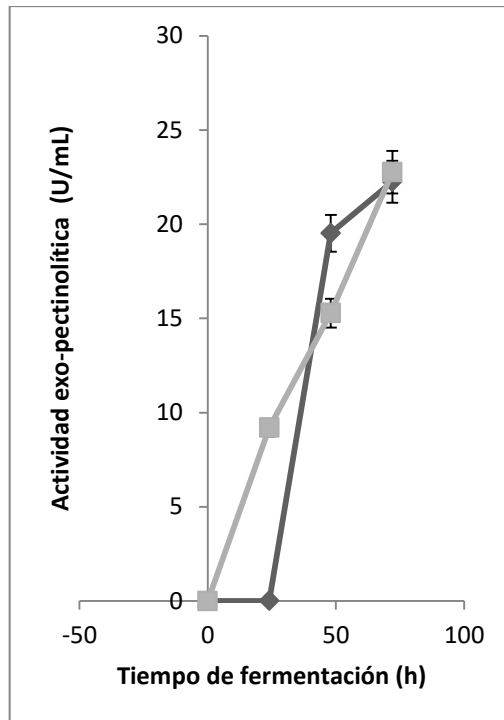




Figura 26. Producción de exo-pectinasas con *A. flavipes*, olote de maíz como fuente de carbono y  sulfato de amonio y  nitrito de sodio como fuente de nitrógeno. pH 5.

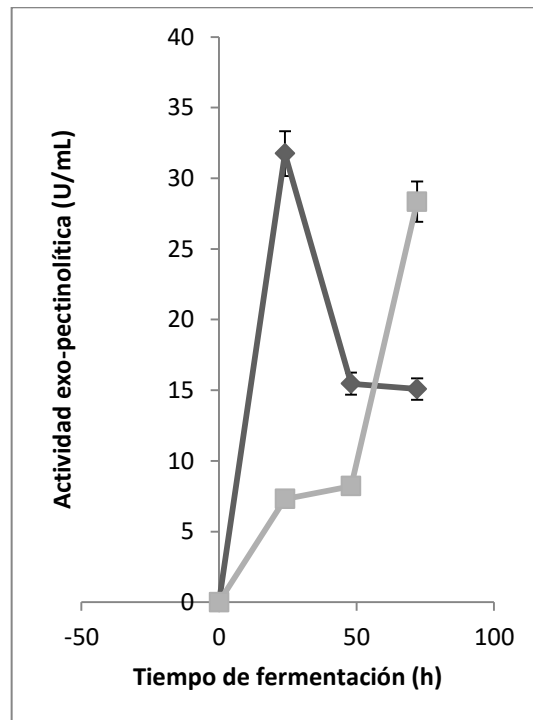




Figura 27. Producción de exo-pectinasas con *A. flavipes*, cáscara de limón como fuente de carbono,  sulfato de amonio y  nitrito de sodio como fuente de carbono. pH 5.

En el caso de la cáscara de plátano desde las primeras horas de la fermentación, el sulfato de amonio presenta los niveles más altos de producción (Figura 28).

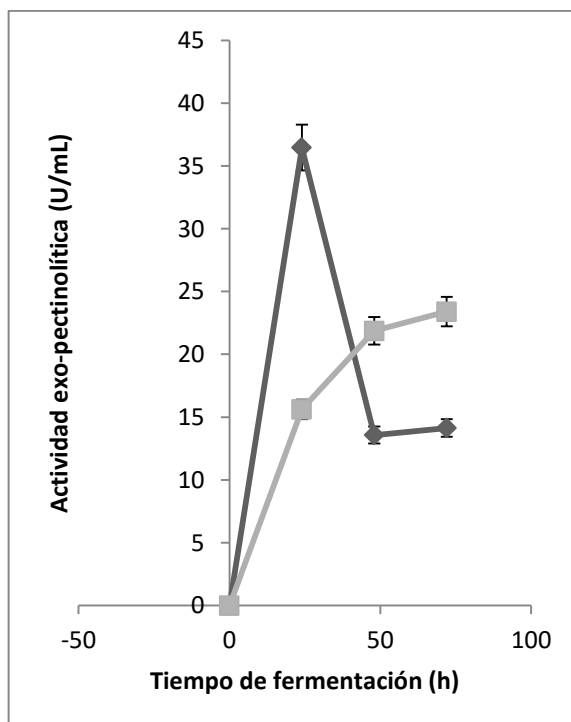




Figura 28. Producción de exo-pectinasas con *A. flavipes*, cáscara de plátano como fuente de carbono,  sulfato de amonio y  nitrate de sodio como fuente de nitrógeno. pH 5

En la (Figura 27) observamos que el sulfato de amonio presenta los mejores resultados en cuanto a producción enzimática y las dos fuentes de carbono con mejores resultados son la cáscara de plátano y cáscara de limón, ambas en las primeras horas de fermentación, teniendo la máxima en las 24 h.

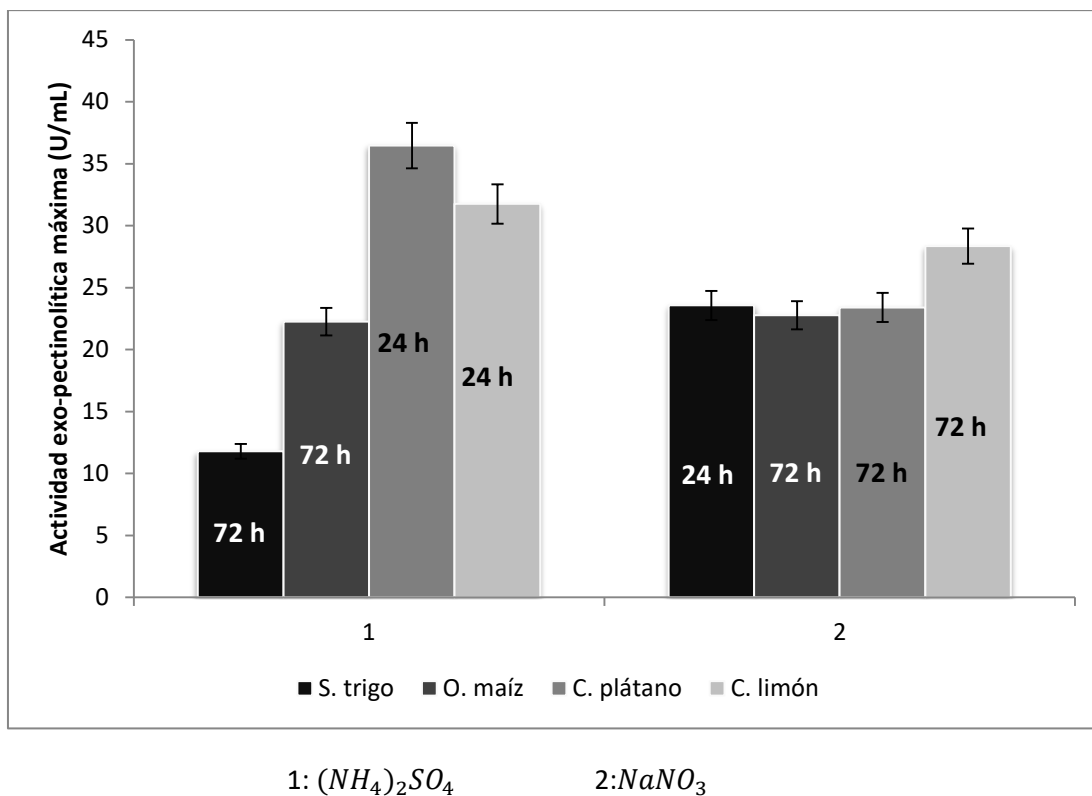


Figura 29. Producción de exo-pectinasas con *A. flavipes*. Comparación actividades máximas.

Tomando en cuenta la comparación entre todas las condiciones con las fuentes de carbono, nitrógeno y las dos cepas en estudio podemos definir las siguientes mejores condiciones posibles para escalar a nivel biorreactor.

Tabla 2. Condiciones óptimas en la primera fase de fermentación

Cepa	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Enzima
<i>A. niger</i>	Olote de maíz	Nitrato de sodio	Xilanasa
<i>A. niger</i>	Salvado de trigo	Nitrato de sodio	Xilanasa
<i>A. flavipes</i>	Cáscara de plátano	Sulfato de amonio	Exo-pectinasa
<i>A. flavipes</i>	Cáscara de limón	Sulfato de amonio	Exo-pectinasa

8.1.5 Segunda fase a nivel matraz; selección de sustratos

En la segunda fase experimental se prueban las combinaciones a nivel matraz de medio de carbono con medio de nitrógeno que mejores resultados arrojan en la primera fase con ambas cepas de estudio:

- **I AN:** *Aspergillus niger* / Olote de maíz / $NaNO_3$
- **II AN:** *Aspergillus niger* / Cáscara de plátano/ $(NH_4)_2SO_4$
- **III AN:** *Aspergillus niger* / Cáscara de limón / $(NH_4)_2SO_4$
- **I AF:** *Aspergillus flavipes* / Olote de maíz / $NaNO_3$
- **II AF:** *Aspergillus flavipes* / Cáscara de plátano/ $(NH_4)_2SO_4$
- **III AF:** *Aspergillus flavipes* / Cáscara de limón / $(NH_4)_2SO_4$

Los resultados serán la base para iniciar la fermentación nivel biorreactor.

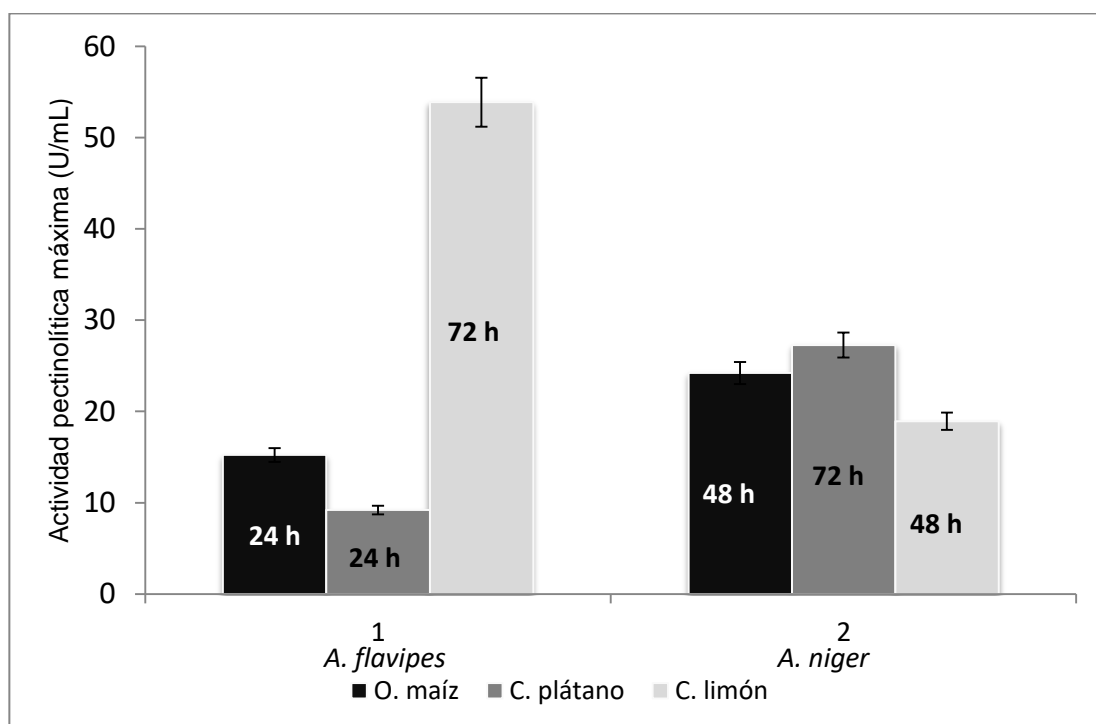


Figura 30. Actividad pectinolítica máxima. Segunda fase

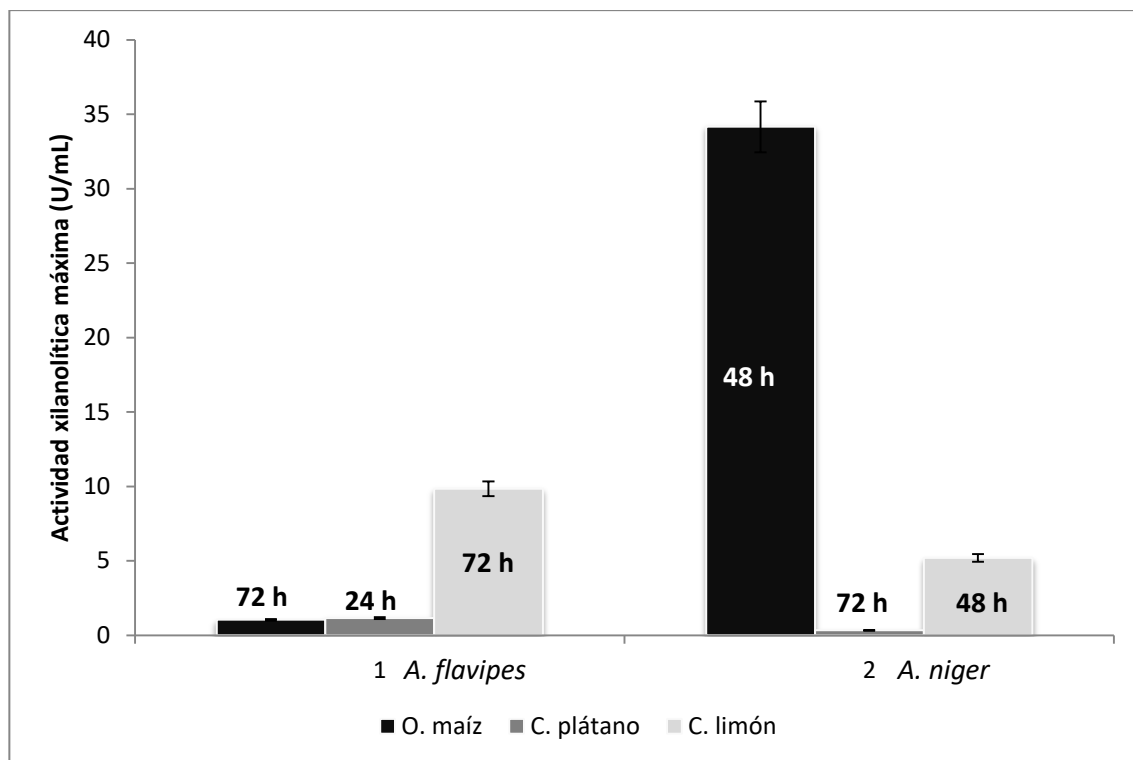


Figura 31. Actividad xilanolítica máxima. Segunda fase

Como lo muestran las figuras 30 y 31 tenemos como resultado final que la cepa que produce en mayor cantidad las enzimas pectinolíticas es *A. flavipes* obteniendo 53.88 U pectinolítica/mL superando con una ventaja clara a las otras condiciones e inclusive a la otra cepa. Como era de esperarse se obtienen resultados muy favorables con el uso de cáscara de limón como única fuente de carbono utilizada por la alta cantidad de pectina que contiene. Un punto más a favor de dichos resultados es que somos el segundo productor a nivel internacional de este cítrico según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). La fuente de nitrógeno utilizada en este medio fue el sulfato de amonio.

Por otro lado, obtenemos que la mejor cepa y condiciones para la producción de enzimas xilanolíticas es *A. niger* y claramente se muestran las fuentes de carbono y nitrógeno óptimas para dicha producción como el olote de maíz y el nitrato de sodio. El olote de maíz está compuesto en base seca por celulosa (45 %), hemicelulosa (35 %) y lignina (15 %), de

los cuales la hemicelulosa se compone mayoritariamente por xilano de olote (28-35 % base seca) uno de los heteroxilanos complejos que contiene residuos de xilosa con enlaces β -1,4 (Saha y Bothast, 1999). Estas características le confieren al olote la posibilidad de ser empleado como sustrato en la producción de la enzima xilanasa.

Ahora bien, esta ha sido una fase de selección de condiciones nutricionales para las fermentaciones y la producción óptima y mayor de cada una de las enzimas en estudio, no obstante existen algunas otras condiciones que no podíamos tomar en cuenta en nivel matraz y que se probaron en el biorreactor como lo son; la agitación y aireación, medidos en rpm y vvm respectivamente.

8.2 Selección de condiciones de fermentación a nivel biorreactor

Se prueban las condiciones de aireación y agitación más comunes y con las que se han tenido experimentaciones anteriores con hongos en estudios parecidos y sus posibles combinaciones para cada una de nuestras fermentaciones. Las condiciones son 200 rpm y 400 rpm como agitación y 1 vvm y $\frac{1}{2}$ vvm para la aireación, es decir, tomando en cuenta que tenemos dos cepas en estudio, se ponen en estudio ocho condiciones de biorreactor.

Cada una de las fermentaciones tiene una duración total de 96 horas, tomando muestras a diversos tiempos durante el transcurso del experimento y así se monitorea la producción enzimática. Todas las fermentaciones se mantienen a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ con ayuda de un flujo de agua a través del sistema de equipo mantenido a la temperatura deseada. Además, fue necesario en cada fermentación añadir 500 μL de antiespumante concentrado, ya que al ser un sustrato complejo tiende a crear exceso de espuma que podría traer problemas a

la fermentación ocasionando que la presión aumente y se escape del sistema o en el peor de los casos, explote.

Al igual que en el nivel matraz, en el biorreactor se busca inocular un millón de esporas por mililitro. Se mantiene el pH inicial de 5 para el caso de las xilanasas y para la búsqueda de la producción de pectinasas el pH inicial será de 3, debido a que se ha observado anteriormente que las pectinasas se inducen mejor a pH's bajos aproximándose al 3.

Todas las condiciones probadas en biorreactor se enlistan en la Tabla 3, combinando condiciones de aireación y agitación. Cada una de estas condiciones mencionadas se hizo por duplicado y se realizó la medida de las enzimas correspondientes. Para determinar las mejores condiciones para la mayor producción de enzimas, como lo marca el propósito de este trabajo, se compara cada una de las condiciones en la figura 32 y 33.

Tabla 3. Condiciones probadas a nivel biorreactor

Condición de fermentación	Aireación	Agitación
<i>Aspergillus niger</i> / Olote de maíz / $NaNO_3$	1 vvm	200 rpm
<i>Aspergillus niger</i> / Olote de maíz / $NaNO_3$	1 vvm	400 rpm
<i>Aspergillus niger</i> / Olote de maíz / $NaNO_3$	½ vvm	200 rpm
<i>Aspergillus niger</i> / Olote de maíz / $NaNO_3$	½ vvm	400 rpm
<i>Aspergillus flavipes</i> / Cáscara de limón / $(NH_4)_2SO_4$	1 vvm	200 rpm
<i>Aspergillus flavipes</i> / Cáscara de limón / $(NH_4)_2SO_4$	1 vvm	400 rpm
<i>Aspergillus flavipes</i> / Cáscara de limón / $(NH_4)_2SO_4$	½ vvm	200 rpm
<i>Aspergillus flavipes</i> / Cáscara de limón / $(NH_4)_2SO_4$	½ vvm	400 rpm

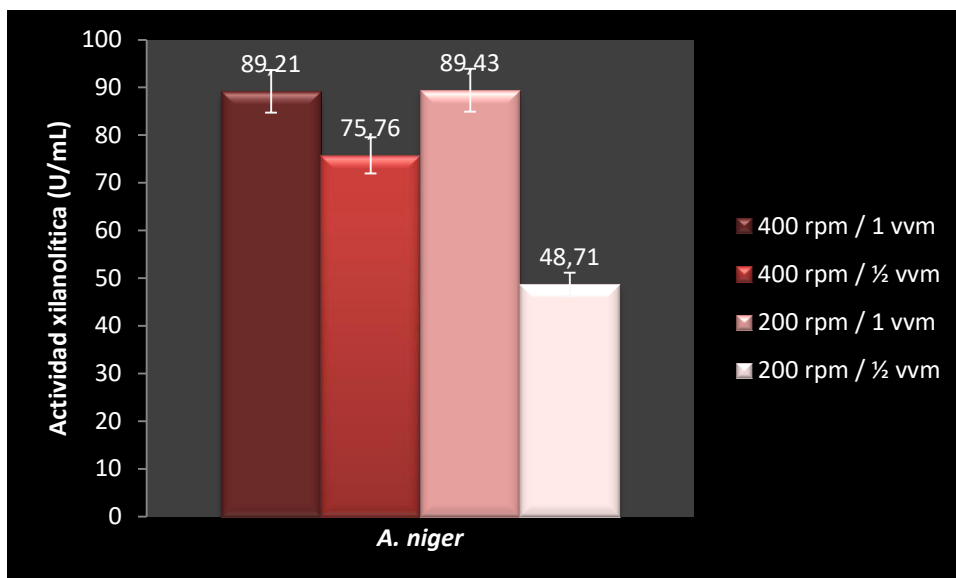


Figura 32. Comparación de la actividad xilanolítica máxima con *A. niger*, olote de maíz, nitrato de sodio y variando la aireación y agitación. pH 5

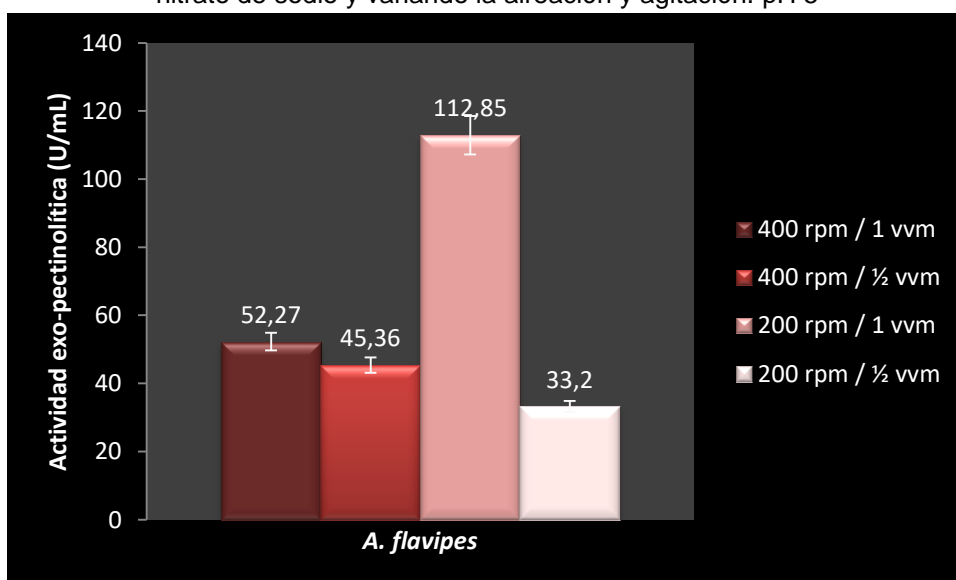


Figura 33. Comparación de la actividad exo-pectinolítica máxima con *A. flavipes*, cáscara de limón y sulfato de amonio variando la aireación y agitación. pH 3.5

Las condiciones de aireación y agitación con mejores resultados de producción de enzimas, tanto pectinolíticas como xilanolíticas, fue de 1 vvm y 200 rpm (Figura 32 y Figura 33).

Se esperaba que la agitación de 400 rpm diera mejores resultados basándonos en estudios previos, no obstante, al tratar con sustratos complejos, la agitación de 200 rpm se ve favorecida ya que al no estar la fuente de carbono disuelta en el medio, el hongo puede adherirse más

fácilmente al sustrato y así poder degradar la fuente de carbono que son; la pectina y el xilano respectivamente.

En las figuras 34 y 35 se muestran las cinéticas de producción enzimática durante toda la fermentación con las condiciones que dieron los mejores resultados a nivel biorreactor. Con estas curvas podremos correlacionar los puntos de mayor producción enzimática con los de mayor producción de biomasa que se muestran más adelante.

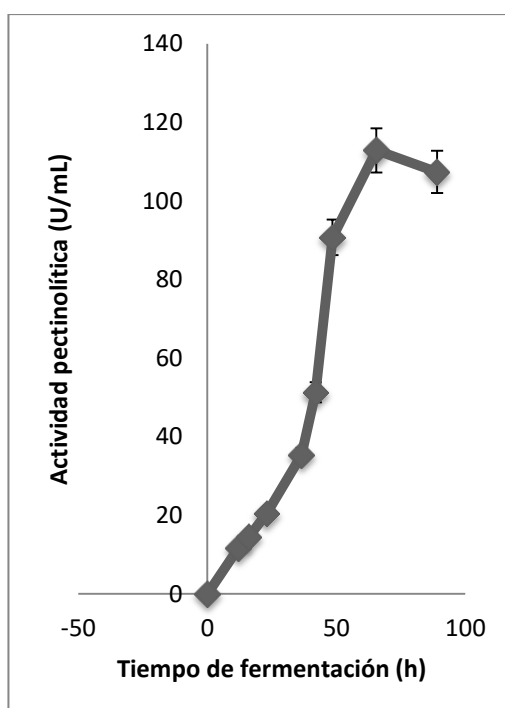


Figura 34. Cinética de producción de pectinasas con *Aspergillus flavipes*, con las condiciones de cáscara de limón, sulfato de amonio, 200 rpm, 1 vvm. pH 5.

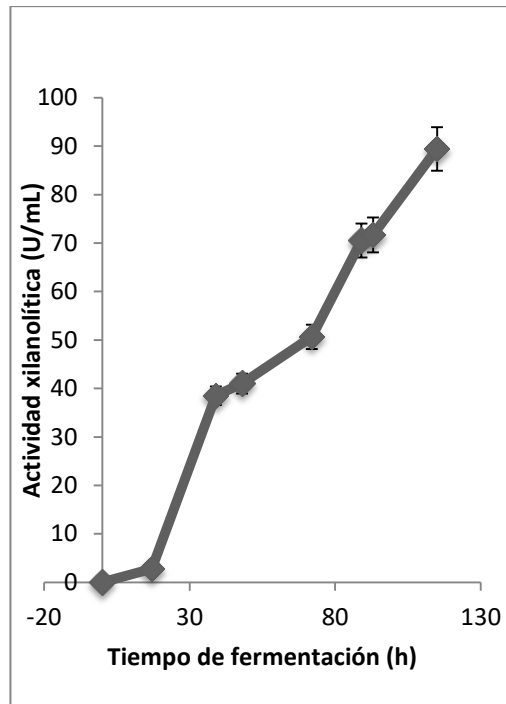


Figura 35. Cinética de producción de xilanasas con *Aspergillus niger*, con las condiciones de olote de maíz, nitrato de sodio, 200 rpm, 1 vvm. pH 3.5

Dado que dos importantes parámetros implicados en la producción de diferentes perfiles enzimáticos son el pH y la concentración de la fuente de carbono (Aguilar y Huitrón, 1991, Galiotou-Panayotou *et al.*, 1997), también el pH fue monitoreado durante todo el tiempo de cada una de las fermentaciones teniendo siempre la misma tendencia en cada uno de los casos vistos con la variación de la fuente de nitrógeno, es decir, el comportamiento del pH se ve directamente afectado por la variación de nitrato o amonio por lo que hemos explicado anteriormente, relacionado a cómo se metaboliza el nitrógeno en cada caso. Recordando las condiciones en cada caso, es en la producción de pectinasas cuando se utiliza sulfato de amonio y por ello el pH se reduce gradualmente, mientras que en la producción de xilanasas se utiliza nitrato de sodio y el pH aumenta muy poco y se mantiene durante la fermentación.

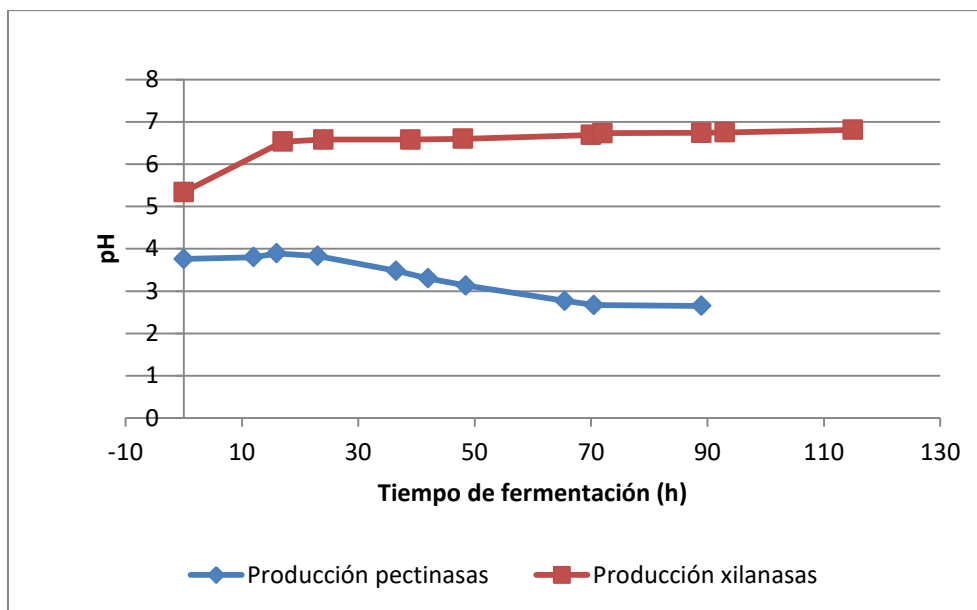


Figura 36. Cambio del pH a lo largo de la fermentación para la producción de xilanasas con *A. niger* y pectinasas con *A. flavipes*.

8.3 Medición de Biomasa por hidrólisis ácida.

Con las pruebas a nivel biorreactor, hemos demostrado la alta capacidad por estas especies del reino fúngico, para la producción de enzimas de alto valor en la industria de alimentos, no obstante es importante probar el rendimiento de la fermentación. Para ello realizaremos la medición de la biomasa.

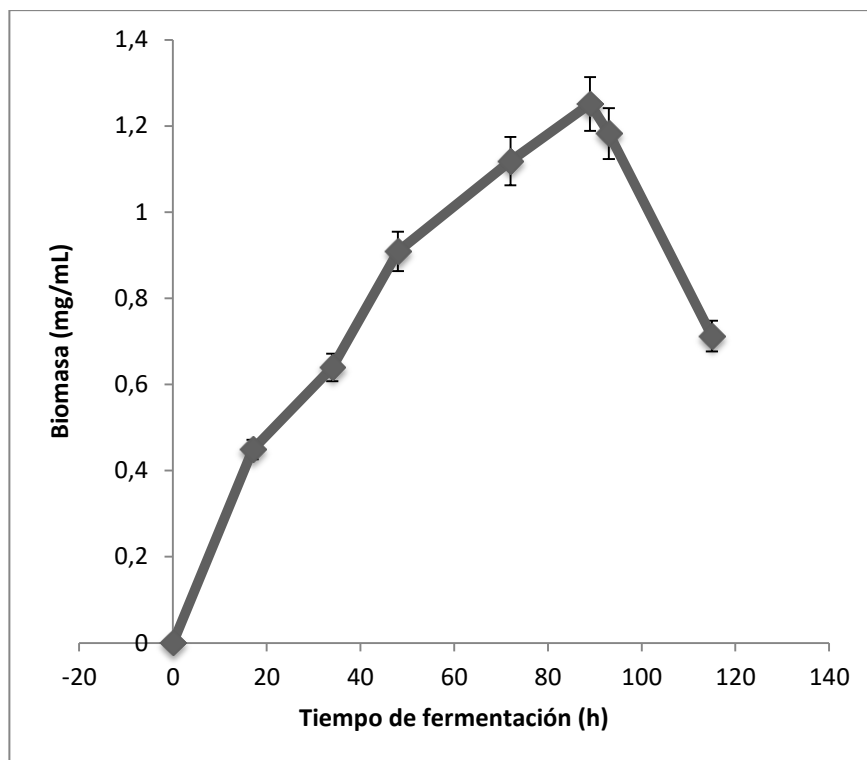


Figura 37. Curva de crecimiento de *Aspergillus niger*, con las condiciones de Olate de maíz, Nitrato de sodio, 200 rpm, 1 vvm.

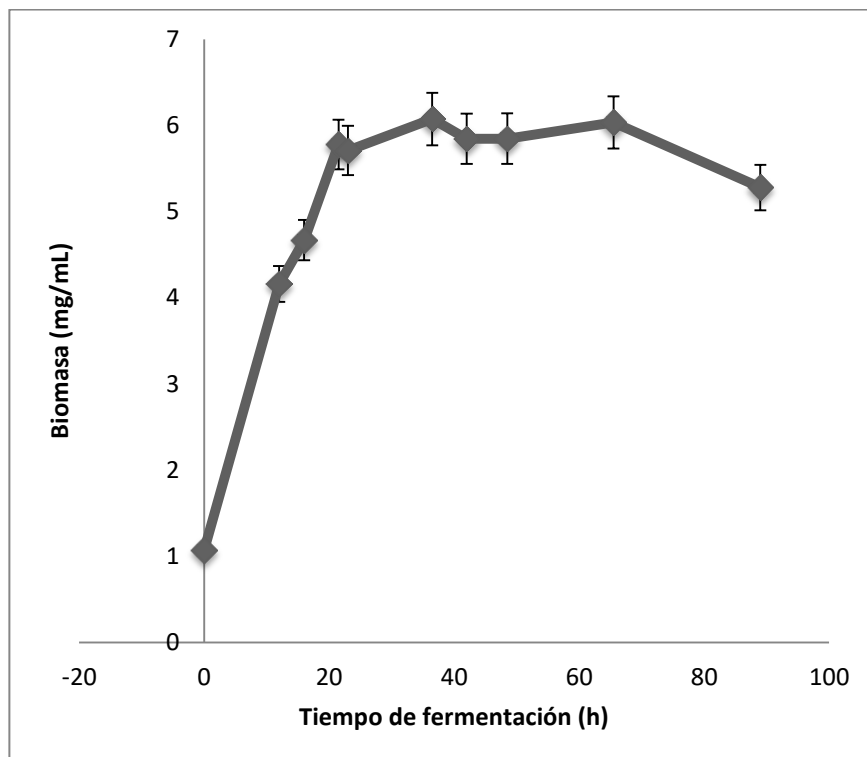


Figura 38. Curva de crecimiento de *Aspergillus flavipes*, con las condiciones de cáscara de limón, Sulfato de amonio, 200 rpm, 1 vvm.

En las figuras 37 y 38 se muestran las curvas de crecimiento para ambas cepas con las mejores condiciones de crecimiento para cada una de ellas, y de este modo, contar con la correlación del crecimiento de la biomasa y la producción enzimática correspondiente. Las tendencias de crecimiento de ambas cepas siguen el modelo básico. Debemos tomar en cuenta que la velocidad de metabolización de la fuente de carbono es de suma importancia, según Stanbury y Whitaker (1987) la velocidad con la que se metaboliza la fuente de carbono puede influir en la formación de biomasa y la producción de metabolitos primarios y secundarios. Si hay azúcares fácilmente metabolizables se da un rápido crecimiento de los microorganismos, pero hay una baja productividad de metabolitos secundarios; por lo anterior, es que la única fuente de carbono programada para este trabajo es la obtenida de los sustratos complejos sugeridos anteriormente.

En las figuras 34 y 35 tenemos la producción pectinolítica y xilanolítica correspondiente a las curvas de crecimiento de biomasa mostradas. En el caso de la producción de enzimas pectinolíticas se aprecia que en el punto donde se produce más actividad es uno de los puntos máximos de biomasa producida, lo que suele sonar normal, ya que a mayor cantidad de células producidas es mayor la cantidad de proteína que se produce. En el caso de la producción de las enzimas xilanolíticas la mayor producción de enzima se da en el mayor tiempo de la fermentación, aunque en ese punto la biomasa ha iniciado ya a descender o ha iniciado su etapa de lisis; una explicación a esto es que aunque hay menor cantidad de células viables, éstas siguen produciendo las enzimas necesarias para poder degradar el sustrato que queda en el medio para sobrevivir antes de que se agote.

8.4 Concentración de los filtrados enzimáticos

En la industria alimenticia comúnmente se utilizan los filtrados enzimáticos concentrados, es decir, la industria solicita el filtrado concentrado y se utiliza de este modo a conveniencia de cada uno de los usos de éstos, diluyéndolos conforme se necesite. La concentración de los filtrados se puede llevar a cabo de diferentes modos, aunque la ultrafiltración ha sido de las técnicas más utilizadas. En este proceso se corre el riesgo de que se pierda parte del filtrado y por ende la actividad disminuya.

Por lo anterior, en el desarrollo del proyecto se procede a concentrar cada uno de los filtrados enzimáticos por medio de la ultrafiltración con ayuda de una membrana de 10 kDa y se midió la actividad a cada uno para determinar si ésta disminuye o se ve alterada de alguna forma.

Cada uno de los filtrados, tanto el filtrado de xilanasas (FX) como el filtrado de pectinasas (FP) se concentraron 10 veces. Posteriormente de los concentrados de xilanasas (CX) y concentrados de pectinasas (CP) se tomó una alícuota para resuspenderlos y ser llevados de nuevo a la concentración inicial. Se le mide la actividad xilanolítica y pectinolítica a cada filtrado correspondiente, tanto al filtrado directo como al concentrado ya resuspendido. Con esto, podremos determinar si aún con el proceso de concentración, nuestros filtrados obtenidos siguen teniendo la misma eficacia.

En la figura 39 se aprecian las actividades de las enzimas antes y después del proceso de ultrafiltración.

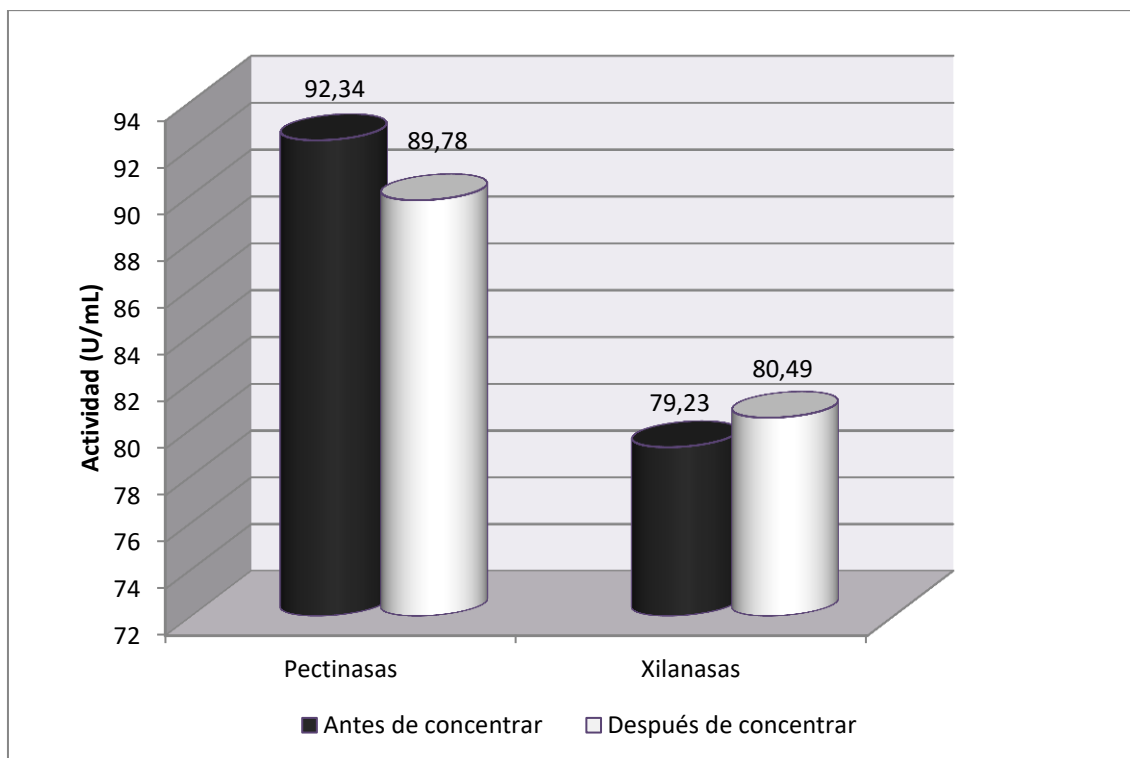


Figura 39. Comparación de las actividades de cada filtrado enzimático medidos antes y después de concentrar las muestras.

En el caso de las pectinasas la actividad medida con el CP resuspendido disminuye en casi 3 unidades, lo cual es benéfico ya que se mantiene con una alta actividad detectable, favorable para el ya que sigue siendo de gran utilidad para la industria alimenticia. La disminución de la actividad fué en cierto punto predecible por toda la manipulación que sufre el FP, sin embargo, como ya se mencionó, no es significativa la pérdida y el filtrado sigue manteniendo su alto valor.

Por otro lado, en el caso de las xilanasas, la actividad medida aumentó en una unidad aproximadamente, lo cual es aún mejor que el caso anterior, ya que nos indica que la pérdida de enzima fue aún menor. No debe existir la confusión de que hay más enzima o que hemos producido más de ésta, simplemente la medición de la actividad, aunque sea del mismo filtrado, puede variar porque la enzima no siempre degradará exactamente la misma cantidad del sustrato. Con lo anterior deducimos que la cantidad de enzimas es muy parecido o prácticamente

el mismo y por eso la lectura de la medición de la actividad xilanolítica es muy parecida al FX.

Con base en los datos obtenidos anteriormente, ambos filtrados, tanto FX como el FP, son altamente recomendados para el uso en la industria, ya que aún con el proceso de concentración por medio de la ultrafiltración, se recupera la mayor parte de las enzimas y la actividad sigue siendo de alto valor.

8.5 Identificación de enzimas

Para la identificación de las enzimas correspondientes se realizaron geles de electroforesis y sus correspondientes zimogramas; cada uno con sus condiciones especiales.

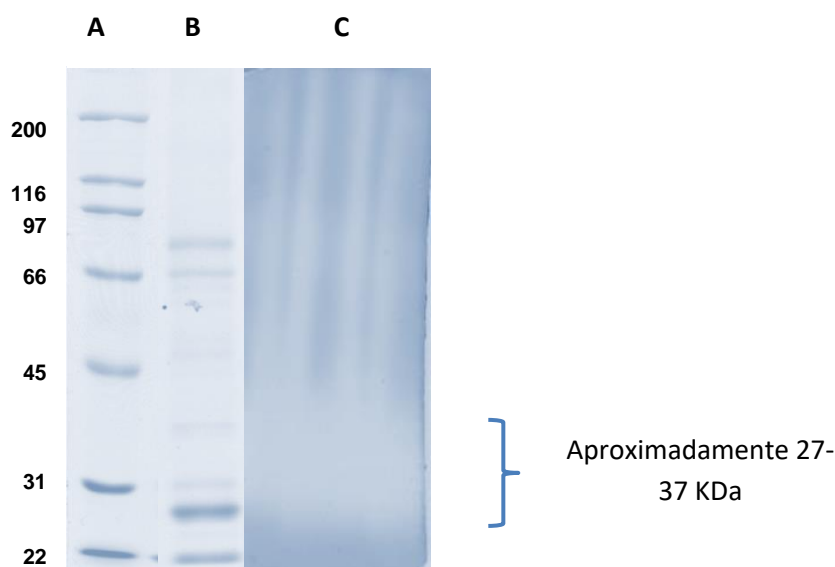


Figura 40. Perfil electroforético y zimográfico de xilanasas con gel SDS-PAGE al 10%.

A) Marcador molecular B) Gel electroforético de xilanasas C) Zimograma xilanasas

A B C

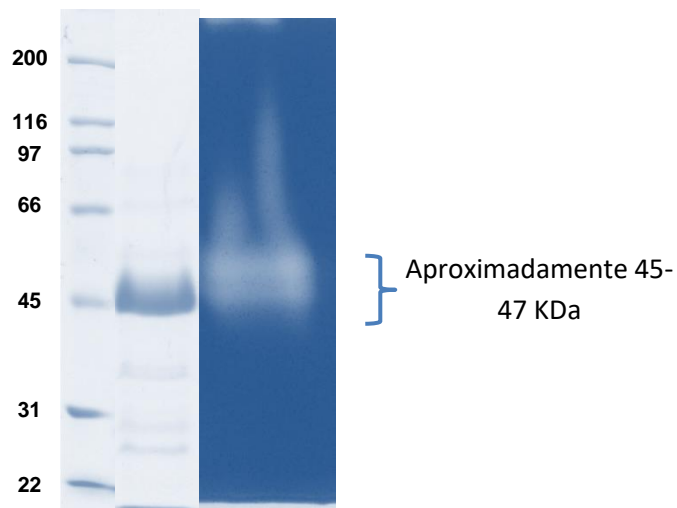


Figura 41. Perfil electroforético y zimográfico de pectinasas con gel SDS-PAGE al 10%.
 A) Marcador molecular B) Gel electroforético de pectinasas C) Zimograma pectinasas.

En las figuras 40 y 41 podemos encontrar los geles SDS-PAGE de ambas enzimas, con el fin demostrativo únicamente que la xilanasa estudiada pesa alrededor de 28 KDa ya que coinciden el perfil electroforético y el zimográfico. Lo mismo ocurre con la pectinasa y ésta pesa aproximadamente 45 KDa.

9. Conclusiones

- Cada una de las cepas en estudio resultó ser efectiva para la producción de una de las enzimas buscada; *Aspergillus niger* para la producción de las xilanasas y *Aspergillus flavipes* para la producción de pectinasas.
- De los cuatros sustratos complejos estudiados, que fueron probados para ambas cepas para ambas enzimas, resultó que la cáscara de limón fue el sustrato con la mejor producción de pectinasas y el olote de maíz el mejor sustrato para la producción de xilanasas.
- Además de los sustratos para la determinación de la mejor fuente de carbono, también se sometieron a estudio dos diferentes fuentes de nitrógeno para cada una de las posibles combinaciones de fuente de carbono, cepa y enzima producida: el nitrato de sodio y el sulfato de amonio; resultando que cada una de estas fuentes fueron útiles para una enzima en particular. El sulfato de amonio resultó ser la fuente indicada para la mejor producción de pectinasas y el nitrato de sodio para la producción de xilanasas.
- A nivel biorreactor las mejores condiciones de aireación y agitación fueron de 1 vvm y 200 rpm respectivamente para la producción de xilanasas y pectinasas.
- Para la producción de enzimas xilanolíticas las mejores condiciones fueron las siguientes: *Aspergillus niger* como cepa productora, olote de maíz como fuente de carbono, nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, 200 rpm y 1 vvm como condiciones óptimas de agitación y aireación, respectivamente.
- Para la producción de enzimas pectinolíticas las mejores condiciones fueron las siguientes: *Aspergillus flavipes* como cepa productora, cáscara de limón como fuente de carbono, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, 200 rpm y 1 vvm como condiciones de agitación y aireación.
- El proceso de ultrafiltración no afecta la actividad final de cada uno de dichos filtrados, es decir, no hay pérdida significativa de enzimas por dicho proceso.

10. Bibliografía

- ✓ Aguilar G. & Huitron C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzym.Microb.Technol.* 9:690–696.
- ✓ Aguilar G. and Huitrón C. (1990). Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnology Letters* 12, 655-660.
- ✓ Aguilar G. and Huitrón C. (1991). Influence of pH on endo and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp CH-Y-1043. *Canadian Journal of Microbiology* 37, 912-917.
- ✓ Bajpai, P. 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* Volume 43:141-194
- ✓ Bath M. K., (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*
- ✓ Bauchop G, (1989), *Biology of gut anaerobic fungi.* *Biosystems*, 23;53-64
- ✓ Bennett J.W.. (2010). An overview of the Genus *Aspergillus*. En *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*(1-18). United Kingdom: Caister Academy Press.
- ✓ Brillouet, J.-M., and J. P. Joseleau. 1987. Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp (beeswing bran) of wheat kernel. *Carbohydr. Res.*
- ✓ Bussink, H. J. D., F. P. Buxton, and J. Visser. 1991. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* genes encoding polygalacturonase II. *Curr. Genet*
- ✓ Camacho NA, Aguilar OG (2003). Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. *Appl Biochem Biotechnol* 104:159–172.
- ✓ Carpita, N. C., and D. M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1–30
- ✓ Casas Godoy L., Sandoval Fabián G., (2014), *Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales*, *Revista digital universitaria*, Vol. 15 N. 12
- ✓ Chisti Y. & Moo-Young M.. (2001). Bioreactors. En *Encyclopedia of Physical Science and Technology*(247-271). California, USA: Elsevier Sciences.
- ✓ Coll,L.,D.Saura,J.M.Ros,M.Moliner,andJ.Laencina.1996.Enzymatic treatment in the extraction of cold-pressed lemon peel oils., p. 963–970. In J. Visser and A. G. J. Voragen (ed.), *Pectins and pectinases*, vol. 14. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- ✓ Contreras Esquivel, J. C.; Hours, R. A.; Aguilar, C.; Reyes Vega, M. L. y J. Romero (1997), “Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina”, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 47
- ✓ Critchley,P .1987. Commercial aspects of biocatalysis in low-water systems, . In C. Laane, J. Tramper, and M. D. Lilly (ed.), *Biocatalysis in organic media.* Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- ✓ Cruz C., Castellanos D., Argüello H., (2009), *Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá*, *Revista Colombiana de ciencias hortícolas*, Vol. 3, N. 2
- ✓ Dale B. E.. (2001). Biomass, Bioengineering of. En *Encyclopedia of Physical Science and Technology*(141-157). California, USA: Elsevier Sciences.
- ✓ Domsch KH, Gams W, Anderson TH. (1980). *Compendium of Soil Fungi.* London: Academic

- ✓ Franchi María L., et al., (2014), Producción nacional de pectinasas de origen fúngico y su aplicación al procesamiento frutihortícola, N 5-6.
- ✓ Galanakis Charis M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. 2012. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224412000532> (Recuperado 15 marzo 2017)
- ✓ Ganter, C., A. Bock, P. Buckel, and R. Mattes. 1988. Production of thermostable, recombinant β -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. J. Biotechnol. 8:301–310.
- ✓ Geiser, DM, et. al., (2006) Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chactothyomycetidae. Mycologia 98.
- ✓ Gómez Carlos, Martínez-Trujillo Aurora, Trejo-Aguilar Blanca y Aguilar-Osorio Guillermo, Evaluación de las actividades pectinolíticas de cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Aspergillus flavus*, 2012, Ciudad de México.
- ✓ Granados P. Raquel, Villaverde Ma Carmen. (1997). Microbiología Tomo I. España: Thomson.
- ✓ Grassin, C., and P. Fauquembergue. 1996. Applications of pectinases in beverages, p. 453–462. In J. Visser and A. G. J. Voragen (ed.), Pectin and pectinases, vol. 14. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- ✓ Grebechova R., Prieto Contreras L., (2006), Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para aplicación en industria de alimentos. Revista de investigación La Salle, Vol.6
- ✓ Gughani HC, (2003) Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli*
- ✓ Gupta S., Bhushan B., Hoondal G.S., (2000). Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. J Appl Microbiol 88:325–334.
- ✓ Gupta U., Kar R., 2008. Optimization and Scale up of Cellulase free Endo xylanase Production by Solid State Fermentation on Corn cob and by Immobilized Cells of a Thermotolerant Bacterial Isolate. (2008) 1 (3).
- ✓ Hasper AA1, Trindade LM, van der Veen D, van Ooyen AJ, de Graaff LH.. (2004). Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from *Aspergillus niger*. Diciembre 2017, de Fungal Genomics section, Laboratory of Microbiology, Wageningen University Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15133098>
- ✓ Hagen J.,2012, Five Kingdoms, More or Less: Robert Whittaker and the Broad Classification of Organisms, Bioscience, 64-79.
- ✓ Heldt-Hansen, H. P., L. V. Kofod, G. Budolfson, P. M. Nielsen, H. S., and T. Bladt. 1996. Application of tailor made pectinases, p. 463–474. In J. Visser and A. G. J. Voragen (ed.), Pectin and pectinases, vol. 14. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- ✓ Hernandez Alicia et al.. (2002). Microbiología Industrial. España: EUNED.
- ✓ Ito, K., H. Ogasawara, T. Sugimoto, and T. Ishikawa. 1992. Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:547–550
- ✓ Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S. y R. Tewari (2001), “Applications of pectinases in the commercial sector: a review”, Bioresource Technology Volume 77 (3).

- ✓ Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A. 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th Edition*. CABI Publishing.
- ✓ Kulbe, K. D., H. Czarnetzki, J. Giray, H. Schmidt, G. Miemietz, S. Novalic, and R. Mattes. 1997. Transformation of pectin to L-ascorbic acid by enzyme. Proc. 4th Int. Workshop Carbohydr. Org. Raw Mater
- ✓ Kulkarni, Neeta; Shendye, Abhay; Rao, Mala., (1999). "Molecular and biotechnological aspects of xylanases".FEMS Microbiology Reviews
- ✓ Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2006. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*.
- ✓ Macy R., 1992, *Química orgánica simplificada*, Barcelona, Editorial Reverte
- ✓ McNeill, M., A. G. Darvill, S. C. Fry, and P. Albersheim. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53:625–663.
- ✓ Mohnen Debra. (2008). Pectin structure and biosynthesis. Septiembre 2018, de Plant Biology Sitio web: http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/Pectin-structure-and-biosynthesis.pdf
- ✓ Mulimani, V. H., and R. Ramalingam.1995. Enzymic hydrolysis of raffinose and stachiose in soymilk by alpha-galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36:897–905
- ✓ Nakamura, T.; Hours, R. A. y T. Sakai (1995), "Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases", *Journal of Food Science* 60.
- ✓ Noguera Romero L., Corzo Ríos L. J., Vázquez Lozano P.. (2014). UTILIZACIÓN DE UN DESECHO DE LA PRODUCCIÓN DE JUGO DE LIMÓN PERSA (*Citrus Latifolia*) EN LA OBTENCIÓN DE PECTINA CÍTRICA. . Septiembre 2018, de Departamento de Bioprocesos. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI)- Instituto Politécnico Nacional. Sitio web: https://www.researchgate.net/publication/271215009_UTILIZACION_DE_UN_DESECHO_DE_LA_PRODUCCION_DE_JUGO_DE_LIMON_PERSA_Citrus_Latifolia_EN_LA_OBTENCION_DE_PECTINA_CITRICA
- ✓ Oxenboll Sorensen, S., M. Pauly, M. Bush, M. Skjot, M. C. McCann, B. Borkhardt, and P. Ulvskov. 2000. Pectin engineering: modification of potatopectinbyinvivoexpressionofanendo-1,4-D-galactanase.*Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 97:7639–7644
- ✓ Pellerin, P., M. Gosselin, J.-P. Lepoutre, E. Samain, and P. Debeire. 1991. Enzymic production of oligosaccharides from corncob xylan. *Enzyme Microb. Technol.* 13:617–621.
- ✓ Puls, J., A. Borneman, D. Gottschalk, and J. Wiegel. 1988. Xylobiose and xylooligomers. *Methods Enzymol.* 160:528–536
- ✓ Ratto, M., and L. Viikari. 1996. Pectinases in wood debarking, p. 979–982. In J. Visser and A. G. J. Voragen (ed.), *Pectins and pectinases*, vol. 14. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- ✓ Ros J.M., Schols H.A., Voragen A.G.J.. (1996). Extraction, characterisation, and enzymatic degradation of lemon peel pectins . Diciembre 2017, de Wageningen Agricultural University, Department of Food Science Sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621595003894>
- ✓ Ross, J. M., D. Saura, L. Coll, M. M., and J. Laencina.1996.Oligouronides of pectins in membrane reactor by enzymatic degradation of pectins from citrus peel. A preliminary study, p. 983–990. In J. Visser and A. G. J. Voragen (ed.), *Pectins and pectinases*, vol. 14. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- ✓ Panasenkov V., *Ecology of microfungi*, Botanical Review, 1967, Vol 33, No 3, California, USA.

- ✓ Petit, S., R. Ralainirina, S. Favre, and R. de Baynast. February 1993. International Patent 93/02092.
- ✓ Pimentel D.. (2001). Biomass Utilization, Limits of. En Encyclopedia of Physical Science and Technology(159-171). California, USA: Elsevier Sciences.
- ✓ Pitt J.I. y Hocking A.D. (2009). Fungi and Food Spoilage, Springer US.
- ✓ Sagarpa. (2017). Maíz Blanco. Septiembre 2018, de Sagarpa Sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/214365/Bolet_nes_Balanzas_productos_agropecuarios.pdf
- ✓ Saha B.C. y Bothast R.J. (1999). Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. Appl Biochem Biotechnol
- ✓ Saha B.C., (2003). Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biotechnol (2003)
- ✓ Saval Susana, Aprovechamiento de desechos agroindustriales: pasado, presente y futuro, 2012, Instituto de Ingeniería, UNAM, Ciudad de México. Vol 12 No 2
- ✓ Somiari, R. I., and E. Balogh. 1995. Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. Enzyme Microb. Technol. 17:311–316.
- ✓ Stanbury P.F., Whitaker A., Hall S.J.. (2000). Principles of fermentation technology. Massachusetts, USA: Butterworth-Heinemann.
- ✓ Sunna A. & Antranikian G. (1997). Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. Agosto 2018, de Technical University Hamburg-Harburg, Institute of Biotechnology, Department of Technical Microbiology, Denickestrasse 15, 21 071 Hamburg, Germany Sitio web: <https://doi.org/10.3109/07388559709146606>
- ✓ Todaro C., Vogel H., (2014), Fermentation and biochemical Engineering Handbook, Oxford, 3° Edición, ELSEVIER.
- ✓ Tresner H. D. & Hayes Jean A. (1971). Sodium Chloride Tolerance of Terrestrial Fungi. Applied Microbiology, Aug. American Society for Microbiology Vol. 22:2.
- ✓ Universidad Nacional Autónoma de México, 2011, *Aspergillus*, [En línea] (Actualizado el 19 Octubre 2015). Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html> (Recuperado 15 marzo 2017)
- ✓ Valero A ., Oliván S., Marín S., Sanchis V., Ramos A .J. (2007b): Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by *A. section Nigri* in grapes during dehydration. Food Microbiology
- ✓ Vasquez V. Anny, (2013). Producción de xilanasas por *Aspergillus sp.* En fermentación sumergida y fermentación en medio sólido, México, D.F.
- ✓ VERTIENTES revista especializada en ciencias de salud, 2013, Enzimas xilanólicas y sus aplicaciones industriales, [En línea]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2013/vre131e.pdf> (Recuperado 14 marzo 2017)
- ✓ Vogel, M. 1991. Alternative utilization of sugar beet pulp. Zuckerindustrie 116:265–270.
- ✓ de Vries R.P.. (1999). Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Diciembre 2017, de Molecular Genetics of Industrial Microorganisms at Wageningen Agricultural University Sitio web: <http://edepot.wur.nl/121227>
- ✓ Wiley, B. J. & Simmons, E. G. (1973). New species and a new genus of Plectomycetes with *Aspergillus* states. *Mycologia*.

- ✓ Wilkie, K. C. B., and S.-L. Woo. 1977. A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydr. Res.* 57:145–162.
- ✓ Woods Lea F.J., Tucker G.A., 1992, *Enzymes in food processing*. 2° Edición. Glasgow. Blackie Academic & professional.
- ✓ Wong, C.-H., F. P. Mazenod, and G. M. Whiteside. 1983. Chemical and enzymatic synthese of 6-deoxyhexoses. Cobversion to 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one (furaneol) and analogues. *J. Org. Chem.* 48: 3493–3497.