

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**PRODUCCIÓN DE INVERTASA POR *Aspergillus niger* EN
FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA
OSCAR NUÑEZ GAONA**

**ASESORES
DR. ERNESTO FAVELA TORRES.
DR. SERGIO HUERTA OCHOA.
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL.**

MÉXICO D.F.

JULIO, 2004.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presento:

Oscar Nuñez Gaona

El día 16 de julio de 2004

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

Universidad Autónoma Metropolitana



Sinodal: Dra. María del Rosario Peralta Pérez

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec



Sinodal: Dr. Alejandro Téllez Jurado

Universidad Politécnica de Pachuca



La maestría en Biotecnología está incluida en el padrón de Posgrados de excelencia del CONACYT, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el convenio **471-O/Maestría en Biotecnología**.

Agradecimientos:

A la inteligencia creadora que conduce este mundo mediante el destino y la casualidad por permitirme ser conciente.

A mi familia por darme las oportunidades para desarrollarme en esta vida, de manera especial a mi hermana por su apoyo durante este proceso.

A los doctores Ernesto Favela Torres, Sergio Huerta Ochoa y Octavio Loera Corral, por el tiempo dedicado en el desarrollo y revisión de este trabajo de tesis.

A los doctores María del Rosario Peralta Pérez y Alejandro Téllez Jurado por sus comentarios tan acertados.

A dos seres que se asomaron a mi vida y me enseñaron que lo mejor de la vida no tiene precio, que la inteligencia es un don y no se puede separar de la responsabilidad.

A Laura, esa persona tan especial en mi vida, que sin ella y su familia no habría sido posible terminar este proyecto.

A todos lo que estuvieron y están en la pp4 por compartir un poco de su tiempo conmigo.

A mi hermano por enseñarme la importancia de la paciencia, disciplina y constancia

A todos aquellos seres que alegran mi vida.

RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto combinado de la concentración de sacarosa y la humedad inicial del soporte, así como el incremento en la concentración de dióxido de carbono (CO_2) en la atmósfera gaseosa sobre la producción de la enzima invertasa (β fructo-furanosidasa EC 3.2.1.26). Empleándose la cepa de *Aspergillus niger* C28B25 y espuma de poliuretano como soporte inerte.

Se evaluaron el efecto de la concentración de sacarosa como única fuente de carbono en un intervalo de 100 a 400 mg/g s.s., y del contenido de humedad del soporte en un intervalo de 20 a 80 %. También se evaluó el efecto de modificar la atmósfera con mezclas de aire que contenían una relación O_2/CO_2 de 18.5/2.5 y 16/5 %.

Se estimaron los siguientes parámetros fisiológicos: la velocidad específica de crecimiento del hongo (μ), el nivel máximo de biomasa producida (X_{max}), el rendimiento de biomasa por gramo de sustrato consumido ($Y_{X/S}$) y el rendimiento enzimático por gramo de biomasa producida ($Y_{E/X}$).

Con la evaluación de estos parámetros se pretende demostrar, que la producción de invertasa en fermentación en medio sólido es directamente proporcional a la cantidad de sacarosa presente en el medio de cultivo, si y solo si la humedad inicial del soporte es reducida, y que el incremento en la concentración de CO_2 en la atmósfera gaseosa, afecta sensiblemente la producción de invertasa en este tipo de sistemas.

Cuando se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa como única fuente de carbono sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* y la producción de invertasa, se observó que no existe ningún tipo de inhibición sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* con ninguna de las concentraciones evaluadas, mas aun el incremento en la concentración de sacarosa estimula la producción de biomasa obteniéndose la mayor producción de biomasa (215 mg/g s.s) con 400 mg/g ss. La máxima producción enzimática (147 u/g s.s) se obtiene con concentraciones de sacarosa de 200 mg/ g s.s. El contenido de humedad para la producción de biomasa y

enzimática fue inversamente proporcional a la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo.

Cuando se evaluó el efecto de modificar la atmósfera gaseosa, se observa que el la mezcla con mayor concentración de CO₂ tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, este mismo incremento no tiene un efecto relevante sobre la producción de invertasa. Los resultados obtenidos nos permiten formular las siguientes conclusiones:

- I. Las condiciones seleccionadas para los ensayos enzimáticos fueron una temperatura de 50 ° C, un pH de 4.5 con un buffer de citratos con un tiempo de reacción de 10 minutos.
- II. El tipo de fuente de nitrógeno tiene un efecto importante sobre la producción de invertasa obtenida por fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte, que se observa como una disminución en la actividad enzimática, debida a la acidificación del medio.
- III. El incremento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, no inhibe el crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte inerte, más aún estimula la producción de biomasa.
- IV. La mezcla gaseosa con una composición (O₂/CO₂) de 16/5 % tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* en el mismo sistema de fermentación.
- V. La máxima producción de invertasa (147 U/g s.s.) por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte se obtiene con concentraciones de sacarosa de 200 mg/g s.s.

VI. No se observan diferencias significativas en la producción de invertasa con las mezclas gaseosas empleadas.

ABSTRACT

The combined effect of sucrose concentration and support moisture content, and the increment in carbon dioxide atmosphere on the production of invertase (β fructo-furanoside EC 3.2.1.26) was evaluated.

The *Aspergillus niger* C28B25 strain and polyurethane foam as inert support were used in this study. The effect of sucrose concentration as the only carbon source was evaluated in the interval of 100 to 400 mg/g of dry matter. And the support moisture content was studied in the interval of 20 to 80 %. Atmospheres of carbon dioxide of 2.5 and 5 % were tested.

Physiological parameters: specific growth rate (μ), final biomass (X_{\max}), yield of biomass per gram of substrate consumed ($Y_{X/S}$) and yield of enzyme activity produced per gram of biomass ($Y_{E/X}$) were estimated.

There was not observed *A. niger* growth inhibition at any sucrose concentration tested, rather this increment stimulates biomass production reached the maximum (216 mg of biomass/ g d.m) at 400 mg of sucrose/g dry matter. Nevertheless, enzyme activity production showed a maximum (147 u/g d.m), which was obtained at 200 mg of sucrose/g dry matter.

Biomass and enzymatic activity production was negatively affected by the support moisture content.

The increment of carbon dioxide concentration in the atmosphere showed a positive effect on *A. niger* growth and a positive but not significant differences on invertase production.

This behaviour might be due to the interaction of the relevant environmental variables (sucrose concentration, support moisture content and carbon dioxide concentration) or to the kind and geometry of the support used in this work.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO	3
2.1.1 PRODUCTOS OBTENIDOS POR FMS	8
2.1.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN PROCESOS DE FMS	8
2.1.3 SOPORTES UTILIZADOS EN FMS.....	10
2.1.4 FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUYEN SOBRE EL CRECIMIENTO Y METABOLISMO MICROBIANO EN FMS	14
2.1.4.1 <i>Concentración de la fuente de carbono</i>	14
2.1.4.2 <i>Contenido de humedad y actividad de agua (a_w)</i>	14
2.1.4.3 <i>Atmósfera gaseosa</i>	19
2.1.4.4 <i>Temperatura</i>	21
2.1.4.5 <i>pH</i>	22
2.2 <i>Aspergillus niger</i>.....	23
2.2.1 FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE SU CRECIMIENTO Y METABOLISMO.....	24
2.2.2 PRODUCTOS INDUSTRIALES DEL GÉNERO <i>ASPERGILLUS</i>	25
2.3 INVERTASA.....	25
2.3.1 MICROORGANISMOS PRODUCTORES	26

2.3.2 CARACTERÍSTICAS	27
2.4 ANTECEDENTES DIRECTOS.....	28
3.1 JUSTIFICACIÓN.....	30
3.2 HIPÓTESIS	31
3.3 OBJETIVOS.....	32
3.3.1 GENERAL.....	32
3.2.2 PARTICULARES	32
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1. MICROORGANISMO.....	33
4.2. MEDIO DE CULTIVO.....	33
4.3. SOPORTE.....	35
4.4. CONDICIONES DE CULTIVO.	35
4.5 CARACTERIZACIÓN DE LA INVERTASA	36
4.5.1. CINÉTICA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	36
4.5.2 EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD INVERTASA.	36
4.5.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD INVERTASA.	36
4.6. COMPOSICIÓN DE LA ATMÓSFERA GASEOSA.	37
4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS	37
4.7.1. DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA.....	37
4.7.2. ANÁLISIS DE AZÚCARES, POLIOLES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS.	37
4.7.3. PRODUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO	37
4.7.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	37

4.7.5. HUMEDAD Y ACTIVIDAD DE AGUA.....	38
4.7.6. DETERMINACIÓN DEL PH.....	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA INVERTASA PRODUCIDA POR FMS..	40
5.1.1. CINÉTICA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA..	40
5.1.2. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD INVERTASA..	41
5.1.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD INVERTASA.....	42
5.1.4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	45
5.2. EFECTO DEL TIPO DE FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INVERTASA.....	45
5.2.1. CONCLUSIONES PARCIALES.....	48
5.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA Y CONTENIDO DE HUMEDAD INICIAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INVERTASA Y CRECIMIENTO DE <i>A. NIGER</i> EN FMS.....	48
5.3.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA.	49
5.3.2 PRODUCCIÓN DE INVERTASA	56
5.3.3 ACTIVIDAD DE AGUA (A_w).	58
5.3.4. PH.....	63
5.3.5 CONCLUSIONES PARCIALES.....	63
5.4. EFECTO DE MODIFICARLA ATMÓSFERA GASEOSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>A. NIGER</i> Y LA PRODUCCIÓN DE INVERTASA EN FMS..	64
5.4.1 EFECTO DE LAS MEZCLAS GASEOSAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	65
5.4.2 EFECTO DE LA MEZCLA GASEOSA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INVERTASA.	68
5.4.3 EFECTO DE LA ATMÓSFERA MODIFICADA SOBRE EL RENDIMIENTO ENZIMA/BIOMASA Y_{EX}	70
5.4.4 EFECTO DE LA MEZCLA GASEOSA PRESENTE EN LA ATMÓSFERA SOBRE EL RENDIMIENTO ENZIMA/SUBSTRATO.....	71
5.4.5 EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA ATMÓSFERA GASEOSA SOBRE EL PH FINAL .	72

5.4.6 CONCLUSIONES PARCIALES.....	73
6 DISCUSIÓN GENERAL	74
7. CONCLUSIONES	78
8. PERSPECTIVAS.....	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXO 1 _DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD CRÍTICA DE LA ESPUMA DE POLIURETANO	91
ANEXO 2 _ORDEN DE ELUSIÓN DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS POR A. NIGER EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON ESPUMA DE POLIURETANO COMO SOPORTE.....	93

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

[Tabla 1 Composición del medio Pontecorvo modificado \(MPm\)](#)..... 34

[Tabla 2 Biomasa, actividad enzimática y pH final con nitrato de sodio/sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.](#) 47

[Tabla3. Biomasa, actividad enzimática y pH finales con una mezcla de urea/sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.](#) 48

[Tabla 4. Actividad de agua \(\$a_w\$ \) durante la fermentación en medio sólido de *A.niger* C28B25 para la producción de invertasa.](#) 59

[Tabla 5. Rendimientos máxicos producto/substrato, para trealosa, fructosa, y ácido oxálico.](#)..... 62

[Tabla 6 Orden de elusión y tiempo de retención de los metabolitos producidos por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte](#) 93

[Figura 1. Liberación de azúcares reductores en función del tiempo.](#)..... 41

[Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad invertasa.](#)..... 42

[Figura 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad invertasa de *A. niger*](#)44

[Figura 4. Estabilidad de la invertasa al pH a 50 °C y 30 °C producida por *A. niger* C28B25 en FMS.](#) 45

[Figura 5. Biomasa producida por *A. niger* C28B25 en FMS en función de la concentración de sacarosa y humedad inicial.](#)..... 49

[Figura 6. CO₂ maximo producido en función de la concentración de sacarosa y contenido de humedad inicial del soporte.](#) 52

[Figura 7. Duración de la fase lag en función de la concentración de sacarosa y contenido de humedad inicial del soporte.](#)..... 54

[Figura 8. Velocidad específica de crecimiento en función de la concentración de sacarosa y humedad iniciales.](#) 56

[Figura 9. Invertasa producida por *A. niger* C28B25 en FMS en función de la concentración de sacarosa y humedad inicial.](#) 57

<u>Figura 10.</u> Rendimiento enzima/substrato $Y_{U/GS}$ en función de la concentración de sacarosa y humedad inicial.....	60
<u>Figura 11.</u> Rendimiento enzima/biomasa $Y_{U/X}$ en función de la concentración de sacarosa y humedad iniciales.....	61
<u>Figura 12.</u> pH final en función de la concentración de sacarosa y humedad iniciales.....	63
<u>Figura 13</u> producción de biomasa en función de la mezcla gaseosa en la atmósfera y de la humedad inicial del soporte.....	66
<u>Figura 14</u> Velocidad específica de crecimiento para <i>A. niger</i> C28B25, en función de la mezcla de gases presentes en la atmósfera y del contenido de humedad del soporte.....	67
<u>Figura 15</u> Duración de la fase lag del crecimiento de <i>A. niger</i> C28B25, en función de la mezcla gaseosa presente en atmósfera y del contenido de humedad del soporte.....	68
<u>Figura 16</u> Producción de invertasa en función de la atmósfera gaseosa y de la humedad inicial del soporte.....	70
<u>Figura 17</u> Rendimiento enzima/biomasa en función de la mezcla gaseosa presente en la atmósfera y la humedad inicial del soporte.....	71
<u>Figura 18</u> Rendimiento enzima/substrato en función de la composición de la atmósfera y el contenido de humedad del soporte.....	72
<u>Figura 19</u> pH final en función de la composición de la atmósfera y del contenido de humedad del soporte.....	73
<u>Figura 20</u> pérdida de agua del soporte en el tiempo.....	91
<u>Figura 21</u> Curva de secado para el poliuretano a 130 ° C.....	92

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación en medio sólido se define como el crecimiento de microorganismos sobre un soporte sólido en ausencia de agua libre, los microorganismos más ampliamente usados en este tipo de procesos son los hongos filamentosos, ya que este tipo de fermentaciones se aproxima más a la forma como crecen estos microorganismos en la naturaleza, lo que la hace un proceso atractivo para estudios fisiológicos. Los principales géneros de hongos filamentosos empleados en este tipo de procesos son *Aspergillus* y *Penicillium*.

La fermentación en medio sólido tiene muchas ventajas sobre la fermentación en medio líquido, entre las que se pueden destacar la sencillez en las técnicas empleadas, poca generación de desechos, el uso de mayores concentraciones de fuente de carbono sin represión catabólica o inhibición del crecimiento; sin embargo, una desventaja de este tipo de fermentaciones es que no se puede cuantificar el crecimiento microbiano (biomasa), el consumo de sustratos (carbohidratos) y algunos productos del metabolismo (proteínas) de manera directa, esto debido principalmente a la complejidad de los subproductos agrícolas empleados como soporte y fuente de nutrientes. Una alternativa práctica es el uso de soportes nutricionalmente inertes embebidos con un medio de cultivo de composición química conocida, esto permite la determinación de la biomasa y de los productos del metabolismo, así como la evaluación de la composición del medio de cultivo sobre el metabolismo microbiano.

La fermentación en medio sólido se ha empleado para la producción de enzimas por *Aspergillus niger*, entre las que se encuentra la invertasa. La producción de enzimas se ve afectada por condiciones ambientales entre las que destacan: la concentración y tipo de fuente de carbono, el contenido de humedad del soporte y la actividad de agua, el pH del medio y la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa.

El presente trabajo describe el efecto de la concentración de sacarosa, el contenido de humedad del soporte y la concentración de CO₂ sobre la producción de invertasa por *A. niger* en fermentación en medio sólido empleando poliuretano como soporte inerte.

En el siguiente capítulo se presenta una revisión de la literatura científica relacionada con la fermentación en medio sólido haciendo hincapié en las condiciones ambientales que influyen sobre su desarrollo. Las características principales de *Aspergillus niger* y los factores que influyen en su desarrollo, para finalmente hacer una breve descripción de la invertasa.

De esta revisión surgen los objetivos e hipótesis planteados para este trabajo, posteriormente, se describe la metodología empleada para el cumplimiento de dichos objetivos, en ella se incluye la descripción del microorganismo utilizado, del substrato y del sistema de fermentación así como las técnicas y procedimientos empleados en la medición de las variables relevantes. El capítulo que corresponde a los resultados y discusiones del trabajo experimental se divide en tres partes principales: caracterización parcial de la invertasa obtenida, efecto de la concentración de sacarosa y humedad inicial del soporte, y efecto de la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa sobre el crecimiento de *A. niger* y la producción de invertasa. Posteriormente, se presenta una discusión general de los resultados más importantes de este trabajo. Después de la discusión general y con base en el análisis de resultados se presentan las conclusiones del trabajo experimental. Para finalmente dar unas cuantas recomendaciones para trabajos futuros.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

La fermentación en medio sólido (FMS) ha ganado importancia en años recientes debido a sus ventajas sobre la fermentación en medio líquido (FML), los avances en FMS son el resultado de innovaciones biotecnológicas, pero su aplicación a escala industrial es limitada. Este proceso tiene aplicaciones importantes en la industria, que incluyen la manufactura de productos microbianos de alto valor agregado. El mecanismo de crecimiento, formación de productos, así como los fenómenos de transporte y aspectos cinéticos, junto con las técnicas de producción, separación y los tipos de bioreactores empleados, son diferentes de los usados en FML (Balakrishnan y Pandey, 1996).

Definición

Existen diferentes definiciones para la fermentación en medio sólido, pero todas coinciden en que la fermentación en medio sólido involucra el crecimiento y metabolismo de microorganismos sobre soportes sólidos húmedos en ausencia de agua libre entre las partículas (Lonsane y col., 1992; Viccini y col., 2001, 2003; Marsh y col., 1998; Hoogschagen y col., 2001; Pandey, 2003; Nagel y col., 1999; Ghildyal y col., 1994; Mitchell y col., 2002; Ferreira y col., 1999; Domínguez y col., 2001; Nagao y col., 2003; Kalogeris y col., 1999), lo cual involucra un bajo contenido de humedad (Robinson y col., 2001). Sin embargo, aunque en la práctica no existe un límite definido con respecto al contenido de agua en los procesos de FMS, toda actividad biológica cesa por debajo de contenidos de humedad del 12 %, que sería el nivel mínimo al cual se puede llevar a cabo la FMS (Mitchell y Lonsane, 1992); el máximo contenido de humedad depende esencialmente de la capacidad de retención de agua por parte del soporte, y puede llegar a valores de 80 %. En términos prácticos la ausencia de agua libre, corresponde a un contenido de humedad que varía entre 40 y 80 % dependiendo del soporte utilizado (Gervais y col., 1996; Bellon-Maurel y col., 2003). A pesar del

bajo contenido de humedad el soporte debe contener el agua suficiente para garantizar el crecimiento y metabolismo de los microorganismos, el agua se encuentra absorbida o acomplejada en la matriz sólida (Raghavarao y col., 2003).

La FMS tiene un gran potencial para la producción de enzimas, que puede tener un interés especial, sobretodo en aquellos procesos donde el producto crudo de la fermentación puede ser usado directamente como fuente de enzimas. Los principales factores que afectan la síntesis enzimática en FMS incluyen la selección adecuada del sustrato, tamaño de partícula, espacio interparticular y área superficial, contenido de humedad y actividad de agua (a_w) del sustrato, humedad relativa de la atmósfera gaseosa, tipo y tamaño de inóculo, control de la temperatura durante la fermentación y remoción del calor metabólico, tiempo de cultivo, como control en la uniformidad de las condiciones ambientales durante la fermentación, velocidad de consumo de oxígeno y velocidad de liberación de CO_2 (Pandey y col., 1999).

Se pueden distinguir tres tipos básicos de reactores para la FMS, en función del régimen de mezclado y el modo de aireación empleados.

- Reactores de charola son muy simples, sin aireación forzada y sin mezclado.
- Reactores de tambor rotatorio para este tipo de reactores la agitación puede ser de manera intermitente o continua, con aireación forzada.
- Reactores de lecho empacado son con aireación forzada a través del lecho. El diseño más comúnmente empleado a nivel laboratorio, es el de columnas cilíndricas de vidrio o plástico dentro de un baño de temperatura controlada (Durand y col., 1996).

Por otro lado dependiendo de su capacidad los reactores empleados en FMS se pueden clasificar en dos categorías:

- Reactores de laboratorio, que usan cantidades de sustrato sólido que van desde gramos hasta kilogramos.
- Reactores piloto e industriales, este tipo de reactores usan cantidades de sustrato que van desde kilogramos hasta toneladas.

La primer categoría comprende varios diseños, más o menos sofisticados, la segunda, a pesar que se usa a escala industrial, es menos variada (Duran, 2003).

Características generales

La característica principal en FMS es el contenido de humedad del medio, que marca la diferencia entre este tipo de procesos y la FML. El agua es esencial para el crecimiento microbiano. La poca cantidad de agua disponible tiene varias consecuencias (Mitchell y Lonsane, 1992):

- a) La actividad de agua de los substratos puede estar por debajo de 0.99, especialmente en FMS donde el agua libre no esta presente. Esto tiende a favorecer el crecimiento de hongos, muchos de los cuales crecen bien con actividades de agua entre 0.93 y 0.98. Para la mayoría de bacterias y levaduras, el crecimiento es óptimo con valores de actividad de agua por encima de 0.99.
- b) La transferencia de calor es restringida, lo que ocasiona problemas de sobrecalentamiento a gran escala. El enfriamiento evaporativo es el método de enfriamiento más efectivo en FMS. Aún cuando este método reduzca la disponibilidad de agua.
- c) En FMS los substratos están más concentrados, el agua comprende solamente del 10 al 85 % de la masa total.

De manera general la FMS es un sistema que esta compuesto por cuatro fases (Auria y col., 1995):

1. Una fase gaseosa que puede ser estática o fluir a través del sistema.
2. Un substrato sólido insoluble en agua.
3. Una fase acuosa estática donde se disuelven los substratos solubles.
4. Una fase biológica formada por los microorganismos.

Este sistema tiene las siguientes características generales:

- Una matriz sólida porosa, natural o sintética, con una relación área/volumen elevada.
- La matriz sólida debe tener una buena capacidad de retención de agua.

- La atmósfera gaseosa que rodea al soporte debe fluir fácilmente con presiones bajas mezclándose con la masa fermentativa.
- Las propiedades mecánicas de la matriz sólida debe permitir la agitación mecánica y el mezclado de la masa fermentativa.
- El soporte no deberá de contener ningún tipo de inhibidor del crecimiento microbiano y será capaz de absorber los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos (carbohidratos, minerales, etc.) (Raimbault, 1998).

Ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido

La FMS se distingue de la FML, por el hecho de que el crecimiento microbiano y la formación de producto ocurren sobre la superficie o cerca de ésta en un soporte con poco contenido de humedad (Selvakumar y col., 1996). Durante la FMS la concentración neta del substrato accesible puede disminuir, incrementarse o permanecer constante en diferentes estadios de crecimiento del microorganismo (Larroche, 1996). Por otro lado, las respuestas bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos difieren significativamente en FMS en comparación con FML (Balakrishnan y Pandey, 1996).

Ventajas de la FMS sobre la fermentación en medio líquido

Las principales ventajas que ofrece la FMS están en el área de manejo de residuos sólidos y en el consumo de energía, para la producción de metabolitos de alto valor agregado, como antibióticos, enzimas, esporas, etc (Pandey y col., 1996). Entre las principales ventajas que presenta la FMS con respecto a la FML podemos enumerar las siguientes:

- El bajo contenido de humedad permite utilizar fermentadores pequeños, facilita la extracción del producto y reduce el riesgo de contaminación bacteriana (Robinson y col., 2001; Gautam y col., 2002).
- La producción de enzimas degradadoras de carbohidratos es mayor en este tipo de procesos (Nakadai y Nasumo, 1988).

- No se observa represión catabólica o inhibición por productos finales (Shankaranand y col., 1992; Acuña-Argüelles y col., 1995; Montiel-González y col., 2002). Lo que permite el empleo de mayores concentraciones de substrato (Gautam y col., 2002) y la obtención de productos más concentrados (Robinson y col., 2001).
- Genera poca cantidad de desechos.
- Tiene requerimientos energéticos simples. Como del composteo y de los alimentos fermentados tradicionales (Koji, quesos, etc).
- Tanto la técnica como el medio de fermentación son simples.
- No hay formación de espuma durante el proceso.
- Se puede airear fácilmente.
- No requiere de un control estricto sobre los parámetros de fermentación. (Gautam y col., 2002).

Desventajas de la FMS en comparación con la FML

En la FML el control y regulación de los principales parámetros (pH, temperatura, oxígeno disuelto, etc) no representa mayor problema. En FMS lo anterior es una tarea bastante complicada, más aún para algunos parámetros, las pruebas no existen o sus especificaciones son consideradas de manera incorrecta; por ejemplo, el contenido de humedad del substrato no se puede medir en línea, siendo éste un parámetro clave que afecta el metabolismo microbiano, la estructura del soporte y la transferencia de calor y masa (Durand y col., 1996). La principal diferencia entre la FML y la FMS es el mezclado, la primera generalmente tiene reacciones en una mezcla perfecta, lo que previene la formación de capas limitantes alrededor del microorganismo (Nakadai y Nasumo, 1988), y cada parte del reactor contiene la misma cantidad de microorganismos y metabolitos en un tiempo determinado. La FMS, que se caracteriza por la reducida fase líquida, presenta una elevada viscosidad, así el mezclado del medio provoca esfuerzos cortantes muy grandes que pueden dañar a la célula (Gervais y col., 1996).

2.1.1 Productos obtenidos por FMS

Uno de los usos de la FMS más extensamente aplicados a través de la historia, es la producción de alimentos fermentados como quesos y comidas fermentadas de oriente, otros usos son, la conservación de pescado, la, producción de ácido galico, etc. (Mitra y col., 1996; Raimbault, 1998; Bellon-Maurel y col., 2003).

En la actualidad, se promueve el uso de la FMS en el desarrollo de bioprocesos como: la biorremediación de compuestos tóxicos, detoxificación biológica de residuos agroindustriales, incremento del valor nutricional de residuos agrícolas, biopulpeo y producción de productos de alto valor agregado como metabolitos secundarios con actividad biológica, que incluyen antibióticos, factores de crecimiento vegetal, enzimas, ácidos orgánicos, biopesticidas, biosurfactantes, combustible biológico, compuestos aromáticos, entre otras aplicaciones (Pandey 2003; Raimbault, 1998; Oostra y col., 2001; Larroche y col., 1998).

2.1.2 Microorganismos utilizados en procesos de FMS

Los microorganismos utilizados en FMS comprenden bacterias, actinomicetos, levaduras y hongos (Mitra y col., 1996; Larroche, 1996; Pandey, 2003). Los hongos, a diferencia de otros microorganismos, crecen favorablemente en la naturaleza sobre sustratos sólidos con bajo contenido de humedad, como trozos de madera, semillas, raíces, hojas de plantas; en partes secas de animales como piel, huesos y materia fecal (Mitra y col., 1996). Debido a lo anterior, por su morfología micelial y actividades enzimáticas, los hongos filamentosos son los microorganismos más empleados para la producción de metabolitos en FMS (Robinson y col., 2001; Raghavarao y col., 2003; Durand, 2003). Por otro lado, están mejor adaptados para crecer bajo condiciones combinadas de baja a_w y en presencia de sustratos complejos, siendo ésta otra razón de que la mayoría de las enzimas obtenidas por FMS sean de origen fúngico. Estas condiciones (bajo contenido de humedad y sustratos complejos), son similares a las que se observan para el crecimiento de estos microorganismos en la naturaleza, por otro lado los hongos filamentosos tienen la capacidad de penetrar en el soporte, lo que

logran por medios mecánicos y enzimáticos, esto con la finalidad de anclarse firmemente a la superficie del mismo y asimilarlo mejor. Dentro de los hongos filamentosos las especies que más se emplean en la producción de enzimas por FMS son: *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, etc (Mitra y col., 1996).

La asimilación del substrato en FMS, se ve afectada por factores físicos y químicos, entre los que destacan la disponibilidad de los nutrientes, efectos de película, transferencia de masa, porosidad y tamaño de partícula del soporte (Pandey, 1992). Así mismo el crecimiento, morfología y formación de producto en FMS son afectados por la temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno y composición de la atmósfera gaseosa, tamaño de inóculo, concentración de nutrientes, velocidad de aireación y de mezclado, morfología del microorganismo, etc. La actividad microbiana cambia el ambiente local debido principalmente al consumo de oxígeno y nutrientes, a la producción de metabolitos y a la liberación de calor metabólico. (Ikasari y Mitchell 1998a; Koutinas y col., 2003; Piccoli-Valle y col., 2003).

En FMS el crecimiento fúngico se caracteriza por la extensión de las hifas sobre la superficie del soporte, pero la dirección y velocidad del crecimiento microbiano depende de la disponibilidad de nutrientes y de la configuración geométrica del soporte, haciendo que la adhesión del microorganismo a la superficie del soporte juegue un papel determinante en el crecimiento y la extensión de la hifa. La principal fuente de carbono en estos procesos son generalmente los carbohidratos, por lo que el microorganismo libera enzimas hidrolíticas, que difunden dentro del substrato e hidrolizan los polisacáridos, los azúcares solubles liberados difunden hacia los microorganismos, simultáneamente, el oxígeno difunde desde la fase gaseosa hacia el microorganismo, que consume los nutrientes solubles (Sangsurasak y col., 1996).

La estimación directa del crecimiento fúngico durante la FMS es importante para monitorear el proceso, pero se dificulta debido a que la biomasa no se puede separar del soporte sólido; sin embargo, la estimación de la biomasa es esencial

para el análisis de los rendimientos del sistema (Ikasari y Mitchell, 1998a). Una manera de cuantificar la biomasa es suspender el sustrato en un buffer o en agua, con o sin agentes tensoactivos y contar las células o esporas (Mitchell y Lonsane, 1992). Otros métodos indirectos empleados para la estimación de la biomasa son: la estimación de la proteína después de una extracción con álcali, la actividad lacasa extracelular, la velocidad de consumo de oxígeno, la liberación de CO₂, etc. Siendo el uso de las ecuaciones lineal, exponencial y logística la manera típica de caracterizar los perfiles de crecimiento en FMS, (Viccini y col., 2001). Sin embargo, en FMS la μ no es homogénea durante la fermentación ni en todo el soporte, variando en el tiempo y espacio (Nakadai y Nasumo, 1988). Por otro lado, un entendimiento de la cinética de crecimiento en FMS es fundamental para el éxito en el escalamiento, diseño y optimización de los procesos, esto también puede extender el conocimiento de los mecanismos físicos y biológicos que delinean el comportamiento de los microorganismos empleados (Sangsurasak y col., 1996).

2.1.3 Soportes utilizados en FMS

En FMS, los materiales empleados como soportes son fibrosos, lo que ocasiona que tengan espacios vacíos entre las partículas, estos espacios se deben llenar con una fase gaseosa (Gervais y col., 1996; Gervais y Bensoussan, 1994; Raimbault, 1998). En estos medios, el crecimiento está limitado por la difusión de nutrientes, la cual ocurre solamente en la delgada capa de agua que rodea al microorganismo; el crecimiento puede limitarse por altas concentraciones de metabolitos en esta capa acuosa (Nakadai y Nasumo, 1988; Gervais y Bensoussan, 1994). Los soportes empleados en FMS son insolubles en agua y actúan como fuente de carbono, nitrógeno y de minerales (Pandey y col., 1999). Los soportes tienen la capacidad de absorber el agua necesaria para las actividades metabólicas. Las bacterias y levaduras crecen adheridas a la superficie del soporte, los hongos filamentosos en cambio son capaces de penetrar el soporte para asimilar los nutrientes, en este caso el soporte también

sirve como superficie de anclaje (Pandey y col., 1999). Así mismo, el tipo de soporte y el pretratamiento del mismo influyen considerablemente sobre la FMS (Pandey y col., 1999; Hoogschagen y col., 2001). Los soportes empleados en FMS se pueden clasificar en dos grandes categorías:

- Materiales orgánicos que son moléculas poliméricas insolubles o parcialmente solubles en agua, y que sirven al mismo tiempo como soporte y sustrato. Son generalmente productos agroindustriales.
- Materiales nutricionalmente inertes, su función es sólo como soporte y deben de impregnarse con medios de cultivo (Durand y col., 1996).

El primero y más comúnmente usado involucra el cultivo de microorganismos sobre una matriz polimérica que es asimilable por el microorganismo, la naturaleza del polímero puede ser de almidón, celulosa o lignina, el segundo tipo involucra el desarrollo del microorganismo sobre un soporte poroso inerte impregnado con medio de cultivo de composición definida, los materiales empleados en este tipo de cultivos son: espuma de poliuretano, vermiculita, poliestireno, etc (Larroche, 1996; Auria y col., 1995; Gautam y col., 2002).

El sustrato ideal es aquel que provee todos los nutrientes necesarios para el óptimo funcionamiento de los microorganismos (Selvakumar y col., 1996), sin embargo, alguno de los nutrientes puede estar disponible en cantidades subóptimas o bien estar ausentes en el sustrato, en tal caso es necesario agregarlo de manera externa (Pandey y col., 1999). El costo y disponibilidad del soporte es otra importante consideración. En algunos casos, la extensión de los tratamientos físicos o químicos necesarios para mejorar la accesibilidad del microorganismo a los nutrientes y los cambios fisicoquímicos que ocurren después de la esterilización del sustrato determinan si éste es adecuado para emplearse en FMS. Otro factor crítico que influye en FMS es el tamaño de partícula del soporte (Selvakumar y col., 1996).

Entre los diferentes factores que son importantes para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas con un sustrato en particular, el tamaño de partícula, el contenido de humedad y a_w son los más críticos. Generalmente, las partículas

pequeñas proveen un área superficial mayor para el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, las partículas de substrato excesivamente pequeñas se pueden aglutinar, lo que puede interferir con la aireación y con la respiración del microorganismo dando como resultado un crecimiento deficiente. En contraste, partículas grandes permiten que los microorganismos tengan una aireación mayor, por el aumento en los espacios interparticulares, pero proporcionan una superficie limitada para el crecimiento microbiano. Una manera de mejorar la relación área-volumen es mediante el uso de materiales con un tamaño de partícula reducido, que puedan proporcionar un medio con una geometría definida (Pandey y col., 1999).

Residuos agroindustriales como soportes naturales

Los residuos agroindustriales son los substratos/soportes más utilizados en FMS (Pandey y col., 1999). La selección del soporte es crítica y repercute sobre el éxito de la FMS, esta selección involucra la búsqueda de materiales agrícolas adecuados para el crecimiento microbiano. Además la formación del producto de interés, depende de la disponibilidad del soporte, su composición y del tipo de microorganismo y productos involucrados. El pretratamiento del soporte (mecánico o químico), se emplea para facilitar el crecimiento microbiano y pueden incluir cocción al vapor, inmersión en agua, molido, tamizado, etc, y tratamientos con álcali o ácido. Algunas veces se enriquece el substrato con vitaminas y oligoelementos (Pandey y col., 1999).

Este tipo de substratos sólidos son procesados de manera parcial y son estructural y nutricionalmente complejos, con lo que la caracterización del soporte es prácticamente imposible y también puede interferir con la reproducibilidad del proceso. La presencia de mezclas de componentes de alto y bajo peso molecular, puede ocasionar patrones complejos de inducción, represión e inhibición en la regulación del metabolismo microbiano.

La estructura básica de los soportes/substratos son macromoléculas que sirven también como fuente de carbono y energía, la asimilación de estas

macromoléculas requiere la síntesis y excreción de enzimas por parte de los microorganismos. La naturaleza de este tipo de sustratos tiene como consecuencias:

- (a) La masa del sustrato no está uniformemente distribuida en el espacio, pero contiene espacios vacíos entre las partículas que se pueden llenar con una fase gaseosa o líquida, esto ocasiona que no se puedan realizar algunas determinaciones, como por ejemplo la determinación del pH.
- (b) El manejo de los sólidos requiere equipo especializado. La dinámica de los sólidos es compleja y poco entendida. La mezcla de los sólidos durante la fermentación requiere el diseño de reactores y agitadores especiales, para prevenir la compactación del soporte.
- (c) El crecimiento microbiano está restringido a la superficie del soporte por la disponibilidad de oxígeno debido a que los soportes limitan la transferencia de oxígeno. El efecto del microorganismo se limita a la superficie del soporte, lo que ocasiona la formación de gradientes de sustratos, productos, pH, etc. (Mitchell y Lonsane, 1992).

Soportes inertes

El uso de materiales nutricionalmente inertes en FMS facilita un adecuado diseño de medios de cultivo, monitoreo de los parámetros del proceso, diseño de estrategias de escalamiento y varios aspectos de ingeniería, que son difíciles o casi imposibles de medir en una FMS, cuando se emplean sustratos orgánicos. Los materiales inertes impregnados con un medio de cultivo adecuado proporcionan una condición aeróbica homogénea en el fermentador y no contribuyen con impurezas al producto final (Gautam y col., 2002). Una ventaja adicional del uso de soportes inertes es la fácil recuperación del producto de interés, la facilidad de realizar balances debido a que todas las concentraciones de nutrientes en el medio de producción son conocidas, por lo que se puede estudiar el efecto de determinado componente del medio de cultivo. Los soportes inertes

más utilizados en FMS incluyen espuma de poliuretano, poliestireno, amberlita, vermiculita, perlas de vidrio (Ooijkaas y col., 2000).

2.1.4 Factores ambientales que influyen sobre el crecimiento y metabolismo microbiano en FMS

El crecimiento de los hongos filamentosos en FMS depende esencialmente de la composición del soporte y/o medio de cultivo (tipo y concentración de nutrientes) y de las condiciones de operación (temperatura, humedad, pH, aireación, etc.). (Gervais y col., 1996). A continuación se enumeran los parámetros principales que afectan el crecimiento y metabolismo de los hongos filamentosos en FMS.

2.1.4.1 Concentración de la fuente de carbono

En FMS la producción de enzimas se estimula empleando elevadas concentraciones de azúcares, lo que a su vez puede estar relacionada con los patrones de mezclado y difusión de nutrientes (Solís-Pereira y col., 1993; Al-Asheh y Duvnjak, 1994). Por ejemplo, cuando se crece *Penicillium chrysogenum* en FMS utilizando un soporte inerte, se necesita de un medio relativamente concentrado, con respecto a la fermentación líquida para un crecimiento adecuado. Así mismo, *A. niger* puede utilizar eficientemente concentraciones elevadas de sustrato (> 100 g/L) cuando crece sobre soportes inertes (Balakrishnan y Pandey, 1996).

2.1.4.2 Contenido de humedad y actividad de agua (a_w)

El crecimiento de los microorganismos ocurre en la fase líquida, la transferencia de solutos y gases ocurren en la película acuosa que rodea al microorganismo, así aun en FMS el microorganismo está en un medio líquido. El agua es la única molécula que puede intercambiarse a través de la membrana, el intercambio es esencialmente pasivo de acuerdo al gradiente de presión osmótica (Gervais y col., 1996).

Los roles del agua en los sistemas biológicos son numerosos y los mecanismos de acción e interacción de la molécula de agua con moléculas orgánicas no está

completamente aclarado, pudiéndose distinguir dos funciones fundamentales (Gervais y col., 1996):

- De solvente, que se observa tanto a nivel del microorganismo como celular, tiene como finalidad proveer de nutrientes y extraer los residuos o metabolitos en forma disuelta.
- Estructural, que está implicada en la estabilidad y función de las estructuras organizadas, se observa a nivel molecular y celular. A nivel molecular el agua tiene un papel en la estabilización de la estructura de los biopolímeros, proteínas, nucleótidos y carbohidratos. A nivel celular el agua está involucrada en la estabilización de la estructura laminar de la membrana plasmática y en la preservación de la permeabilidad de la misma.

Por otro lado, el potencial de agua es un concepto ampliamente aceptado para cuantificar el estado de energía del agua en substratos orgánicos. En cualquier sistema el agua fluye de potenciales elevados hacia potenciales menores y su disponibilidad para los procesos fisiológicos decrece conforme el potencial se reduce. En FMS hay dos componentes principales involucrados en el potencial de agua: el potencial mátrico y el osmótico, el primero incluye adsorción y efectos capilares, el segundo está determinado por la concentración y propiedades polares de los solutos. Los efectos de estos dos potenciales están involucrados en la actividad microbiana (Gervais y col., 1988).

Los procesos que afectan la distribución de agua son la absorción y la transferencia intraparticular del agua libre, la distribución óptima se alcanza cuando el agua libre presente en la superficie del soporte se distribuye rápidamente en el lecho (Schutyser y col., 2003). El contenido de humedad es uniforme en todo el lecho al inicio del proceso, pero lentamente se pueden desarrollar gradientes debidos al consumo del substrato, evaporación del agua, etc (Raghavarao y col., 2003).

Se pueden observar dos fenómenos relacionados con la falta de agua en un soporte:

- Si la cantidad de agua en el soporte es insuficiente, no existe una buena difusión de los solutos y gases, ocasionando una reducción en el metabolismo celular o en un caso extremo su interrupción, esto debido a la falta de substrato o al incremento en la concentración de inhibidores en los alrededores del microorganismo.
- Si la cantidad de agua intra o extracelular no es suficiente para mantener las propiedades de algunas enzimas, estas se inactivarán desequilibrando la cadena metabólica de las células.

De la misma forma, si la transferencia de agua induce el estrés hídrico, permitiendo la desnaturalización de la estructura mecánica de la membrana plasmática, todas las propiedades de permeabilidad y transporte a través de la misma se ven afectadas, pudiendo perturbar a la célula (Gervais y col., 1996).

Las condiciones hídricas óptimas requieren una ligera diferencia en el potencial de agua entre el medio interno del microorganismo y el medio de cultivo. Cuando la célula se coloca en condiciones diferentes de potencial de agua, para prevenir la salida pasiva de agua, adapta el potencial de agua en su interior, sintetizando solutos compatibles como azúcares y polioles o facilitando la difusión de solutos (Gervais y col., 1988).

En FMS el agua esta involucrada en la producción de la biomasa y en reacciones metabólicas, actividades enzimáticas, y en el transporte de nutrientes extracelulares y de gases. El contenido de agua es considerado óptimo en la saturación del soporte, las principales causas de la variación en el contenido de humedad son: la evaporación debida al calor metabólico liberado, a la hidrólisis del substrato y la producción metabólica de agua (Bellon-Maurel y col., 2003).

Un contenido de humedad elevado compacta el substrato limitando la difusión de oxígeno y facilita la contaminación bacteriana, por otro lado un contenido de humedad bajo inhibe el crecimiento microbiano, la actividad enzimática y el acceso del microorganismo a los nutrientes (Oriol y col., 1988; Pandey. 1992; Pandey y col., 1999; Lonsane y col., 1992). Con contenidos de humedad elevados o reducidos, la velocidad de descomposición de la materia orgánica disminuye

(Gautam y col., 2002). El contenido de humedad del soporte se puede controlar manteniendo la atmósfera gaseosa en el fermentador con una humedad relativa de 90 a 97 %. El control del contenido de humedad del soporte es el factor clave en el control del espesor de la capa de micelio húmedo y para asegurar condiciones aeróbicas durante la FMS (Oostra y col., 2001). Así mismo durante el curso de la fermentación, la capacidad de retención de agua del soporte cambia: la masa del substrato disminuye, la actividad de agua varía debido al agotamiento de los nutrientes, la composición química del substrato cambia (Gervais y col., 1996).

El contenido de humedad afecta el crecimiento celular y la actividad específica de las enzimas en formas opuestas lo que sugiere la posibilidad de incrementar los rendimientos celulares o enzimáticos regulando el contenido de humedad durante la fase de crecimiento y estacionaria, para obtener los niveles deseados de biomasa y de producción enzimática respectivamente (Narahara y col., 1984).

El concepto de actividad de agua (a_w) se emplea para describir el equilibrio entre un sistema heterogéneo y la fase de vapor de agua que lo rodea (Gervais y col., 1996; Gervais y Molin, 2003). El tipo de microorganismos que pueden crecer en FMS esta determinado por la actividad de agua, se debe resaltar que durante el crecimiento en FMS actividades de agua elevadas favorecen la esporulación, por otro lado con valores bajos de actividad de agua se favorece el crecimiento micelial junto con la esporulación. La actividad de agua del medio es un parámetro fundamental en la transferencia de masa del agua y de los solutos a través de la membrana celular. El control de este parámetro puede ser usado para modificar la producción metabólica de los microorganismos. La regulación de la actividad de agua del soporte se puede llevar a cabo controlando la humedad relativa del aire (Pandey, 1992). La actividad de agua se incrementa regularmente durante la fermentación hasta alcanzar un valor cercano a uno, esto puede ser el resultado de dos fenómenos: un incremento en el contenido de agua del micelio y un decremento en el agua residual del substrato (Oriol y col., 1988). El control de la

actividad de agua se puede emplear para modificar la producción de algún metabolito o producto (Oriol y col., 1988; Pandey, 1992).

En FMS la actividad de agua del medio afecta la geminación de la espora, el crecimiento vegetativo, la conidiación y la síntesis enzimática o de metabolitos secundarios (Pandey y col., 1994), esto debido a que este parámetro altera el potencial de agua que existe entre el medio y el soluto intracelular, el cual se debe mantener para permitir el ingreso de agua a las células (Larroche, 1996), también es importante en las biorreacciones que involucran el transporte de oxígeno y de vapor de agua hacia el microorganismo. La reducción en la actividad de agua del substrato puede ocasionar poca transferencia de masa y reducir la disponibilidad de agua para el microorganismo, pudiendo ocasionar una conversión incompleta del substrato a biomasa (Oriol y col., 1988; Pandey y col., 1994), por otro lado un incremento en la actividad de agua del substrato causa un incremento en la tasa específica de crecimiento y reduce el tiempo de germinación de las esporas, valores elevados de actividad de agua incrementan la conversión de substrato a biomasa (Oriol y col., 1988).

Como ejemplos tenemos que con un contenido de humedad elevado se reduce la producción de α -amilasa (Pandey, 1992), en una fermentación de Koji. El contenido de humedad del soporte disminuye considerablemente cuando la masa celular se incrementa, así mismo, el incremento en el contenido de humedad del soporte incrementa el crecimiento celular y suprime la producción de proteasas ácidas, manteniendo constante la producción de α -amilasa por *Aspergillus oryzae*. Contenidos de humedad por encima del 30 %, con arroz como substrato influyen sobre la producción de proteasas ácidas (Narahara y col., 1984). Para la fitasa producida por *A. ficuum* y *R. oligosporus* en FMS sobre soporte inerte la máxima producción enzimática se alcanza con un contenido de humedad de 58.3 %, cualquier incremento en el valor de la humedad inicial reduce la producción enzimática (Gautam y col., 2002). El contenido de humedad más favorable para la producción enzimática por *A. sulphureus* estuvo en el intervalo de 40 a 50 %, y la actividad de agua para la biosíntesis de xilanasas estuvo en el intervalo de 0.93 a

0.96 (Lu y col., 2003). Con valores iniciales elevados de actividad de agua la actividad enzimática de la glucoamilasa, producida por *A. niger*, es elevada, así mismo, con valores bajos de actividad de agua, los rendimientos se incrementan hasta el final de la fermentación (Pandey y col., 1994).

2.1.4.3 Atmósfera gaseosa

Un lecho sólido es mas difícil de mezclar efectivamente, consecuentemente el suplemento de oxígeno y la remoción de calor son restringidos (Marsh y col., 1998), es por esto que la cantidad de aireación requerida depende del espesor del lecho y de la naturaleza del substrato. En el caso de substratos fibrosos hay muchos espacios vacíos entre las partículas y se facilita la aireación, para substratos finamente molidos, hay pocos espacios vacíos y la aireación se dificulta debido a la compactación excesiva del soporte, en estos casos la aireación parece ser un factor muy relevante que influye en la productividad en FMS. Para el caso particular de la invertasa, el incremento en la aireación resulta en una mayor producción. La velocidad de aireación influye en el crecimiento del microorganismo, la producción de metabolitos volátiles y la liberación de calor metabólico (Lonsane y col., 1992). La aireación es importante en FMS debido a que:

- Aporta el oxígeno necesario para el crecimiento y metabolismo aeróbico.
- Regula la temperatura del lecho.
- Remueve el vapor de agua, CO₂ y metabolitos volátiles producidos durante el metabolismo (Lonsane y col., 1992).

En medios discontinuos (aglomerados de partículas) de elevada porosidad en contacto con una fase gaseosa, el crecimiento se limita por la difusión de los nutrientes que sólo pueden difundir en la delgada capa acuosa que rodea al microorganismo, pudiendo limitarse el crecimiento por la acumulación de metabolitos en esta capa (Nakadai y Nasumo, 1988). Por otra parte aun con elevadas concentraciones de biomasa, la continuidad de la fase gaseosa no se ve afectada, esto se puede atribuir al crecimiento en forma de red presentado por el

micelio (Auria y col., 1995). El control de la composición de la fase gaseosa en FMS es la única manera práctica de regular la transferencia gaseosa, que asegure la asimilación de oxígeno y la remoción de CO₂ (Narahara y col., 1984).

La medición de las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono es importante para monitorear la velocidad respiratoria, la velocidad de actividad biológica y el estado biológico del sistema. El oxígeno se mide usando el principio de paramagnetismo, debido a que el oxígeno es el único gas paramagnético encontrado en FMS. Un detector paramagnético está basado en las propiedades paramagnéticas de la molécula de oxígeno, en un campo magnético, la molécula actúa como un dipolo moviéndose y orientándose de acuerdo con este, el flujo de moléculas de oxígeno cambia el equilibrio térmico de una resistencia y subsecuentemente la corriente en el puente wheatstone. El CO₂ se mide por absorción infrarroja (Bellon-Maurel y col., 2003).

Muchos parámetros operacionales así como las características del medio pueden afectar la velocidad de transferencia de oxígeno, entre lo que se puede incluir la porosidad del substrato, la presión y velocidad del aire de entrada, la profundidad del lecho, la presencia de orificios en el reactor, contenido de humedad del soporte, etc (Lonsane y col., 1992). La concentración de oxígeno en FMS inicia en niveles óptimos, para decrecer hasta valores bajos debidos a las limitaciones en la transferencia de masa, especialmente cuando el contenido de humedad del soporte es elevado, debido a la rápida respiración del microorganismo, o a densidades elevadas de biomasa. (Ikasari y Mitchell, 1998b).

Una forma de incrementar el crecimiento aeróbico es incrementar el área interfacial gas-micelio. Lo que se consigue reduciendo el tamaño de partícula del soporte (Oostra y col., 2001). Con elevadas presiones de oxígeno se obtienen altos rendimientos enzimáticos, lo que sugiere la existencia de un requerimiento estricto de oxígeno para la síntesis de enzimas en el metabolismo asociado al crecimiento. También es posible que con elevadas presiones parciales de oxígeno, se incremente la profundidad de la capa de crecimiento aeróbico (Bajracharya y Mudgett, 1980). También la presión parcial de oxígeno tiene efecto

sobre los parámetros morfológicos, como el número de ramificaciones o la longitud de la hifa. En el caso de *A. nidulans* sólo se observan cambios en su morfología con bajos niveles de oxígeno. De la misma forma, el crecimiento de especies de *Aspergillus* se puede alterar por cambios en la composición de la atmósfera gaseosa, pero su efecto es más acentuado si este cambio se combina con modificaciones en la a_w y/o temperatura (Gervais y Bensoussan, 1994).

El CO_2 también es benéfico para el crecimiento de varios basidiomicetos (Lavonen-Muñoz y Bone, 1985). Por otro lado el CO_2 y el HCO_3^- son capaces de inhibir la velocidad de crecimiento, y el rendimiento celular, esta inhibición parece ser una función compleja del CO_2 disuelto y del HCO_3^- presente en la fase acuosa (Ho y Smith, 1986). Para el caso particular de *A. niger* con concentraciones bajas de oxígeno (< 3 %) y elevadas de CO_2 (8-16 %) se reduce el nivel de amiloglucosidasa prolongando la duración de la fermentación, en FML, por otro lado la producción de amilasa por *A. oryzae* se inhibe con concentraciones de CO_2 superiores al 2 % (Ikasari y Mitchell, 1998a). De manera general la producción de proteasas ácidas se incrementa con una concentración de CO_2 de 4 % (v/v), lo que se relaciona directamente con la actividad metabólica (Pandey y col., 1999).

2.1.4.4 Temperatura

Durante la FMS la temperatura del sistema aumenta debido a la liberación de calor metabólico, el incremento en la temperatura es directamente proporcional a la profundidad del lecho y a la actividad metabólica del microorganismo involucrado. De manera general 1 Kg de materia orgánica (celulósica) cuando se consume en FMS produce en promedio 14,900 BTU (3754 Kcal) y 0.547 Kg de agua. Parte de este calor se emplea para evaporar el agua producida durante el metabolismo, el resto se disipa. El calor debe ser disipado conforme se libera de otra forma afecta la productividad y en casos extremos puede ocasionar la muerte del microorganismo (Durand y col., 1996).

Aun cuando en la práctica es usual que la FMS se lleve a cabo bajo condiciones no tan rigurosas de esterilidad, en algunos casos es necesario desarrollar

procesos asépticos, la esterilización del sustrato junto con el reactor por calor húmedo, es difícil debido principalmente al bajo contenido de humedad del soporte, por tal motivo el tiempo de esterilización requerido en estos casos es mayor que el requerido para la FML, la exposición prolongada del soporte al calor durante la esterilización, puede alterar su composición y propiedades fisicoquímicas, dañar algunos nutrientes o condicionar la aparición de compuestos tóxicos. De forma práctica el aire y el agua empleada en la humidificación se pueden esterilizar por filtración o por luz ultravioleta, para el reactor una alternativa viable es la esterilización química o desinfección, para lo cual se emplean soluciones alcohólicas o de formaldehído (Durand y col., 1996).

La estabilidad de las enzimas se incrementa sensiblemente bajo condiciones de baja humedad, haciendo posibles biotransformaciones a temperaturas más elevadas que las empleadas en soluciones acuosas normales. En otras palabras la temperatura a la cual se desnaturaliza una proteína depende de la cantidad de agua asociada a la molécula. Esto explica la mayor estabilidad de las enzimas obtenidas por FMS en comparación con las obtenidas por FML (Turner y Vulfson, 2000).

2.1.4.5 pH

El pH del medio es un factor importante en los procesos fermentativos, influye sobre el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos. Un pH bajo generalmente provoca un crecimiento pobre y variaciones en el rendimiento enzimático (Gautam y col., 2002). Las variaciones en el pH resultan del consumo del sustrato y/o producción de metabolitos e indica cambios en la actividad metabólica (Bellon-Maurel y col., 2003).

En FMS la medición y regulación del pH, no se pueden efectuar de manera directa, debido principalmente a que en este tipo de procesos no se pueden emplear los electrodos de pH por la falta de agua libre, sin embargo, se puede obtener cierto control mediante la combinación de fuentes de nitrógeno o esparciendo soluciones amortiguadoras de pH durante la fermentación. Por otro

lado, el uso de amortiguadores puede resultar una alternativa viable pero incrementa la concentración de sales en el medio disminuyendo la a_w . En algunos estudios específicos se pueden emplear amortiguadores sintéticos no asimilables por el microorganismo, pero esto incrementa el costo final del estudio. Otra alternativa viable, para controlar el pH es la adición de fuentes de nitrógeno conforme se consume este nutriente (Durand y col., 1996).

2.2 *Aspergillus niger*

Todos los hongos se encuentran contenidos en el phylum Mycota. Su clasificación es con base a las características de sus esporas sexuales y cuerpos fructificantes presentes en sus ciclos biológicos. Aunque muchos hongos sólo producen esporas sexuales y cuerpos fructificantes bajo ciertas condiciones del medio, existen otros que no las producen. Así los ciclos de vida completos o perfectos de muchos hongos no se conocen. En consecuencia los hongos descritos como imperfectos se clasifican con base a características diferentes en los estadios sexuales. Este tipo de hongos (imperfectos) se ha colocado provisionalmente en una clase especial llamada Deuteromycetes (Smith y .Pateman, 1977).

El género *Aspergillus* pertenece a los deuteromycetes. Sus hifas vegetativas tabicadas crecen en el substrato o por encima del mismo. A intervalos la célula se ramifica y extiende al aire las hifas o conidióforos fecundos cuyo extremo aumenta de tamaño para formar vesículas en donde están dispuestos de manera radial numerosos esterigmas. Cada uno de ellos sustenta una cadena de conidios. (Samson, 1992; 1994).

Aspergillus niger tiene conidióforos lisos y pigmentados debajo de la vesícula, vesícula esférica, generalmente de color negro, mentula presente o ausente frecuentemente pigmentada, cabeza conidial típicamente radiada, conidios negros (Smith y Pateman, 1977; Samson, 1994).

Las especies de *Aspergillus* pertenecen a los primeros organismos que fueron cultivados en un medio sintético, para estudiar sus propiedades bioquímicas (Samson, 1994). El género *Aspergillus* ha sido reconocido como componente

fúngico de nuestro ambiente, crece en una gran variedad de sustratos bajo diferentes condiciones ambientales. Se localiza en suelos, granos almacenados, vegetales en descomposición entre otros sustratos (Samson, 1994; Arora y col., 1991; Klich y Bennet, 1992)

Las especies de *Aspergillus* son de las más comunes en el ambiente humano. Algunas son patógenos para el hombre o animales y producen metabolitos secundarios dañinos como aflatoxinas que contaminan alimentos, otras son de importancia industrial (Decker y col., 2000; Samson, 1994). Abundan en regiones tropicales y subtropicales. Junto con el género *Penicillium*, son los géneros dominantes en productos almacenados (Kozakiewicz y Smith, 1994).

2.2.1 Factores que influyen sobre su crecimiento y metabolismo

Por ser un hongo filamentoso se ve influenciado en su crecimiento y metabolismo por factores externos como temperatura, pH, contenido de humedad, y composición de la atmósfera gaseosa. La actividad de agua puede afectar la germinación de diferentes maneras:

- La duración de la fase lag después de la germinación.
- La velocidad de extensión del tubo germinal.

El valor mínimo de actividad de agua para el crecimiento de *A. niger* se encuentra en el intervalo de 0.74-0.85, y su valor óptimo es de 0.98. Por otro lado, a mayoría de los hongos son mesófilos, crecen con temperaturas que oscilan entre los 10 y 40 °C. El género *Aspergillus* típicamente crece bien a temperaturas entre los 15 y 30 °C, sin embargo algunas especies crecen fuera de este intervalo. Para *A. niger* el intervalo de temperatura para su crecimiento esta entre 9 y 60 °C, con un óptimo en el intervalo de 17 a 42 °C. También los hongos filamentosos son capaces de crecer en un intervalo amplio de pH (4-8). Así mismo en FMS es difícil controlar el pH debido a que el crecimiento fúngico ocasiona cambios en él, estos cambios pueden afectar marcadamente los procesos metabólicos por la modificación en los límites de actividad de agua, a la cual ocurre el crecimiento y germinación. *A. niger* puede crecer en un intervalo de pH de 1.5 a 9.8. En cuanto a

la composición de la atmósfera gaseosa, las especies de *Aspergillus* pueden ser alteradas en su crecimiento por cambios en las concentraciones de CO₂ y O₂. Para que la germinación y el crecimiento micelial cesen, se deben incrementar los niveles de CO₂ y reducir los de O₂, sin embargo este efecto es más marcado si los niveles de actividad de agua y temperatura también interactúan (Kozakiewicz y Smith, 1994).

2.2.2 Productos industriales del género *Aspergillus*

Los principales productos que se pueden obtener a partir del género *Aspergillus* son:

- Alimentos fermentados
- Koji
- Proteína unicelular
- Ácido cítrico
- Micotoxinas
- Enzimas entre las que destacan: amilasas, ligninasas, proteasas, pectinasas, lipasas, glucoamilasa etc (Kozakiewicz y Smith, 1994).

En los países asiáticos se ha usado en fermentaciones de alimentos por cientos de años a *A. niger*, también se ha empleado subsecuentemente en la producción biotecnológica de ácidos orgánicos. En adición, este hongo se ha estudiado en función de su habilidad para producir enzimas extracelulares como pectinasas o celulasas que pueden utilizarse fácilmente en la industria de alimentos (Decker y col., 2000).

2.3 INVERTASA

La sacarosa comúnmente conocida como azúcar de cocina, es un disacárido compuesto por una molécula de α -D-Glucosa y una de β -D-Fructosa unidas por un enlace glucosídico α -1,4, cuando este enlace se rompe en una reacción de hidrólisis se genera una mezcla equimolar de glucosa y fructosa denominada

azúcar invertido (Rubio y Maldonado, 1995). La sacarosa se hidroliza por la acción de una enzima llamada invertasa o sacarasa (β -Fructofuranosidasa, E.C.3.2.1.26). La enzima hidroliza la porción terminal no reductora de los enlaces β -Fructofuranosidos y se puede emplear para la ruptura de disacáridos y trisacáridos (Arora y col., 1991).

2.3.1 Microorganismos productores

Un amplio intervalo de microorganismos producen invertasa y pueden utilizar la sacarosa como fuente de carbono; comercialmente la enzima es sintetizada por cepas de levaduras y por algunos hongos (Rubio y Maldonado, 1995). Entre las levaduras que producen invertasa tenemos: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlbergensis* (Zech y Görish, 1995), *S. occidentales* (Mátrai y col., 2000), *S. pombe*, *Torulaspora pretoriensis*, *Pichia anomala*, *Candida utilis* (Rubio y Maldonado, 1995). Entre los hongos productores de invertasa tenemos: *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* (Arora y col., 1991; L'Hocine y col., 2000), *Fusarium sp.*, *Aureobasidium sp.* (Chen y Liu, 1996). En hongos se han observado dos patrones contrastantes en la producción de invertasa:

1. El constitutivo, la actividad enzimática se incrementa de manera continua con el tiempo y es mayor en el micelio cuando se completa el crecimiento y la fuente de carbono se ha agotado. Este patrón fue explicado con base en una porción mayor de invertasa que está distribuida en el espacio intramural, el aumento en la actividad enzimática refleja la cantidad del material de la pared celular que envejece.
2. La inducción de la actividad de la invertasa, muestra una relación inversa con la cantidad de biomasa y la desaparición de la fuente de carbono (Chaudhuri y col., 1999).

Se ha identificado la presencia de invertasa en bacterias como *Azotobacter choococcum* (De la Vega y col., 1991), en plantas como la caña de azúcar (Vorster y Botha, 1998), y en setas (Mukherjee y Sengupta, 1985).

De todas estas, la invertasa producida por levaduras es la más estudiada ya que se conoce desde el siglo XIX (Arora y col., 1991).

2.3.2 Características

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce invertasa interna y externa. La función de la forma interna no se conoce. La invertasa externa está muy glucosidada y reside en el espacio periplásmico. La enzima esta compuesta por una cadena polipeptídica de 60,000 Daltons. que está enlazada a unidades de oligosacáridos heterogéneos, dando como resultado una subunidad de aproximadamente 75,000 Daltons. La invertasa periplásmica nativa es oligomérica encontrándose principalmente como dímeros, tetrámeros y octámeros. Se sabe que la glucosidación estabiliza a la proteína con respecto a la desnaturalización térmica y es necesaria para la oligomerización de los tetrámeros y octámeros (Vorster y Botha, 1998; Zech y Görish, 1995; Chávez y col., 1997).

En contraste con la mayoría de las enzimas, la invertasa exhibe una actividad relativamente alta en un intervalo amplio de pH (3.5-5.5), con un óptimo cercano a 4.5, y con una temperatura cercana a 55 ° C (Romero y col., 2000; Rubio y Maldonado, 1995). El valor de la constante de Michaelis-Menten para la invertasa varía ampliamente, pero en general se encuentra entre 2 mM y 5 mM usando sacarosa como sustrato (Romero-Gómez y col., 2000; Rubio y Maldonado, 1995).

Una forma para obtener invertasa de *S. cerevisiae*, es por medio de su crecimiento sobre melazas de remolacha, que contienen grandes cantidades de sacarosa. La levadura por medio de la invertasa periplásmica rompe la sacarosa en glucosa y fructosa que emplea como fuente de carbono (Arora y col., 1991; Zech y Görish, 1995). En este tipo de sistemas para remover la enzima se emplean solventes orgánicos, con una purificación posterior para remover sabores indeseados originados por el medio de cultivo (Arora y col., 1991).

El uso de invertasa es principalmente en la industria de alimentos en la rama de confitería, donde se prefiere la fructosa sobre la sacarosa, debido a que la primera

es más dulce y no cristaliza tan rápido. Sin embargo, el uso de la invertasa es limitado debido a que la glucosa isomerasa puede convertir glucosa en fructosa de manera más económica (Rubio y Maldonado, 1995). La enzima también se usa en la fabricación de edulcorantes artificiales, en la industria farmacéutica (L'Hocine y col., 2000) en la obtención de fructooligosacáridos (Chen y Liu, 1996; Nguyen y col., 1999) y la producción de esta enzima, se ha propuesto como un método de detección rápido de contaminación fúngica en semillas almacenadas (Mátraí y col., 2000)

La cinética de producción de invertasa por hongos filamentosos en fermentación sumergida, se ha estudiado extensamente, sin embargo, hay pocos reportes comparativos de la producción de invertasa en FMS y FML (Romero-Gómez y col., 2000; Ashok y col., 2001). Se ha estudiado la invertasa fúngica inmovilizada en varios tipos de reactores para la producción de mezclas comerciales de azúcares provenientes de substratos agrícolas (Arora y col., 1991).

2.4 ANTECEDENTES DIRECTOS

El presente trabajo tiene como antecedentes directos los trabajos de Favela-Torres y col. (1997), que determinan las cinéticas de crecimiento para una cepa de *Aspergillus niger* en tres sistemas de cultivo diferentes, cajas Petri, FML y FMS, utilizando en ésta última un soporte inerte, empleando concentraciones elevadas de glucosa como fuente de carbono. Ellos demostraron que en FMS el crecimiento de este microorganismo se veía favorecido por el incremento de fuente de carbono en el medio. Por otro lado, Solís-Pereira y col. (1993, 1996), evaluaron el efecto de emplear elevadas concentraciones de glucosa sobre la producción de pectinasas en FMS con un soporte natural, mostrando que la producción enzimática se incrementaba conforme aumentaba la concentración de glucosa en el medio de cultivo. Recientemente, Romero-Gómez y col. (2000), demostraron que la producción de invertasa es mayor en un sistema de FMS con espuma de poliuretano como soporte inerte, en comparación de la FML, empleando elevadas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo.

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

1. El crecimiento y metabolismo de *Aspergillus niger* no se ve afectado por el incremento en la concentración de la fuente de carbono en FMS.
2. La producción de enzimas es menos reprimida por la concentración de la fuente de carbono en FMS en comparación de la FML, así mismo la producción enzimática en la primera es mayor.
3. El empleo de soportes nutricionalmente inertes permite la determinación de parámetros de interés de manera directa, biomasa, consumo de sustrato, parámetros cinéticos etc.

3.1 JUSTIFICACIÓN

Las citas anteriores reportan el efecto aislado de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de los microorganismos y la producción enzimática, (concentración y tipo de fuente de carbono, el contenido de humedad del soporte, actividad de agua, composición de la atmósfera gaseosa, etc), sin embargo, en éstas no se hace mención de los parámetros cinéticos y estudian el efecto de alguna condición de cultivo fijando el resto en valores que son considerados como óptimos.

Es por esto que en este trabajo se pretende evaluar el efecto combinado de dos condiciones de cultivo, por un lado la concentración de fuente de carbono junto con el contenido de humedad del soporte y, por otro, el efecto del incremento de la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa en combinación con el contenido de humedad del soporte.

La selección del sistema para la producción de invertasa por *Aspergillus niger*, para el estudio de la combinación de condiciones de cultivo enumeradas se basó en los siguientes hechos:

- *Aspergillus niger* es una de las especies de hongos filamentosos que más se emplean en la producción de enzimas y de metabolitos secundarios de alto valor agregado, por FMS, tanto a nivel industrial como en laboratorio. Además es un microorganismo modelo muy utilizado para el estudio del crecimiento y la secreción de enzimas por hongos filamentosos.
- La invertasa es una enzima modelo muy adecuada para el estudio de la producción y secreción enzimática. Ha sido estudiada a profundidad durante los últimos años, se conoce la secuencia completa de los dos genes que codifican para esta enzima en *Aspergillus niger* y se conoce también que en condiciones normales sólo se expresa uno de estos genes.
- Debido a la naturaleza del poliuretano, que es nutricionalmente inerte para los microorganismos su uso facilita el estudio de parámetros cinéticos y la medición de la biomasa, además se ha reportado su uso para la producción enzimática.

3.2 HIPÓTESIS

La producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido empleando espuma de poliuretano como soporte será directamente proporcional a la concentración de azúcar empleada como fuente de carbono si y sólo si el contenido de humedad del soporte es reducido.

La producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido empleando espuma de poliuretano como soporte, será afectada sensiblemente por la composición de la atmósfera gaseosa.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 GENERAL

Evaluar el crecimiento de *Aspergillus niger* y la producción de invertasa en fermentación en medio sólido con altas concentraciones de fuente de carbono utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte.

3.2.2 PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del pH, y temperatura sobre la actividad de la invertasa, para determinar las condiciones de reacción a emplearse en este trabajo
2. Evaluar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de *A. niger* y la producción de invertasa en FMS.
3. Evaluar el efecto de la concentración de fuente de carbono y la humedad inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento de *A. niger* y la producción de invertasa en FMS.
4. Evaluar el efecto de la composición de la atmósfera gaseosa sobre el crecimiento de *A. niger* y la producción de invertasa en FMS.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Microorganismo. Se empleó la cepa de *Aspergillus niger* C28B25 conservada en sílica gel (Loera y col., 1999). Esta cepa ha sido reportada en estudios previos de producción de invertasa (Romero-Gómez., 2001, Montiel-González y col., 2002). La propagación se llevó a cabo en tubos inclinados con agar papa dextrosa (PDA), los cuales se incubaron a 30 ° C por siete días. Para la resiembra de la cepa se partió de un tubo inclinado al que se le agregaron 5 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05 % (v/v), homogeneizándose con un vórtex, tomando alícuotas de 1 mL para inocular matraces Erlenmeyer con 50 mL de PDA estéril, los cuales se incubaron a 30 ° C por siete días.

Las esporas se cosecharon agregando a los matraces Erlenmeyer 30 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05 % (v/v) por matraz, y agitando con una barra magnética para suspender las esporas. Para el conteo de esporas, se tomó una alícuota de 1mL la cual se diluyó 1:20 con agua destilada. Las esporas se cuantificaron por medio de una cámara de Neubauer. Cada fermentación se inoculó con una suspensión de esporas con una concentración de 1×10^7 esporas por gramo de soporte seco.

4.2. Medio de cultivo. Para preparar los medios de cultivo con concentraciones iniciales de sacarosa de 100 a 400 mg/g s.s. Se utilizó la composición del medio Pontecorvo con 0.05 % de extracto de levadura (ATCC 687) concentrado 16.6 veces, la composición del medio Pontecorvo modificado (MPm) se detalla en la tabla 1. Como fuente de nitrógeno se empleó nitrato de sodio o sulfato de amonio. La concentración final de la sal fue equivalente a 2.70 g de nitrógeno por litro de medio de cultivo.

Tabla 1 Composición del medio Pontecorvo modificado (MPm)

Componente	Cantidad (g/L)
Nitrógeno	2.70
KH ₂ PO ₄	25.33
KCl	8.67
MgSO ₄ 7H ₂ O	8.67
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.02
FeCl ₃ *6 H ₂ O	0.01
Sacarosa	500
Extracto de levadura	8.33
Metales traza	1 mL

Metales traza

Metal	Cantidad (g/L)
Na ₂ B ₄ O ₇ * 10H ₂ O	1.67
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0.83
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.83
CuSO ₄ * 5H ₂ O	4.17

Para la preparación de la solución de elementos traza, los elementos se disolvieron en 850 mL de agua destilada, posteriormente se ajustó el pH a 3.5 con una solución de ácido clorhídrico al 10 % (v/v) y finalmente se aforó a 1 L con agua destilada.

Para la preparación del medio de cultivo se disolvieron cada una de las sales en 500 mL de agua destilada, después se disolvió el extracto de levadura y finalmente la sacarosa. El pH del medio se ajustó a 3.5 con una solución de ácido clorhídrico 10 % (v/v). Por último el medio se aforó a 1 L con agua destilada y se le adicionó 1 mL de la solución de metales traza.

Para la preparación de los medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa y humedad se utilizó, como medio basal el reportado en la tabla 1, diluyendo con agua destilada para obtener la concentración de sacarosa y humedad inicial determinadas.

4.3. Soporte. Como soporte se utilizó espuma de poliuretano (PUF) con una densidad media de 24 Kg/m^3 la cual, una vez cortada en fragmentos pequeños se lavó tres veces: dos con agua corriente y una con agua destilada. A continuación, se exprimió de forma manual y se dejó a temperatura ambiente con aireación forzada por 12 h, después se molió en un molino Brandendur OHG 880804, hasta un tamaño de partícula de 0.5 mm. El poliuretano molido se secó en una estufa a 60°C por 12 h.

Determinación de la humedad crítica al soporte. La humedad crítica del soporte se determinó colocando 1 g de soporte seco en 20 mL de agua destilada, agitándose con un agitador magnético por 10 minutos, después de lo cual se removió el exceso de agua haciendo pasar la suspensión por un filtro Whatman 41. Al retenido se le determinó el contenido de humedad en una termo-balanza Ohaus MB 45 a 130°C , registrándose los valores de humedad en intervalos regulares de 1 min, durante 30 min. Para determinar el valor de humedad crítica, se graficó la cantidad de agua ($\text{g H}_2\text{O}$) en función del tiempo (minutos), después se obtuvo la tangente de cada punto de esta curva, las pendientes se graficaron en función del contenido de humedad del soporte, construyendo con esto una curva de velocidad de secado. El valor de humedad crítica se obtuvo de la intersección de la curva de secado a velocidad constante con la de secado a velocidad decreciente. El procedimiento se muestra en el anexo 1.

4.4. Condiciones de cultivo. Para la fermentación se mezclaron 8 g de soporte seco con el medio de cultivo inoculado y la cantidad de agua necesaria para alcanzar la humedad deseada. Posteriormente, se empacó el equivalente a 7 g de soporte seco en cada columna, dejándose el resto de la mezcla para determinar pH, actividad de agua (a_w) y sacarosa iniciales. La fermentación se llevó a cabo en columnas de vidrio con un diámetro interno de 2 cm y una longitud de 21 cm. Las

columnas se colocaron en un baño de temperatura controlada a 30 ° C con un flujo de aire húmedo de 100 mL/min por columna.

Después de 48 horas de incubación se vació el contenido de las columnas y se adicionaron 10 mL de agua destilada por cada gramo de soporte seco inicial, se homogeneizó con un agitador magnético y filtró al vacío con un filtro Whatman 41. Al filtrado (extracto enzimático) se le determinó pH, actividad enzimática y azúcares totales. El filtro se secó por 12 horas a 60 ° C para medir la biomasa.

4.5 Caracterización de la invertasa

4.5.1. Cinética de actividad enzimática. Se evaluó el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad invertasa, para lo cual la mezcla de reacción, cuya composición se detalla adelante, con el extracto enzimático se incubó a 50 ° C, pH 4.5, con buffer de citratos 0.1 M, por una hora, analizando su actividad en intervalos de 2 minutos.

4.5.2 Efecto del pH sobre la actividad invertasa. Se determinó el efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la invertasa obtenida por fermentación en medio sólido. El efecto del pH se evaluó en un intervalo de 3 a 7 unidades de pH, con incrementos de 0.5 unidades, usando un buffer de citratos, 0.1 M, una temperatura y tiempo de incubación de 50 ° C y 10 minutos, respectivamente. La estabilidad de la enzima se evaluó en un intervalo de pH de 2 a 8 unidades, con los mismos incrementos, durante 1 hora, a 30 y 50 ° C.

4.5.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad invertasa. El efecto de la temperatura sobre la actividad invertasa se evaluó en un intervalo de 30 a 80 ° C, con incrementos de 10°C, el ensayo se realizó a un pH de 4.5, con buffer de citratos 0.1 M y un tiempo de incubación de 10 minutos. Posteriormente, se determinó la energía de activación para la invertasa empleando la ecuación de Arrhenius.

4.6. Composición de la atmósfera gaseosa. Para determinar el efecto de la composición de la atmósfera gaseosa, sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* así como sobre la producción de invertasa, se evaluaron tres mezclas de aire, con relaciones de O₂/CO₂ de 21/0, 18.5/2.5, y 16/5 %.

4.7. Métodos analíticos

4.7.1. Determinación de la biomasa. La biomasa se determinó al final de la fermentación, para lo cual, primero se pesaron papeles filtro Whatman 41, se pusieron a peso constante por 24 horas, con ellos se filtró la masa de fermentación, para finalmente secar el filtro con el retenido a 60° C por 24 horas, el valor de la biomasa se obtuvo por diferencia de peso seco.

4.7.2. Análisis de azúcares, polioles y ácidos orgánicos. La concentración de azúcares, polioles y ácidos orgánicos totales al inicio y final de la fermentación se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando una columna Phenomenex REZEX para ácidos orgánicos, con una longitud de 300 mm un diámetro interno de 7.8 mm y un tamaño de partícula de 8µm. La temperatura de operación fue de 65 ° C, como fase móvil se utilizó ácido sulfúrico 5mN, filtrada y desgasificada, con un flujo de 0.6 mL/min, los compuestos se detectaron mediante un detector de índice de refracción Perkin Elmer LC-30. Como estándar se utilizó una mezcla de glucosa, fructosa, trehalosa, ácido oxálico, ácido cítrico, eritrol y glicerol, con una concentración final de 7 g/L (1 g/L de cada soluto) y soluciones individuales de cada soluto con concentraciones de 1 g/L.

4.7.3. Producción de dióxido de carbono. La producción de CO₂ durante la fermentación se cuantificó en continuo mediante el uso de un analizador infrarrojo (Servomex LTD, Reino Unido).

4.7.4. Actividad enzimática. La actividad invertasa se determinó mediante la liberación de azúcares reductores usando el método modificado del ácido

dinitrosalicílico (DNS) (Miller y col., 1960). Se construyó una curva estándar, con un intervalo de concentraciones de 0 a 1 g/L. Se preparó una solución de glucosa y fructosa con una concentración de cada azúcar de 0.5 g/L, disueltas en buffer de citratos 0.1 M a pH 4.5 (solución madre), después se rotularon una serie de tubos de 0 a 7, adicionando 2 mL de la solución madre al tubo 0, 1 mL de buffer de citratos 0.1 M pH 4.5 a los tubos del 1 al 5 y 2 mL del mismo buffer a los tubos 6 y 7. Del tubo 0 se tomó una alícuota de 1 mL, se adicionó al tubo 1, se homogeneizó con un vórtex, repitiéndose la operación hasta el tubo 5. A todos los tubos se les agregó 1.5 mL del reactivo de DNS.

Para cuantificar la actividad invertasa del extracto, se empleó una solución de sacarosa 0.1 M en buffer de citratos pH 4.5 (substrato), cada muestra se analizó por duplicado (tubos "a"), con su respectivo testigo (tubos "b"). En todos los tubos se colocaron 1.9 mL del substrato, posteriormente, los tubos se colocaron en un baño de temperatura a 50° C por 5 minutos, después de este periodo de tiempo, a los tubos "b" se les adicionó 3 mL de DNS, posterior a esto, a todos los tubos se les agregaron 0.1 mL del extracto enzimático, los tubos se homogeneizaron con un vórtex y se incubaron por 10 minutos a la misma temperatura, después de este tiempo a los tubos "a" se les agregó 3 mL de DNS. Los tubos se colocaron a ebullición en un baño maría por 15 minutos, se enfriaron con agua corriente hasta temperatura ambiente, finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda25 a una longitud de onda de 640 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcares reductores por minuto.

4.7.5. Humedad y actividad de agua. La humedad del soporte se determinó colocando 2g de soporte húmedo en una termo-balanza Ohaus MB 45 a 130°C, por 15 min. La actividad de agua (a_w) inicial y final se determinó con un higrómetro Acualab CX-2.

4.7.6. Determinación del pH. El pH se determinó al inicio y al final de la fermentación, para el pH inicial se suspendió 1g de soporte húmedo en 10 mL de agua destilada, se homogeneizó con un vórtex y se filtró al vacío con un filtro Whatman 41, al filtrado se le determinó el pH con un potenciómetro Conductronic pH120, el pH final se le determinó al filtrado proveniente de la fermentación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Caracterización de la invertasa producida por FMS. Debido a que una de las variables más relevantes en el marco del presente trabajo es la evaluación de la producción de invertasa en función de las diferentes condiciones de cultivo, en la primera etapa se evaluó el efecto del pH, temperatura y tiempo de reacción sobre la actividad invertasa. Con base en los resultados obtenidos en esta parte experimental, se definieron las condiciones de ensayo para la evaluación del efecto de la concentración de sacarosa y humedad inicial sobre la producción invertasa. Posteriormente, se seleccionó la concentración inicial de sacarosa de mayor producción enzimática, para evaluar el efecto de la concentración de CO₂ presente en la atmósfera y de la humedad inicial sobre la producción de invertasa.

5.1.1. Cinética de actividad enzimática. En las reacciones enzimáticas, la etapa en la que la velocidad de formación de producto o el consumo de sustrato en función del tiempo son constantes, se le denomina velocidad inicial de reacción. Para determinar dicho parámetro, se cuantificó la liberación de azúcares reductores en un intervalo de tiempo de 2 a 60 min a 50 ° C y pH 4.5 (Fig. 1). La liberación de azúcares reductores en función del tiempo de incubación (minutos) presenta un comportamiento lineal y se mantiene prácticamente constante durante los primeros 40 minutos de reacción; posteriormente, la velocidad de liberación de azúcares reductores tiende a disminuir. Con base en este comportamiento, se optó por un tiempo de incubación de 10 minutos, durante el cual la invertasa se encuentra en un intervalo de velocidad inicial (constante). Lo anterior asegura que durante este intervalo de tiempo, la liberación de invertasa es proporcional al consumo de sustrato.

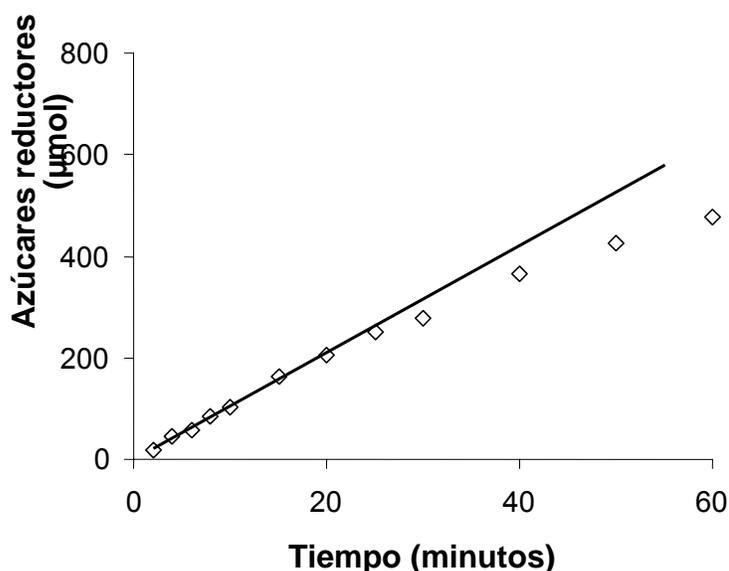


Figura 1. Liberación de azúcares reductores en función del tiempo.

5.1.2. Efecto del pH sobre la actividad invertasa. El pH influye sobre el crecimiento y metabolismo de los microorganismos, así como sobre la producción y actividad de las enzimas. En el caso de los microorganismos, variaciones de este factor durante el tiempo de fermentación pueden ser atribuidas a la composición del medio de cultivo y a la producción de metabolitos, los cuales al acumularse en el medio o al ser consumidos por el microorganismo, producen variaciones en este parámetro. En el caso de las enzimas, éstas presentan intervalos de pH, en los cuales pueden manifestar una mayor actividad y/o estabilidad; sin embargo, el intervalo de mayor actividad no siempre corresponde con el de mayor estabilidad.

La invertasa de *Aspergillus niger* C28B25 obtenida por FMS presenta actividad en un intervalo de pH de 3 a 7 unidades (Fig. 2). Al inicio de dicho intervalo, la actividad invertasa aumenta conforme se incrementa el pH, alcanzando una actividad máxima con un valor de 4.5, disminuyendo con valores de pH superiores. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Rubio y Maldonado, (1995), L'Hocine y col., (2000) para una invertasa producida por *A. niger* en

fermentación en medio líquido. El valor de máxima actividad (4.5 unidades de pH) durante el ensayo es igual al reportado para la invertasa producida por *Pichia anomala*, en fermentación en medio líquido (Rodríguez y col., 1995), Por otro lado, este valor se aproxima al máximo de la invertasa producida por *A. japonicus* (5.5) (Chen y Liu, 1996), *Zymomonas mobilis* (5.0) (O'Mullan y col., 1992) y *Candida utilis* (5.0) (Chávez y col., 1997). En contraste, difiere con los de *Azotobacter chroococcum* (De La Vega y col., 1991) y *Lactobacillus reuteri* (Cuezso y Col., 2000), con actividad máxima en un intervalo de pH entre 6 y 6.5. En resumen, se observa que el valor de pH para la máxima actividad de la invertasa producida es similar a los valores reportados para invertasas producidas por hongos y difiere de lo reportado para invertasas de origen bacteriano. Para los análisis subsecuentes se decidió evaluar la actividad enzimática a pH 4.5 con buffer de citratos 0.1 M.

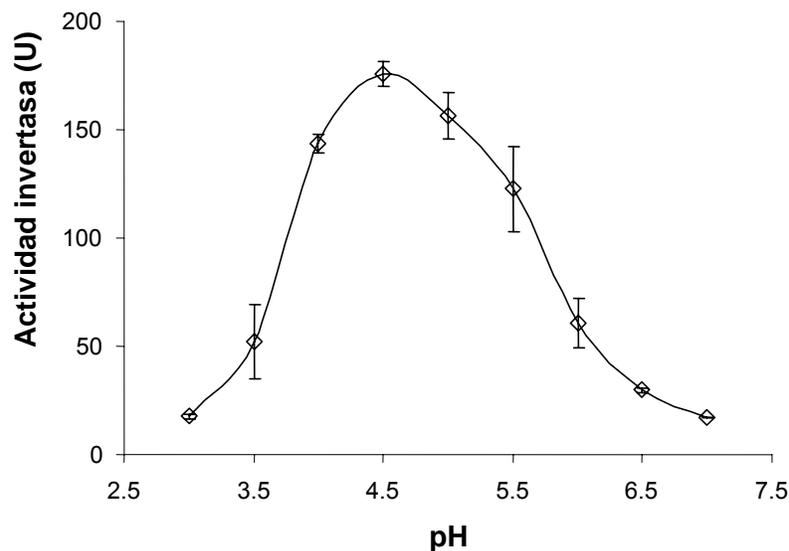


Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad invertasa.

5.1.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad invertasa. En toda reacción enzimática el incremento en la temperatura de reacción, provoca un incremento en la velocidad a la cual se lleva a cabo ésta, debido al incremento de la energía interna del sistema; sin embargo, si el incremento se mantiene por un intervalo de

tiempo prolongado, la enzima perderá sus propiedades catalíticas (desnaturalización). La temperatura a la cual se presenta este fenómeno, así como la tolerancia de las enzimas a los cambios de temperatura dependen del tipo y estado de las mismas. En general, una enzima es más estable a la temperatura en un tejido intacto, o en un homogeneizado, que purificada. Por esto, un control adecuado de la temperatura de reacción es un prerrequisito para la reproducibilidad en los ensayos enzimáticos. Lo anterior se puede constatar para la invertasa producida por *A. niger* C28B25.

En la figura 3 se presenta la actividad invertasa en función de la temperatura de incubación. Al aumentar la temperatura de incubación, la actividad invertasa aumenta hasta alcanzar un máximo de 367 U a 60 °C. Decreciendo rápidamente a temperaturas mayores. Este valor de temperatura concuerda con lo reportado para invertasas producidas por *A.niger* (Rubio y Maldonado, 1995; L'Hocine y col., 2000) y por *A. japonicus* (Chen y Liu, 1996). Posteriormente, se calculó la energía de activación para esta invertasa, mediante la ecuación de Arrhenius, obteniéndose un valor de 5.6 Kcal/mol, que es menor al reportado para la invertasa producida por *A. niger* en cultivo líquido (9.13 Kcal/mol) (Rubio y Maldonado, 1995).

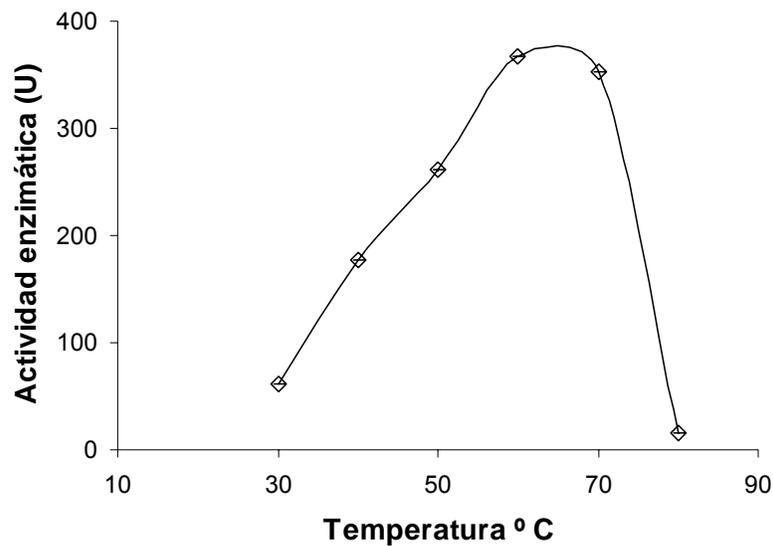


Figura 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad invertasa de *A. niger*.

Después de obtener los valores de temperatura y pH de mayor actividad invertasa, se determinó la estabilidad de la enzima al pH, en un intervalo de 2 a 8 por 1 h, tanto para la temperatura a la cual la enzima se produce (30°C) como para la determinada para los ensayos enzimáticos (50 °C). En la figura 4 se presenta la actividad invertasa en dicho intervalo de pH y distintas temperaturas: 30 y 50 °C. Se observa que la enzima presenta mayor estabilidad a valores de pH entre 4.5 y 6, y que ésta es independiente de las dos temperaturas evaluadas. El intervalo de pH en el cual la enzima es estable concuerda con el reportado para la invertasa producida por *A. niger* (2-11) (L'Hocine y col., 2000), y para la producida por *Candida utilis*, (3-8) (Chávez y col, 1997).

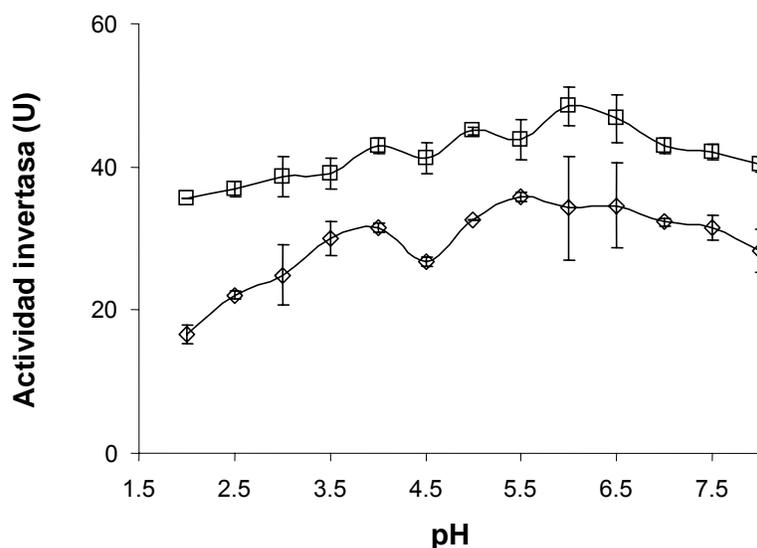


Figura 4. Estabilidad de la invertasa al pH a 50 °C (□) y 30 °C (◇) producida por *A. niger* C28B25 en FMS.

5.1.4. Conclusiones parciales. La invertasa producida por *A. niger* C28B25 en fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte, muestra una temperatura y pH óptimos de 60 °C y 4.5 respectivamente, y es estable en un intervalo de pH de 3.5 a 6.5 a 30 y 50 °C durante 1 h. Esta enzima presentó una energía de activación de 5.6 Kcal/mol. Con base en los resultados obtenidos, las condiciones que se eligieron para los análisis subsecuentes fueron, pH y temperatura de 4.5 y 50 °C, respectivamente, y un tiempo de reacción de 10 min. La temperatura seleccionada es menor a la de máxima actividad enzimática (60 °C), eligiéndose este valor para evitar problemas de desnaturalización.

5.2. Efecto del tipo de fuente de nitrógeno sobre la producción de invertasa.

Los estudios realizados sobre la estabilidad de la enzima demostraron que ésta presenta una mayor estabilidad con valores de pH cercanos a la neutralidad (Fig. 4). Debido al efecto importante de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre el pH del medio de cultivo, se evaluó el efecto de las mezclas $\text{NaNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y urea/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre el pH del medio de cultivo, el crecimiento y la producción de invertasa, con una concentración inicial de sacarosa de 400 mg/g s.s. La

presencia del sulfato de amonio favorece la acidificación del medio de cultivo, debida a la liberación del ión HSO_4^- (Feng y col., 2000), mientras que la presencia de urea en la segunda mezcla genera un incremento en el pH debido a que la asimilación de la urea involucra la formación de NH_3 (Nagel y col., 1999; Raimbault, 1998). Muchos microorganismos utilizan preferentemente el amonio como fuente de nitrógeno, algunos otros utilizan el nitrato, el cual primero debe de ser reducido a amonio antes de su incorporación al metabolismo. En la tabla 2 se presentan los resultados de biomasa final, actividad enzimática, rendimiento enzima/biomasa y pH final luego de 48 h en función de diferentes relaciones $\text{NaNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En esta tabla se observa que, la actividad enzimática aumenta de manera gradual conforme la proporción de nitrato de sodio se incrementa en el medio, alcanzando un valor máximo de 79 U/g s.s. cuando se emplea nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. La biomasa muestra una tendencia inversa, aumenta de manera gradual, conforme disminuye la proporción de nitrato de sodio en la mezcla, obteniéndose un valor máximo de 0.136 g/g s.s cuando se emplea sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, y un mínimo de 0.048 g/g s.s. cuando se emplea nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno (Tabla 2). El valor del pH final se incrementa, conforme se reduce la proporción de sulfato de amonio en la mezcla.

El rendimiento enzima/biomasa $Y_{E/X}$ (U/g X) se obtiene dividiendo el valor de actividad enzimática entre la concentración de biomasa final, éste se incrementa cuando se reduce la proporción de sulfato de amonio en la mezcla, debido a la disminución en la producción de biomasa bajo estas condiciones.

Tabla 2 Biomasa, actividad enzimática y pH final con nitrato de sodio/sulfato de amonio como fuente de nitrógeno*.

NaNO ₃ /(NH ₄) ₂ SO ₄ (% p/p)	Biomasa (g X/ g s.s.)	Actividad enzimática (U/g s.s.)	pH final	Rendimiento (U/g X)
0/100	0.136 (0.013)	5.77 (0.433)	2.08 (0.014)	43
25/75	0.071 (0)	11.51 (6.871)	3.24 (0.785)	163
50/50	0.086 (0.039)	5.55 (0)	2.55 (0.134)	65
75/25	0.085 (0.014)	26.27 (2.144)	6.69 (0.148)	310
100/0	0.048 (0.024)	79.37 (8.464)	6.97 (0.106)	1642

* La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

Debido al estado de oxido-reducción del nitrógeno en ambas sales (nitrato de sodio y sulfato de amonio), al mezclarse se generan condiciones de oxido-reducción que pueden afectar la naturaleza de los constituyentes del medio de cultivo. Este efecto se observó como una fuerte coloración (roja) del medio de cultivo, únicamente cuando ambas fuentes de nitrógeno estuvieron presentes en el medio de cultivo. Con el objetivo de eliminar las interacciones NaNO₃/(NH₄)₂SO₄ y para ampliar el intervalo de pH al final del cultivo en función de la composición de la fuente nitrogenada, se evaluó la mezcla urea/(NH₄)₂SO₄.

En la tabla 3 se presentan los resultados de actividad enzimática, biomasa y pH final, empleando una mezcla de urea/sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. En esta tabla se observa que la actividad invertasa se incrementa de manera gradual, conforme se incrementa la proporción de urea en la mezcla, alcanzando un máximo (34 U/g s.s) cuando las proporciones de las sales en la mezcla son iguales. La concentración final de biomasa no refleja una tendencia respecto al incremento del sulfato de amonio en la mezcla; sin embargo, se obtuvo un valor máximo (0.109 gX/g s.s.) al utilizar la relación urea/sulfato de amonio de 40/60. Por otro lado, el pH se incrementa de forma gradual conforme se incrementa la concentración de urea en la mezcla, alcanzando un valor máximo cuando las proporciones de los componentes en la mezcla son iguales.

Tabla3. Biomasa, actividad enzimática y pH finales con una mezcla de urea/sulfato de amonio como fuente de nitrógeno*.

Urea/sulfato de amonio (%)	Biomasa (g X/ g s.s.)	Actividad enzimática (U/g s.s.)	pH final	Rendimiento (U/ g X)
10/90	0.066 (0)	0 (0)	2.16 (0)	0
20/80	0.084 (0.004)	0.753 (0.380)	2.20 (0.028)	9.01
30/70	0.020 (0.063)	2.029 (1.045)	2.28 (0.007)	100.1
40/60	0.109 (0.003)	28.440 (0.190)	5.13 (0.177)	260.7
50/50	0.050 (0.056)	33.810 (5.322)	6.85 (0.071)	671.8

* La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

5.2.1. Conclusiones parciales. Al comparar la biomasa final para las mezclas con las cuales se obtuvo la mayor actividad enzimática, se observa una disminución de 19 % en el valor de este parámetro, cuando se emplea urea/sulfato de amonio en comparación al uso de nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. Por otro lado, cuando se comparan los valores máximos de actividad enzimática obtenidos con las diferentes mezclas se observa una reducción de 56 % para el obtenido con urea/sulfato de amonio, respecto al obtenido con nitrato de amonio como única fuente de nitrógeno, sin embargo, el valor final del pH es prácticamente el mismo para ambas mezclas (6.97 y 6.85). Considerando lo anterior se decidió emplear nitrato de sodio (NaNO_3) como única fuente de nitrógeno en estudios subsecuentes.

5.3. Efecto de la concentración de sacarosa y contenido de humedad inicial sobre la producción de invertasa y crecimiento de *A. niger* en FMS. Una vez determinadas las condiciones para la evaluación de la actividad invertasa, se estudió el efecto de la concentración de sacarosa y humedad inicial sobre el crecimiento de *A. niger* C28B25 y la producción de invertasa en FMS. Las concentraciones de sacarosa estudiadas fueron 100, 200, 300 y 400 mg/g s.s. La humedad inicial del medio sólido fue 1,2,4,6 y 8 veces la humedad crítica de la espuma de poliuretano utilizada en este trabajo (Humedad crítica = 0.524 g agua/g soporte seco) lo que corresponde a un porcentaje de humedad de 20 a 80%

(gH₂O/g m.h). Excepto para los medios con concentraciones de sacarosa de 400 mg/g s.s., donde la humedad inicial del soporte fue 1, 2, 4, y 6 veces la humedad crítica.

5.3.1 Producción de biomasa. La concentración y tipo de la fuente de carbono influyen sobre el crecimiento y metabolismo de los microorganismos en FMS. Dicho efecto puede ser positivo para el crecimiento y en algunos casos también para la producción de algunas enzimas, este efecto se observa tanto con soportes naturales (Solís-Pereira y col., 1993; Favela-Torres y col., 1997; 1998) como con soportes inertes (Auria y col, 1995; Romero-Gómez y col., 2000).

En la figura 5 se presenta la biomasa producida por *A. niger* C28B25 en FMS con espuma de poliuretano (PUF) en función de la concentración de sacarosa y de la humedad inicial del soporte.

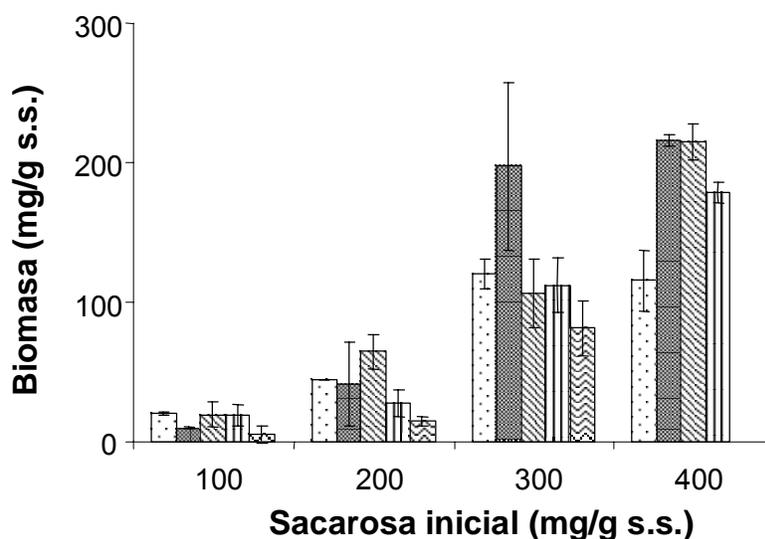


Figura 5. Biomasa producida por *A. niger* C28B25 en FMS en función de la concentración de sacarosa y humedad inicial.

(□) 24% (■) 42% (▨) 61% (▧) 70% (▩) 76%

En ella se observa que al incrementar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, la biomasa se incrementa, hasta alcanzar un valor máximo de 216 mg/

g s.s con la máxima concentración de sacarosa evaluada (400 mg/g s.s), que es el doble de lo reportado, para *Aspergillus niger*, empleando Amberlita IRA 900 como soporte (Auria y col., 1995), sin embargo, en nuestro caso se requirió de más tiempo para alcanzar dicho valor de biomasa (31 y 48 h, respectivamente). Con una concentración de sacarosa de 100 mg/g s.s, el valor de la biomasa final (20 +/- 0.943 mg/g s.s) fue similar a lo reportado previamente por Auria y col., (1995), para *Aspergillus niger*, empleando Amberlita IRA 900 como soporte y una concentración de sacarosa de 100 g/L, en este caso, la biomasa se produjo en menos tiempo en comparación de nuestro estudio (29 y 48 h, respectivamente), lo anterior indicaría, que el crecimiento de *Aspergillus niger*, en FMS es afectado por el tipo de soporte empleado. Cuando se incrementó la concentración de sacarosa a 200 y 300 mg/g s.s, la biomasa aumentó hasta alcanzar valores finales de 65 +/- 12.16 y 198 +/- 60.34 mg/g s.s, respectivamente, que son mayores a los reportados en la literatura (Favela-Torres y col., 1998). El comportamiento observado para la producción de biomasa concuerda con lo reportado en trabajos previos (Favela-Torres y col., 1997; 1998; Romero-Gómez y col., 2000, Auria y col., 1995), lo anterior indica que en procesos de fermentación en medio sólido el crecimiento de *A. niger* no parece ser sensible a cambios en la concentración inicial de carbono (glucosa o sacarosa), ya que las curvas de crecimiento muestran un perfil similar para todas las concentraciones estudiadas (Favela-Torres y col., 1997, 1998; Romero-Gómez y col., 2000; Auria y col., 1995). Lo que se puede atribuir a que en la FMS los microorganismos están en contacto con el medio de cultivo (fase líquida) y con la atmósfera (fase gaseosa), reduciendo así la presión osmótica provocada por las altas concentraciones de azúcar, aprovechando mejor el substrato (Favela-Torres y col., 1998).

Analizando los resultados obtenidos para la producción de biomasa, únicamente en función de la concentración de sacarosa empleada, independientemente del contenido de humedad del soporte, mediante un análisis de varianza, se encontró que la biomasa producida con una concentración de sacarosa de 100 mg/g s.s

difiere significativamente ($\alpha = 0.05$) de la obtenida con las concentraciones restantes.

Un factor limitante para el crecimiento de los microorganismos y la producción de enzimas en FMS, es la capacidad de retención de agua (Pandey y col., 1994), que de manera general se encuentra en un intervalo de 20 a 80 % dependiendo del soporte utilizado (Oriol y col., 1988). Si el contenido de humedad del medio de cultivo es bajo, la película de agua que rodea a los microorganismos será muy delgada, ocasionando que los espacios entre las partículas del soporte estén ocupados por aire, lo que aumenta la transferencia de oxígeno y favorece el metabolismo aeróbico (Oostra y col., 2001). En este caso los nutrientes solubles estarán más concentrados debido al bajo contenido de agua en el medio. Por otro lado, si el contenido de humedad del medio de cultivo es alto, la película de agua que rodea al microorganismo será mayor, y los espacios entre las partículas del soporte estarán llenos de agua limitándose la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa en el sistema, los nutrientes solubles estarán diluidos debido a la cantidad de agua presente en el sistema. La poca disponibilidad de oxígeno en el sistema puede favorecer el metabolismo anaerobio, y derivar en problemas de contaminación por bacterias o levaduras. (Pandey, 2003).

Realizando un análisis de varianza para la producción de biomasa en función del contenido de humedad del soporte, independientemente de la concentración de sacarosa, no se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$), para los contenidos de humedad con las concentraciones de 100, 200, y 300 mg/g s.s. Para una concentración de 400 mg/g s.s sólo se observan diferencias significativas en la producción de biomasa con el menor contenido de humedad (24%).

Producción de CO₂. La medición del dióxido de carbono durante la fermentación, es comúnmente usado de manera directa, para calcular la asimilación de un substrato orgánico disuelto o para estudiar la biofiltración de algún compuesto orgánico volátil. La espectrometría infrarroja es la técnica más utilizada para

registrar el CO₂. El registro de CO₂ hace posible evaluar el crecimiento microbiano, para validar los modelos de difusión de gases y para monitorear la fermentación (Bellon-Maurel y col., 2003).

La figura 6 presenta los valores de CO₂ producido en función de la concentración de sacarosa y contenido de humedad inicial del soporte, en ella se observa que con una concentración de sacarosa de 100 mg/g s.s., la máxima producción de CO₂ se obtuvo con el menor y el mayor contenido de humedad evaluados. Al aumentar la concentración de sacarosa a 200 mg/g s.s., la máxima producción de CO₂ se obtuvo con 42% de humedad; disminuyendo progresivamente al aumentar la humedad inicial del medio de cultivo. Cuando la concentración de sacarosa fue de 300 mg/g s.s., la producción de CO₂ alcanzó su máximo valor con el mismo contenido de humedad (42%) que para el caso anterior. Con una concentración de sacarosa de 400 mg/g s.s., la producción de CO₂ alcanzó su máximo valor en el medio con 61% de humedad inicial. Exceptuando la menor concentración de sacarosa evaluada (100 mg/g s.s.), en todos los casos la menor de producción de CO₂ se obtuvo con los medios con menor contenido de humedad (24%).

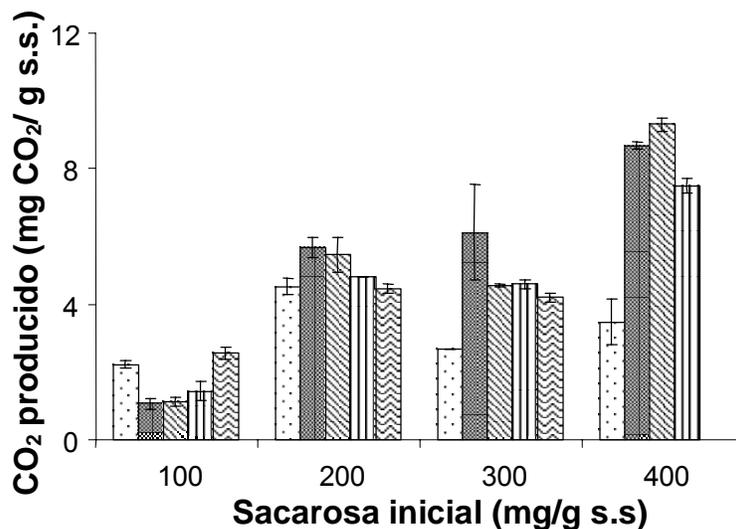


Figura 6. CO₂ maximo producido en función de la concentración de sacarosa y contenido de humedad inicial del soporte.

(□) 24% (■) 42% (▨) 61% (▧) 70% (▩) 76%

A partir de las curvas de producción de CO₂ se obtuvieron la duración de la fase de retardo (fase lag) y la tasa específica de producción de CO₂ equivalente a la tasa específica de crecimiento. En la figura 7 se observa que con una concentración de 100 mg/g s.s. la duración de la fase lag se incrementa conforme aumenta el contenido de humedad del soporte, hasta alcanzar la mayor duración con 70 % de humedad, para descender después de este punto, para el resto de las concentraciones estudiadas, la duración de la fase lag disminuye conforme se incrementa el contenido de humedad del soporte. Lo anterior se puede deber a que conforme se incrementa la concentración de sacarosa en el medio, debe de existir una mayor cantidad de agua para ponerla en solución y hacerla accesible para que el microorganismo la asimile mas rápido, esto explicaría que la duración de la fase lag fuera mayor para el menor contenido de humedad, para los medios con las mayores concentraciones de sacarosa.

Comparando la duración de la fase lag en función de la concentración de sacarosa empleada, mediante un análisis de varianza, con un nivel de significancia (α) igual a 0.05, se dedujo que la duración de la fase lag difiere significativamente para todas las concentraciones de sacarosa estudiadas. Aplicando el mismo análisis de varianza para la duración de la fase lag en función del contenido de humedad del soporte, para cada concentración de sacarosa, no se observan diferencias significativas para la duración de la fase lag con concentración de 100 mg/g s.s. Con concentraciones de sacarosa de 200 y 300 mg/g s.s., sólo se encuentran diferencias significativas con el menor contenido de humedad (24%). Finalmente, con una concentración de 400 mg/g s.s., los contenidos de humedad se agrupan en dos grupos 24 y 42 % y 61 y 70 %, que difieren significativamente entre ellos. Exceptuando la menor concentración de sacarosa evaluada (100 mg/g s.s.), en todos los casos la mayor duración de la fase lag se obtuvo con los medios con menor contenido de humedad (24%).

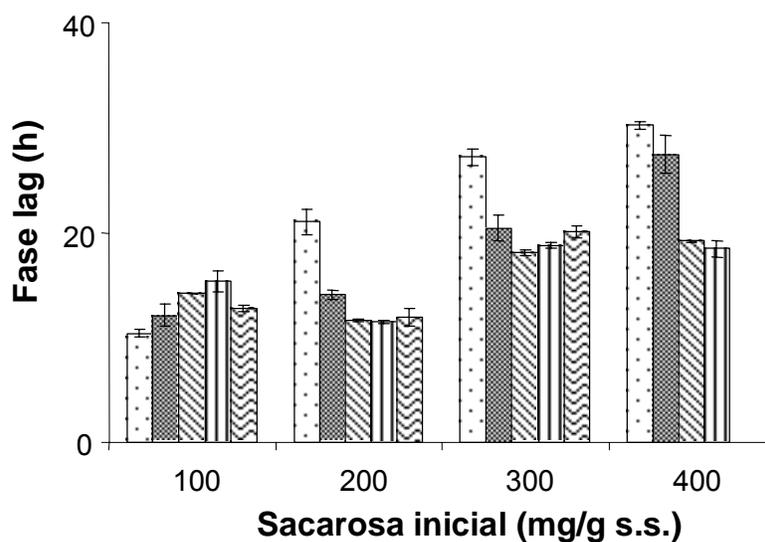


Figura 7. Duración de la fase lag en función de la concentración de sacarosa y contenido de humedad inicial del soporte.

(□) 24% (■) 42 % (▨) 61% (▧) 70% (▩) 76%

Velocidad específica de crecimiento (μ). La figura 8 presenta los valores obtenidos de μ en función de la concentración de sacarosa y de la humedad inicial del soporte. Estos valores fueron obtenidos ajustando con la ecuación logística los datos de producción de CO_2 en función del tiempo. Para los medios con concentraciones de sacarosa de 100 mg/g s.s., el mayor valor para este parámetro (0.242 h^{-1}), se obtiene con un contenido de humedad de 70 %, disminuyendo con contenidos de humedad por encima y por debajo de este valor, siendo este valor menor al reportado para *Aspergillus niger* en FMS con Amberlita IRA 900 como soporte (Auria y col., 1995; Favela-Torres y col., 1998). Por otro lado, el valor de μ , obtenido con esta concentración de sacarosa, es prácticamente el doble del reportado para la misma cepa creciendo sobre cubos de PUF (Romero, 2000) y representa un incremento del 30 % de lo reportado para esta cepa en otro estudio (Montiel-González y col., 2004). En estos dos últimos casos las diferencias, se atribuyen a las características del soporte (cuadros de PUF). Para los medios con concentraciones iniciales de sacarosa de 200 mg/g s.s., el mayor valor para μ fue de 0.283 h^{-1} y se obtuvo con un contenido de humedad de 42 %, la tendencia de

este parámetro es similar a la observada en el caso anterior, el valor de μ , disminuye con contenidos de humedad superiores o inferiores a este y es menor de lo reportado por Auria y col. (1995), pero por otro lado, es mayor de lo reportado por Favela-Torres y col. (1998), se debe resaltar que en ambos casos se emplearon el mismo microorganismo y el mismo soporte. Para los medios con concentraciones iniciales de sacarosa de 300 mg/g s.s., el mayor valor de μ fue de 0.274 h^{-1} , y se obtuvo con un contenido de humedad de 42 %, el comportamiento de este parámetro es igual al observado para las concentraciones anteriores y es similar a lo reportado en la literatura (Auria y col., 1995). Finalmente para los medios con concentraciones iniciales de sacarosa de 400 mg/g s.s., el mayor valor de μ fue de 0.221, y se obtuvo con un contenido de humedad de 61 %, el comportamiento de este parámetro es igual al observado para el resto de las concentraciones y es menor a lo reportado en la literatura (Auria y col., 1995). De manera general, se observa que μ se incrementa conforme aumenta la concentración de sacarosa, alcanzando el máximo valor con las concentraciones de 200 y 300 mg/g s.s., disminuyendo con mayores concentraciones de sacarosa, lo cual difiere de lo reportado en la literatura (Auria y col., 1995; Favela-Torres y col., 1998), y puede deberse a una particularidad de la cepa utilizada o del soporte. Analizando estos resultados mediante un análisis de varianza, primero en función de la concentración de sacarosa, no se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre las velocidades específicas de crecimiento para las concentraciones de 200 y 300 mg/g s.s. y de 100 y 400 mg/g s.s., y después en función del contenido de humedad para cada concentración no se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en la velocidad específica de crecimiento para las concentraciones de sacarosa de 100, 200 y 300 mg/g s.s. Para una concentración de 400 mg/g s.s., solo difieren significativamente las velocidades específicas de crecimiento obtenidas con contenidos de humedad de 24 y 70 %.

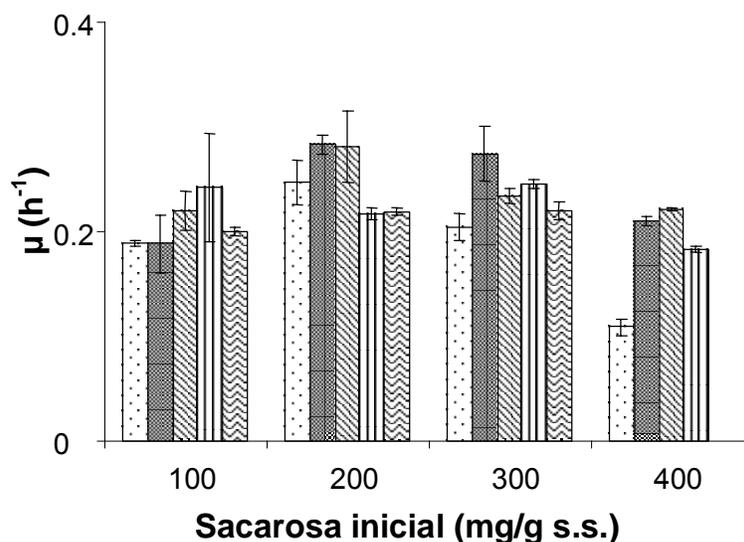


Figura 8. Velocidad específica de crecimiento en función de la concentración de sacarosa y humedad iniciales.

(□) 24% (◻) 42% (▨) 61% (▩) 70% (▮) 76%

5.3.2 Producción de invertasa. Una de las principales ventajas que tiene la FMS sobre la fermentación en medio líquido, es el empleo de altas concentraciones de fuente de carbono, sin que esto afecte el crecimiento y en algunos casos, la producción de enzimas, minimizando así la represión catabólica (Solís-Pereira y col., 1996). Esta característica se ha empleado en la producción de enzimas hidrolíticas, como α -amilasas y amiloglucosidasas, con concentraciones de azúcar del orden de 150 mg/g s.s. (Nandakumar y col., 1999). Por otro lado, Solís-Pereira y col. (1993,1996) mostraron que la producción de pectinasas se incrementa conforme lo hace la concentración de glucosa en el medio en un intervalo de 30 a 450 g/L. También se ha mostrado que al incrementar la concentración inicial de azúcar en el medio se incrementa la producción de fitasa (Al-Asheh y Duvnjak, 1994).

En la Figura 9 se presenta la producción final de invertasa en función de la concentración inicial de sacarosa y del contenido de humedad inicial del soporte. La máxima producción de invertasa (147 U/g s.s.) se obtiene con una

concentración inicial de sacarosa de 200 mg/g s.s. y una humedad inicial de 61 %, este valor de humedad es similar al reportado para la mayor producción de fitasa por *Aspergillus ficuum* sobre soporte inerte (Gautam y col., 2002). Con una concentración de sacarosa de 100 mg/g s.s., se obtiene una producción máxima de 53 U/g s.s. con una humedad de 70 %, este valor es mayor, y se obtiene en menor tiempo de lo reportado por Solís-Pereira y col. (1993), para las exopectinasas producidas por *Aspergillus niger* sobre bagazo de caña con una concentración de glucosa de 100 g/L. Esto puede deberse a que sobre soportes inertes, la síntesis de enzimas hidrolíticas no se ve afectada por los componentes de estos. Cuando se incrementa la concentración de azúcar a 300 y 400 mg/g s.s., la mayor producción de invertasa para estas concentraciones se obtiene con un contenido de humedad de 42 %.

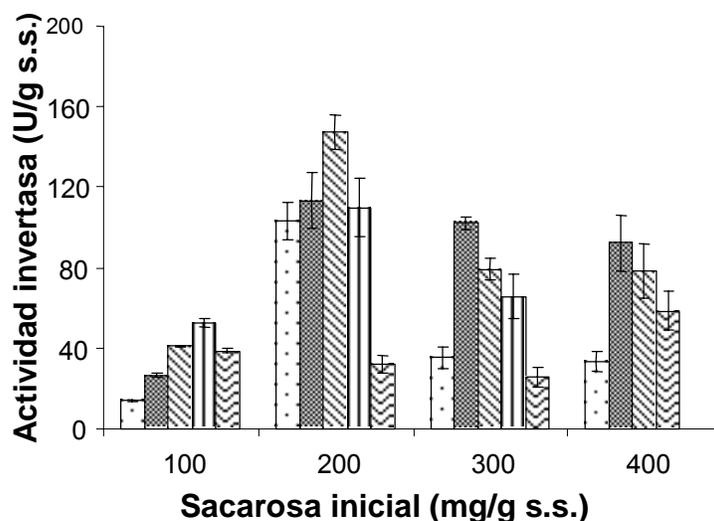


Figura 9. Invertasa producida por *A. niger* C28B25 en FMS en función de la concentración de sacarosa y humedad inicial.

(□) 24% (▨) 42% (▧) 61% (▩) 70% (▪) 76%

Realizando un análisis de varianza con un nivel de significancia (α) igual a 0.05, para evaluar la producción de invertasa con las diferentes concentraciones de sacarosa estudiadas, se observa que todas las concentraciones estudiadas

difieren significativamente entre sí. Llevando a cabo el mismo análisis de varianza para la producción de invertasa en función del contenido de humedad dentro de cada concentración de sacarosa se observa que con una concentración de sacarosa de 100 mg/g s.s., sólo se encontraron diferencias significativas para la producción de invertasa con contenidos de humedad de 24, 42, y 70 %. Para el caso de 200 mg/g s.s., las diferencias significativas se observan con contenidos de humedad de 61 y 76 %. Con una concentración de 300 mg/g s.s, el efecto del contenido de humedad sobre la producción de invertasa se agrupa en tres categorías que difieren significativamente entre ellas, los grupos que se forman son: 76 y 24 %, 70 y 61 % y 42 %, con una concentración de sacarosa igual a 400 mg/g s.s, se puede afirmar que sólo la invertasa producida con un contenido de humedad de 24 %, difiere significativamente de la producida en los medios con mayor contenido de humedad.

Comparando de manera general los valores máximos de producción de invertasa entre las diferentes concentraciones estudiadas (Fig. 9) se observa que al usar concentraciones de 100 y 200 mg/g s.s. la mayor actividad enzimática se obtuvo en los medios con alto contenido de humedad (70 y 61% respectivamente). Sin embargo, para concentraciones iniciales de sacarosa de 300 y 400 mg/g s.s. la mayor actividad enzimática se obtuvo en los medios con 42% de humedad inicial. Esto comprobaría que con un bajo contenido de humedad el microorganismo puede asimilar concentraciones elevadas de fuente de carbono en procesos de FMS.

5.3.3 Actividad de agua (a_w). La actividad de agua (a_w) del substrato es un indicador del agua disponible para el metabolismo microbiano. El control de este factor es empleado para modificar el metabolismo así como para evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes (Pandey y col., 1994). El valor de a_w está estrechamente relacionado con el contenido de humedad del soporte (Lu y col., 2003). Un valor reducido de a_w reducirá la disponibilidad de agua para el metabolismo microbiano, dificultando la transferencia de masa, lo cual puede

ocasionar una conversión incompleta del sustrato (Oriol y col., 1988; Pandey y col., 1994). En nuestro análisis, el empleo de elevadas concentraciones de sacarosa afectó la disponibilidad de agua, reduciendo la a_w al inicio de la fermentación, acentuándose la disminución con el incremento en la concentración de azúcar, conforme la fermentación avanza, el sustrato es consumido incrementándose la a_w hacia el final de la fermentación, siendo muy próxima a 1 (Tabla 4). Con valores de humedad superiores al 40 % no se observan diferencias entre el valor inicial y el final de la a_w .

Tabla 4. Actividad de agua (a_w) durante la fermentación en medio sólido de *A.niger* C28B25 para la producción de invertasa*.

Sacarosa (mg/g s.s)	100		200		300		400	
	a_{wi}	a_{wf}	a_{wi}	a_{wf}	a_{wi}	a_{wf}	a_{wi}	a_{wf}
24	0.95 (0.0006)	0.97 (0.006)	0.91 (0.004)	0.96 (0.007)	0.88 (0.004)	0.92 (0.007)	0.88 (0.001)	0.91 (0.007)
42	0.98 (0.002)	0.99 (0.0007)	0.96 (0.0007)	0.98 (0)	0.94 (0.004)	0.97 (0.007)	0.93 (0.007)	0.96 (0.001)
61	0.99 (0.001)	1.00 (0.001)	0.98 (0.002)	0.99 (0.0007)	0.97 (0.001)	0.98 (0.0007)	0.97 (0.007)	0.98 (0.001)
70	1.00 (0.001)	1.00 (0.0007)	0.99 (0.0007)	1.00 (0.002)	0.99 (0.004)	0.99 (0.0007)	0.98 (0.0007)	0.99 (0.002)
76	1.00 (0)	1.00 (0)	0.99 (0.002)	1.00 (0)	0.99 (0.001)	0.99 (0.0007)	N.D	N.D

N.D: No se determinó.

* La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

Rendimiento enzima/sustrato ($Y_{E/S}$) Un parámetro relevante en todo proceso fermentativo es el rendimiento enzima/sustrato ($Y_{E/S}$), que nos da información sobre la cantidad de sustrato empleado en la síntesis enzimática y de manera indirecta de la economía del sistema. A continuación se presenta el rendimiento enzima/sustrato ($Y_{E/S}$), en función de la concentración de sacarosa y humedad iniciales (Fig. 10). Los rendimientos más altos se obtienen con concentraciones de

100 y 200 mg/g s.s. En el primer caso este rendimiento es mayor al reportado en la literatura (Romero, 2001). En cuanto a la humedad se observa, que el valor al cual se obtienen los mayores rendimientos disminuye gradualmente conforme se incrementa la concentración de azúcar.

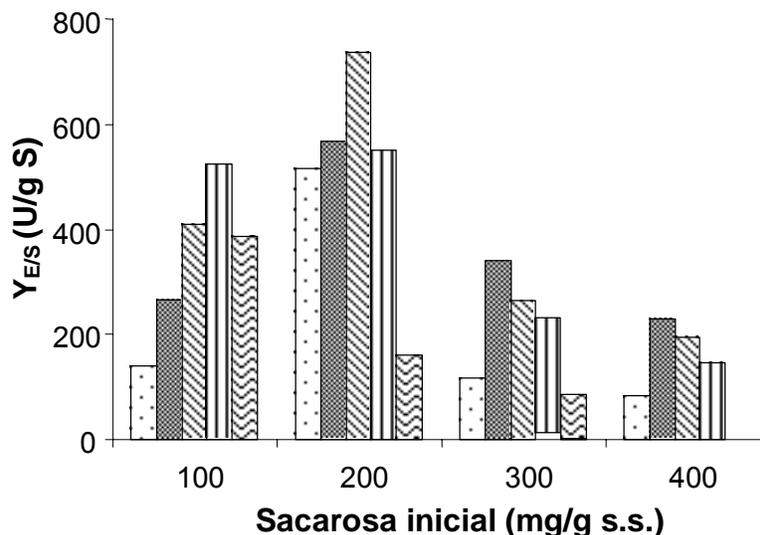


Figura 10. Rendimiento enzima/substrato en función de la concentración de sacarosa y humedad inicial.

(□) 24% (■) 42% (▨) 61% (▧) 70% (⊞) 76%

Rendimiento enzima/biomasa ($Y_{E/X}$). En la figura 11 se presenta el rendimiento enzima/biomasa ($Y_{E/X}$) en función de la concentración de sacarosa y humedad iniciales. El mayor rendimiento se obtuvo con el medio menos concentrado en sacarosa y con la mayor humedad inicial. Por otra parte, los rendimientos obtenidos, con esta concentración de sacarosa (100 mg/g s.s.) son considerablemente mayores a los reportados en la literatura para este hongo y con el mismo soporte (Montiel-González y col., 2004; Romero-Gómez y col., 2000). Lo cual probablemente se deba a la menor cantidad de biomasa producida con esta concentración de sacarosa. Esta diferencia, del rendimiento en comparación con lo reportado (Montiel-González y col., 2004; Romero-Gómez y col., 2000) se atribuye al tamaño de partícula del soporte empleado en nuestro estudio. De manera general, al aumentar la concentración de sacarosa en el medio, este

rendimiento disminuye, principalmente, debido a la mayor producción de biomasa con concentraciones superiores a 100 mg/g s.s. El rendimiento $Y_{E/X}$, no muestra una tendencia definida en función del contenido de humedad del soporte para las concentraciones de sacarosa de 100 y 200 mg/g s.s. Con 300 mg/g s.s., se obtiene un mayor rendimiento con contenidos de humedad de 61 %, disminuyendo con contenidos de humedad mayores o menores a este. Para los medios con concentraciones de sacarosa de 400 mg/g.s., el rendimiento $Y_{E/X}$ es prácticamente independiente del contenido de humedad inicial del soporte.

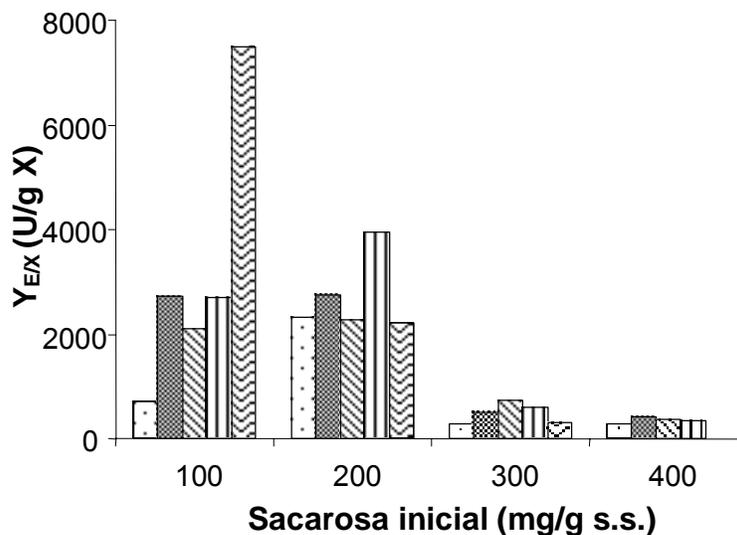


Figura 11. Rendimiento enzima biomasa $Y_{U/X}$ en función de la concentración de sacarosa y humedad iniciales.

(□) 24% (■) 42 % (▨) 61% (▧) 70% (▩) 76%

Rendimiento producto/substrato ($Y_{P/S}$). Cuando se emplean concentraciones elevadas de fuente de carbono se afecta el equilibrio de las rutas metabólicas, dando como resultado la acumulación de productos intermedios y la incompleta utilización de la fuente de carbono. En la Tabla 5 se presentan los promedios de las cuatro lecturas de los rendimientos máxicos (producto/sustrato) obtenidos durante la fermentación de *A.niger* C28B25 sobre espuma de poliuretano en función de la concentración de sacarosa y del contenido de humedad inicial del soporte. Los principales productos obtenidos fueron trealosa, fructosa y ácido

oxálico, el ácido cítrico sólo se obtuvo con una concentración sacarosa de 300 mg/g s.s. y con contenidos humedad de 70 % (6 mg/g s.s.) y 76 % (26 mg/g s.s.), el glicerol se detectó con un contenido de humedad de 24 % (14 mg/g s.s.) y 42 % (7 mg/g s.s.), con la misma concentración de sacarosa y con un contenido de humedad de 42 % (13 mg/g s.s.) para una concentración de 400 mg/g s.s., para esta concentración y contenido de humedad se detectó también eritrol (9 mg/g s.s.). Residuos de glucosa se pudieron cuantificar sólo en esta última concentración para contenidos de humedades de 24 % (253 mg/g s.s.) y 42 % (19 mg/g s.s.). Lo que se puede atribuir a que se empleo un medio balanceado y que el pH no sufrió cambios importantes.

Tabla 5. Rendimientos máxicos producto/substrato, para trealosa, fructosa, y ácido oxálico.

Sacarosa inicial (mg/g s.s)	%H	Y _{P/S} (mg/g)		
		Y _{tre/S}	Y _{fru/S}	Y _{Oxa/S}
100	24	120	0	91
	42	276	0	132
	61	214	0	124
	70	198	0	136
	76	122	0	70
	200	24	110	0
42		146	0	0
61		127	0	0
70		158	0	0
76		105	0	0
300	24	0	362	160
	42	85	11	80
	61	102	8	98
	70	62	2	64
	76	16	19	84
400	24	0	192	0
	42	53	1	71
	61	58	4	68
	70	45	8	62

Los valores mostrados en la tabla corresponden al promedio de cuatro lecturas.

5.3.4. pH. En fermentación en medio sólido se dificulta el control del pH durante la fermentación debido principalmente a la naturaleza del proceso, este parámetro se puede controlar en cierta medida empleando mezclas de sales de amonio y urea o con urea únicamente; sin embargo, cuando se emplea la urea existen fluctuaciones en pH de más de una unidad (Nagel y col.,1999). Por otro lado, las mezclas pierden efectividad cuando se emplean concentraciones elevadas de azúcares (Solís-Pereyra y col.,1996). En la figura 12 se presenta los valores finales de pH en función de la concentración de sacarosa y de la humedad inicial. Para todas las concentraciones de sacarosa evaluadas se observa un incremento de pH conforme se incrementa el contenido de humedad y sólo con una concentración de 300 mg/g s.s., disminuye con contenidos de humedad superiores a 70 %. Lo cual se puede atribuir a la presencia de ácido cítrico y oxálico en esta concentración.

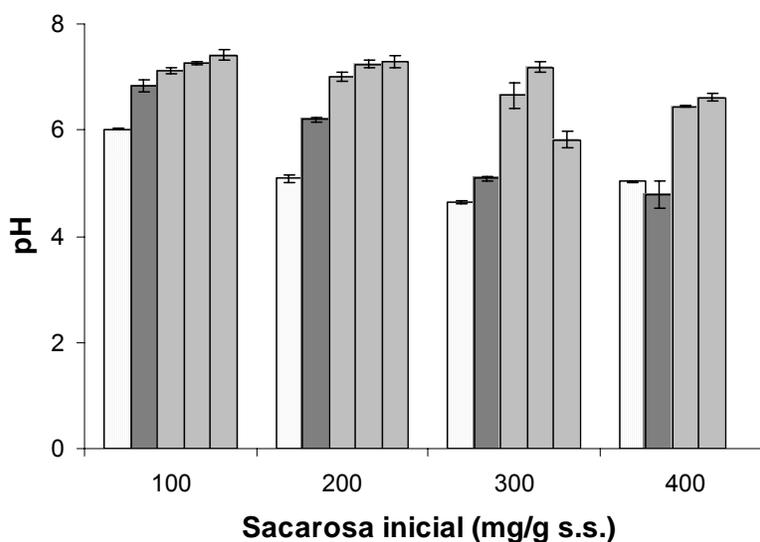


Figura 12. pH final en función de la concentración de sacarosa y humedad iniciales.

(□) 24% (■) 42% (▨) 61% (▧) 70% (⊞) 76%

5.3.5 Conclusiones parciales. La mayor producción de biomasa y de invertasa se alcanza con concentraciones de sacarosa de 400 y 200 mg/g s.s.,

respectivamente. Los mayores rendimientos enzima/substrato se logran con los medios con concentraciones de sacarosa de 200 mg/g s.s. Por otro lado, los mejores rendimientos enzima/biomasa, se alcanzan con una concentración de sacarosa de 100 mg/g s.s., pero esto es debido a la poca producción de biomasa en estos medios. El mayor valor de μ se obtiene con una concentración de sacarosa de 200 mg/g s.s. En pH muestra un comportamiento similar para las concentraciones de 100, 200 y 400 mg/g s.s. Dado que la variable de mayor relevancia en el presente trabajo es la producción de invertasa por *A. niger* en fermentación en medio sólido y que la mayor producción de la enzima se obtuvo con una concentración inicial de sacarosa de 200 mg/g s.s., se decidió utilizar dicha concentración de sacarosa en el estudio del efecto de la atmósfera gaseosa sobre el crecimiento de *A. niger* y la producción de invertasa.

5.4. Efecto de modificarla atmósfera gaseosa sobre el crecimiento de *A. niger* y la producción de invertasa en FMS. El crecimiento y metabolismo de los hongos en fermentación en medio sólido, se ven afectados por variaciones en temperatura, pH, oxígeno disuelto y concentración de nutrientes, por otro lado, el crecimiento y metabolismo de los microorganismos modifica la atmósfera gaseosa, principalmente por el consumo de oxígeno, la producción de CO₂ y en algunos casos metabolitos volátiles. Esta modificación de la atmósfera también puede afectar el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Otra forma mediante la cual el microorganismo modifica el entorno en la fermentación en medio sólido, es la dificultad para liberar el calor metabólico producido. Las limitantes en la transferencia de calor y masa (nutrientes), debidas a la poca conducción del soporte por un lado, y al agua libre presente en el sistema, generan gradientes de calor y masa dentro del sistema (Ikasari y Mitchell, 1998b). La transferencia de oxígeno en fermentación en medio sólido se ve afectada por la concentración del gas en la interfase líquido/gas y por el grosor de la capa líquida que rodea al microorganismo, lo que sugiere que el contenido de humedad del soporte afecta la transferencia de masa (Oostra y col., 2001). Por otro lado, una forma de regular la

transferencia gaseosa en FMS, es mediante el control de la composición de la atmósfera, así como de la velocidad con que ingresan los gases al sistema. Una concentración de CO₂ en la atmósfera mayor a la normal, genera un incremento del ácido carbónico (HCO⁻³) en el citoplasma, produciendo una disminución del metabolismo celular, lo que se traduce en una reducción de la producción de algún metabolito de interés (Ho y Smith, 1986). A pesar de que la remoción de calor metabólico se favorece al incrementar el flujo de aire en los procesos de FMS, la concentración de CO₂ en la fase gaseosa depende tanto de su velocidad de producción como del flujo de aire durante el proceso.

A continuación se presentan los resultados del crecimiento de *A. niger* C28B25 y la producción de invertasa, en una atmósfera con proporciones de O₂/CO₂ de 18.5/2.5 y 16/5 % (v/v).

5.4.1 Efecto de las mezclas gaseosas sobre la producción de biomasa. En FMS se forman dos capas, una aérea en contacto con la atmósfera gaseosa y debajo de ésta una película líquida, el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos ocurre principalmente en esta última (Oostra y col., 2001). El crecimiento de *Aspergillus* puede verse afectado por cambios en la composición de la atmósfera gaseosa, pero este efecto se acentúa si se combina con modificaciones en la a_w y/o temperatura (Kozakiewicz y Smith, 1994). Por otro lado, aun con elevadas concentraciones de biomasa, la profundidad de la fase gaseosa no se afecta, probablemente debido al crecimiento en forma de red por parte de los hongos filamentosos (Auria y col., 1995). En la figura 13 se presentan los valores de biomasa obtenidos al final del cultivo utilizando aire con relaciones de O₂/CO₂ de 21/0, 18.5/2.5 y 16/5% (v/v). En términos generales, se observa una mayor producción de biomasa final al aumentar la concentración de CO₂ en la fase gaseosa. Para cada una de las mezclas evaluadas, se obtiene menor concentración de biomasa final en los medios con mayor contenido de humedad. Analizando la producción de biomasa en función de la atmósfera gaseosa, mediante un análisis de varianza con un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), se

observa que la producción de biomasa difiere significativamente entre las tres mezclas estudiadas. Por otro lado, realizando el mismo análisis para la producción de biomasa ahora en función del contenido de humedad del soporte, para cada mezcla, no se observan diferencias significativas con ningún contenido de humedad. El máximo valor de biomasa obtenido con la mezcla 18.8/2.5% es similar al que se obtuvo con 21/0%, lo que coincide con lo reportado por Ho y Smith (1986), quienes mostraron que con una concentración de 3 % de CO₂ en la atmósfera, no existieron cambios significativos sobre el crecimiento de *Penicillium*, en fermentación en medio líquido en comparación con una atmósfera normal.

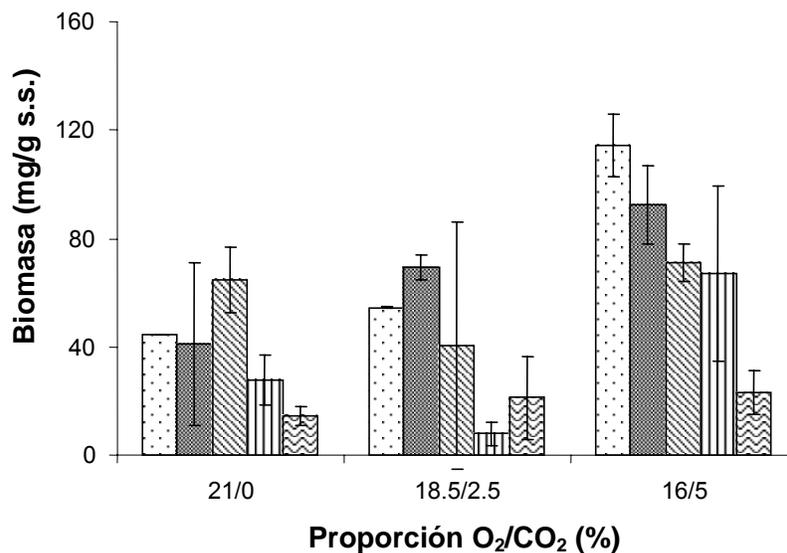


Figura 13 producción de biomasa en función de la mezcla gaseosa en la atmósfera y de la humedad inicial del soporte.

(□) 24%, (■) 42%, (▨) 61%, (▧) 70%, (▩) 76%

Efecto de la composición de la atmósfera sobre la velocidad específica de crecimiento de *A. niger*. En la figura 14 se presenta la velocidad específica de crecimiento para *A. niger* en función de las mezclas gaseosas y de la humedad inicial del soporte. En ella se observa que con una concentración de CO₂ de 2.5 %, la velocidad específica de crecimiento varía únicamente con contenidos de humedad superiores a 61 %, el máximo valor obtenido para esta concentración de CO₂ representa una disminución del 13% en comparación con una concentración

de CO₂ de 0%. Con una concentración de CO₂ de 5 %, la velocidad específica de crecimiento varía únicamente con el menor contenido de humedad estudiado, obteniéndose valores similares a los del control (0 % de CO₂).

Los valores de la velocidad específica de crecimiento en función de la concentración de CO₂ presente en la atmósfera gaseosa difieren significativamente ($\alpha = 0.05$) entre las concentraciones analizadas.

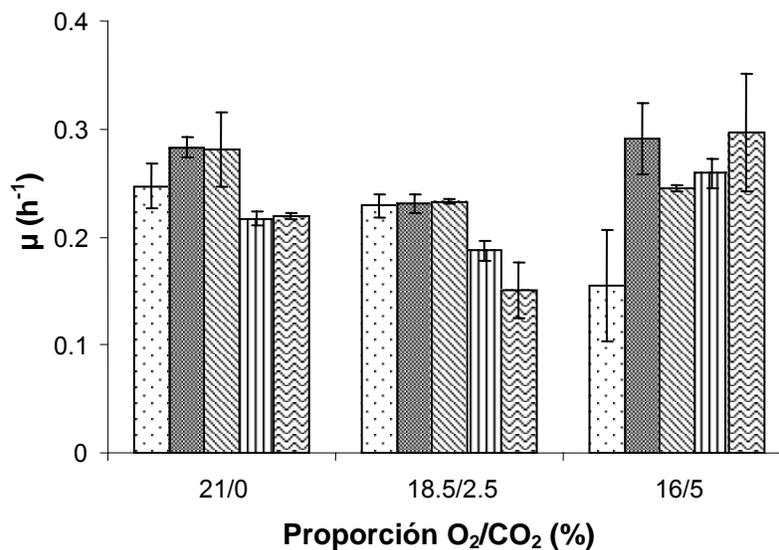


Figura 14 Velocidad específica de crecimiento para *A. niger* C28B25, en función de la mezcla de gases presentes en la atmósfera y del contenido de humedad del soporte (□) 24%, (■) 42%, (▨) 61%, (▧) 70%, (▩) 76%

Efecto de la mezcla de gases sobre la duración de la fase de retardo (lag) en el crecimiento de *A. niger*. En la figura 15 se presenta la duración de la fase lag en función las mezcla gaseosa presente en la atmósfera y del contenido de humedad inicial del soporte en esta figura se puede observar que la duración de la fase lag con una concentración de CO₂ de 2.5% es mayor con el mínimo y el máximo contenido de humedad empleados, cuando la concentración de CO₂ fue de 5 %, la máxima duración de la fase lag se obtiene con un contenido de humedad de 42 %.

En términos generales la duración de la fase lag para ambas concentraciones de CO₂, fue mayor en comparación con las obtenidas en el control (0 % de CO₂).

La duración de la fase lag en función de la concentración de CO₂ presente en la atmósfera no presenta diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) para ambas concentraciones. Con respecto a la duración de la fase lag en función del contenido de humedad del soporte, con 2.5 % de CO₂, sólo se observan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) con los valores mínimo y máximo, con 5 % de CO₂, la duración de la fase lag sólo difiere significativamente con el menor contenido de humedad (24 %).

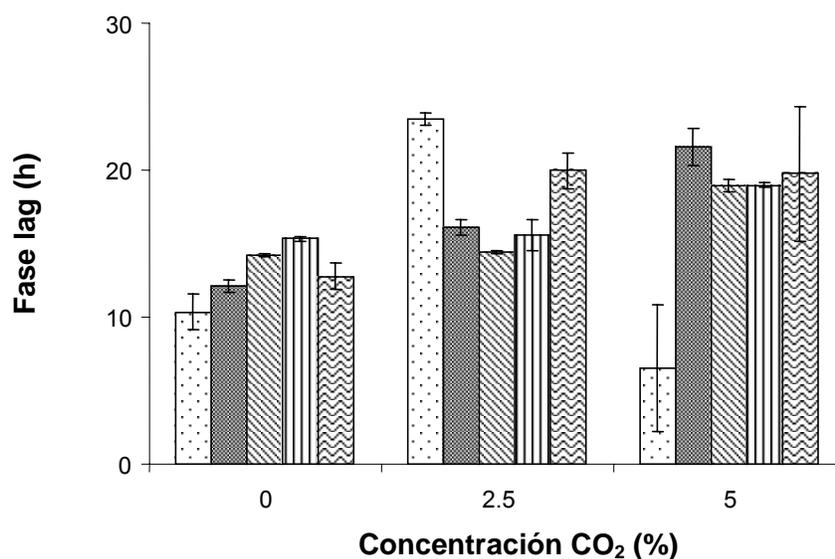


Figura 15 Duración de la fase lag del crecimiento de *A. niger* C28B25, en función de la mezcla gaseosa presente en atmósfera y del contenido de humedad del soporte (□) 24%, (■) 42%, (▨) 61%, (▧) 70%, (▩) 76%

5.4.2 Efecto de la mezcla gaseosa sobre la producción de invertasa. En la figura 16 se presenta la producción de invertasa en función de la mezcla de gases y la humedad inicial del soporte, se observa que con una concentración de CO₂ de 2.5 %, el perfil que presenta la producción de invertasa difiere del observado para las concentraciones de CO₂ de 0 y 5%. Con 2.5%, la producción de invertasa tiende a disminuir de manera gradual conforme se incrementa el contenido de

humedad del soporte, obteniéndose la mayor producción con un contenido de humedad de 24 %, que es menor a lo observado en una atmósfera normal, por otro lado la producción de invertasa pasó de 147 U/g s.s. con 0 % a 111 U/g s.s. con 2.5 %, que significa una reducción del 25 % en comparación con la atmósfera normal.

Cuando la concentración de CO₂ se incrementó a 5%, la máxima producción de invertasa se alcanza con 42 % (123 U/g s.s.) y representa una disminución del 16 % en comparación con la atmósfera normal, pero se incrementa en un 10 % en comparación con la concentración de CO₂ de 2.5 %.

Aún cuando en la figura 16 se observan tendencias definidas para la producción de invertasa en presencia de CO₂ en la atmósfera, el análisis estadístico de los resultados no muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$), para la producción de invertasa entre las concentraciones de CO₂ de 2.5 y 5%, en cuanto al contenido de humedad del soporte sobre la producción de invertasa, para la concentración de CO₂ de 2.5 %, sólo se observan diferencias significativas con contenidos de humedad de 70 y 76 %, no observándose diferencias significativas en el efecto del contenido de humedad del soporte sobre la producción de invertasa para la concentración de CO₂ de 5 %.

La concentración de CO₂ en la atmósfera afecta de manera distinta la producción de enzimas, la producción de amilasa disminuye cuando se incrementa la presión parcial de CO₂ (Bajracharya y Mudgett, 1980); inhibiéndose con concentraciones de CO₂ superiores al 2 % (Ikasari y Mitchell, 1988a), por otro lado, Ikasari y Mitchell (1988a) no observaron diferencias significativas en la producción de proteasas con concentraciones de CO₂ de 18 y 20.5 %, así mismo con 18 % no se afectó la velocidad de producción ni la concentración de amiloglucosidasas; sin embargo, cuando el CO₂ se incrementó a 20.5 %, la velocidad de producción y la concentración final de esta enzima se redujeron, esto en comparación con los resultados obtenidos en una atmósfera normal (Ikasari y Mitchell, 1988a). Para *A. niger* una concentración elevada de CO₂ (8-16%), reduce la concentración final de amiloglucosidasa, prolongando la fermentación.

La disminución en la producción de invertasa atribuible a la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa, en términos generales fue menor al 30 %, que puede considerarse como mínimo, concuerda de manera general con lo reportado en la literatura para la amiloglucosidasa producida por *A. niger* (Ikasari y Mitchell, 1988a), esto nos lleva a considerar que el efecto de la concentración de CO₂ sobre la producción enzimática va a depender del tipo de enzima y/o microorganismo y se va a acentuar si se combina con otros factores.

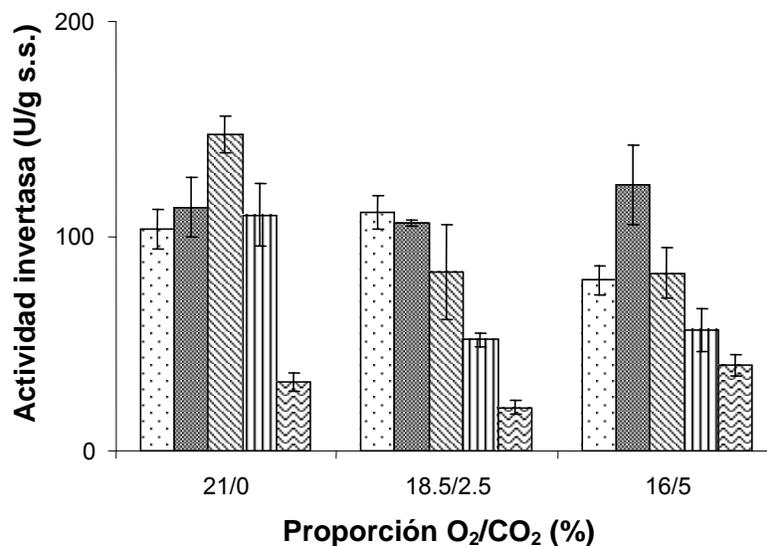


Figura 16 Producción de invertasa en función de la atmósfera gaseosa y de la humedad inicial del soporte
 (□) 24%, (■) 42%, (▨) 61%, (▧) 70%, (▩) 76%

5.4.3 Efecto de la atmósfera modificada sobre el rendimiento enzima/biomasa $Y_{E/X}$. En la figura 17 se presenta el rendimiento enzima/biomasa en función de la mezcla de gases presentes en la atmósfera y de la humedad inicial del soporte, se puede observar que, de manera general, al aumentar la concentración de CO₂ en la atmósfera, los rendimientos disminuyen. Esto es debido a que la concentración de CO₂ tiene un efecto negativo sobre este rendimiento, porque, a pesar de que con una concentración de CO₂ de 5 % se

obtienen los valores mayores de biomasa, no se incrementa la cantidad de enzima producida.

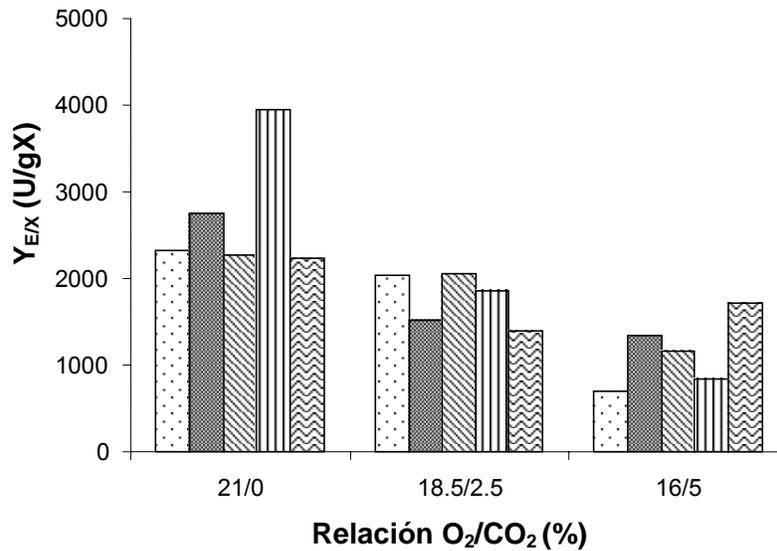


Figura 17 Rendimiento enzima/biomasa en función de la mezcla gaseosa presente en la atmósfera y la humedad inicial del soporte. (□) 24%, (■) 42%, (▨) 61%, (▧) 70%, (▩) 76%

5.4.4 Efecto de la mezcla gaseosa presente en la atmósfera sobre el rendimiento enzima/substrato. En la figura 18 se muestra el rendimiento enzima/substrato en función de la mezcla gaseosa y del contenido inicial de humedad del soporte, en ella se puede observar que con 2.5 % de CO₂, el rendimiento disminuye cuando se incrementa el contenido de humedad del soporte, este comportamiento difiere al encontrado en el control. Al incrementar la concentración de CO₂ a 5%, el rendimiento máximo se alcanza con 42 %.

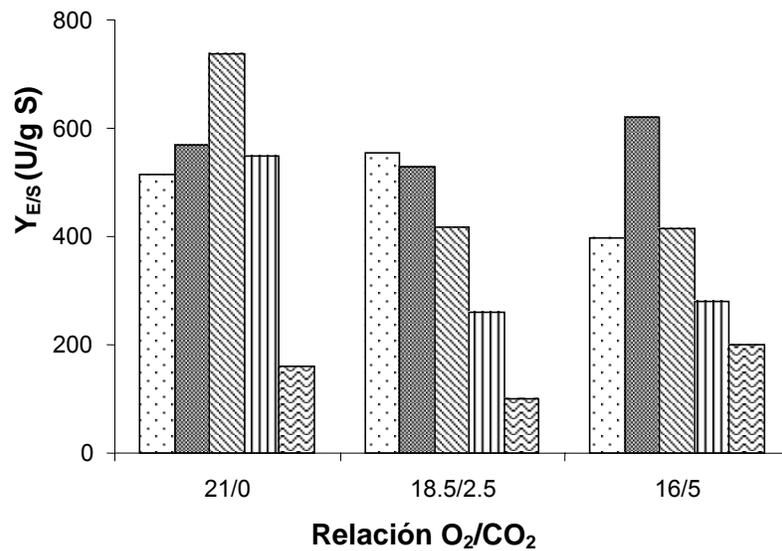


Figura 18 Rendimiento enzima/substrato en función de la composición de la atmósfera y el contenido de humedad del soporte □) 24%, ▒) 42%, ▓) 61%, ▨) 70%, ▩) 76%

5.4.5 Efecto de la composición de la atmósfera gaseosa sobre el pH final.

Representando el pH en función de la composición de la atmósfera gaseosa y la humedad inicial del soporte (Fig. 19), se observa que con una concentración de 2.5 % el pH aumenta conforme se incrementa el contenido de humedad hasta alcanzar el máximo con 61 % de humedad. Por otro lado con una concentración de CO₂ de 5 %, el pH se incrementa con el aumento del contenido de humedad del soporte alcanzando el máximo con 61 % humedad. Obteniéndose valores similares a los que se obtuvieron en una atmósfera normal.

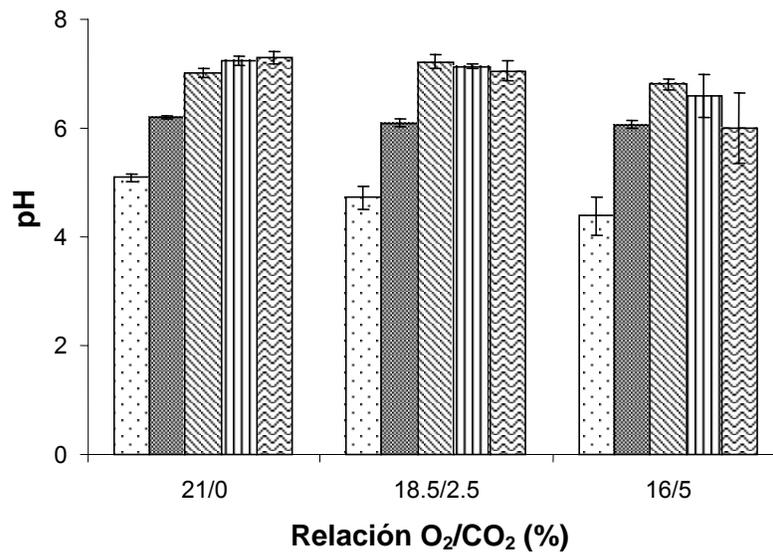


Figura 19 pH final en función de la composición de la atmósfera y del contenido de humedad del soporte.

□) 24%, ▒) 42%, ▓) 61%, ▨) 70%, ▩) 76%

5.4.6 Conclusiones parciales. La mayor producción de biomasa se alcanza con la mezcla de O₂/CO₂ de 16/5 %. La producción de invertasa no varió sensiblemente con las mezclas gaseosas evaluadas. Los máximos valores para μ se obtienen en una atmósfera normal (21/0 %). La duración de la fase lag se incrementa en función del aumento de CO₂ en la atmósfera gaseosa. Los mayores rendimientos enzima/biomasa y enzima/substrato se obtienen en una atmósfera normal. El pH final no varió de manera importante cuando se incrementó la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa.

6 DISCUSIÓN GENERAL

Las respuestas fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos difieren considerablemente dependiendo del sistema de cultivo empleado (sólido o líquido) (Balakrishnan y Pandey, 1996). La FMS tiene varias ventajas, sobre la FML, entre las que destaca el empleo de altas concentraciones de fuente de carbono, sin afectar la producción de metabolitos de interés industrial, como es el caso de la producción de enzimas. Sin embargo, la principal fuente de soportes para este tipo de procesos esta constituida por los subproductos agrícolas, que presentan una serie de desventajas para su aplicación industrial (Ooijkaas y col., 2000). Ante esto se ha planteado en la literatura el empleo de soportes nutricionalmente inertes, embebidos con un medio de composición química definida (Gautan y col., 2002; Romero-Gómez y col., 2000; Solís-Pereira y col., 1996) que permiten entre otras cosas, la evaluación del efecto de los componentes del medio sobre el metabolismo microbiano, la cuantificación de la biomasa por métodos directos, el diseño de medios de cultivo, etc.

A pesar, que esta técnica se emplea para la producción de metabolitos de interés, faltan estudios sobre el efecto combinado de dos o más condiciones de cultivo sobre la producción de estos. Por otro lado, hacen falta también estudios mas detallados sobre el metabolismo de los microorganismos empleados en esto procesos. Debido a lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad invertasa. Así mismo, se evaluó el efecto combinado de incrementar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo con la humedad del soporte, y la modificación de la atmósfera gaseosa evaluada mediante un incremento en la concentración de dióxido de carbono, usando poliuretano como soporte inerte, con un medio de cultivo químicamente definido. Esto permitió determinar la actividad invertasa, que esta regulada de manera sencilla, y permitió cuantificar la producción de biomasa así como determinar las constantes cinéticas.

En este estudio se mostró que el tipo de fuente de nitrógeno tiene un efecto importante sobre la producción de invertasa, que es debido a cambios en el pH del medio como consecuencia de la liberación de iones. Evaluar en profundidad este efecto estuvo fuera de los objetivos de este trabajo, por lo tanto solo se comprobó que existe tal.

También, se mostró que la biomasa producida por *Aspergillus niger* C28B25 presenta un comportamiento similar a lo reportado en la literatura, incrementándose con el aumento de la fuente de carbono, tanto para soportes naturales (Solís-Pereira y col., 1993) como para soportes nutricionalmente inertes (Favela-Torres y col., 1997, 1998; Romero-Gómez y col., 2000). Sin embargo al comparar el valor de biomasa producida con lo reportado para un soporte nutricionalmente inerte distinto al empleado en este estudio, Amberlita IRA 900, se encontraron resultados contrarios, por un lado, el valor de biomasa obtenido con concentraciones de sacarosa de 100 mg/g s.s. (19 mg/g s.s) fue similar al reportado por Auria y col. (1995). Para 200 mg/g s.s. (65 mg/g s.s), este valor fue 18 % menor de lo reportado por Favela –Torres y col. (1998), con 300 mg/g s.s (198 mg/g s.s) y 400 mg/g s.s (216 mg/g s.s) los valores obtenido fueron 2 veces mayores (Auria y col., 1995). Finalmente, el valor obtenido con concentraciones de sacarosa iguales a 100 mg/g s.s. es 50 % menor a lo reportado para PUF en forma de cubos (Romero-Gómez y col., 2000). Esto sugiere que la producción de biomasa en FMS esta influenciada por el tipo y tamaño de partícula del soporte. Cuando se compararon los valores de μ obtenidos para las diferentes concentraciones de sacarosa empleadas, con otro soporte inerte (Amberlita IRA 900) se encontró que para 100 mg/g s.s este valor (0.24 h^{-1}) fue 30 % y 40 % menor a lo reportado, con 200 mg/g s.s, por un lado el valor de μ (0.28 h^{-1}) fue 18 % mayor a lo reportado por Favela-Torres y col. (1998) pero 12 % menor a lo reportado por Auria y col. (1995). Para 300 mg/g s.s el valor obtenido (0.26 h^{-1}) fue similar al reportado por Auria y col. (1995), finalmente el valor de este parámetro (0.20 h^{-1}) obtenido con 400 mg/g s.s fue 20 % menor a lo reportado (Auria y col., 1995). Así mismo, el comportamiento observado de μ en este trabajo difiere a lo

reportado (Favela-Torres y col., 1998; Auria y col., 1995). Este comportamiento o bien sugiere que durante nuestro estudio, dicho parámetro se vio afectado no sólo por la concentración de sacarosa sino también por el contenido de humedad del soporte, o se trata de una particularidad del sistema de fermentación empleado.

La biomasa obtenida en los experimentos, con atmósferas modificadas, no varía, más aún se incrementa, conforme aumenta la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa, lo que mostraría que el incremento de CO₂ en la atmósfera por si solo no representa un factor de estrés para el hongo en este sistema. Por otro lado, el incremento de CO₂ en la atmósfera si influye sobre el comportamiento de μ , sin embargo, debido a la falta de reportes previos en la literatura que muestren el efecto de este gas sobre este parámetro en FMS, no se pudo comparar. En cuanto a la duración de la fase lag, no se encontraron reportes en la literatura, que relacionaran este parámetro con la concentración de la fuente de carbono, o con el incremento en la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa.

Para la producción de invertasa, los resultados muestran que se favorece con un incremento en la concentración de sacarosa, lo que concuerda con lo reportado en la literatura, para soportes naturales (Solis-Pereira, 1993, 1996). Sin embargo, el aumento en la producción de invertasa no se mantiene conforme se incrementa la concentración de sacarosa en el medio, al contrario, disminuye con concentraciones superiores a 200 mg/g s.s. Pero, no existen reportes sobre la producción de invertasa con concentraciones de sacarosa superiores a 100 mg/g s.s, lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos. Así mismo, Lo anterior sugiere que la producción de enzimas en FMS, es afectada por el tipo y geometría del soporte junto con otros parámetros (Tipo y concentración de fuente de carbono, contenido de humedad del soporte, etc). Finalmente, el incremento en la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa no afectó de manera sensible la producción de invertasa en este sistema de fermentación. En cuanto al rendimiento enzima/biomasa, sólo se puede comparar con la literatura el obtenido

con una concentración de sacarosa de 100 mg/g s.s. siendo 3.6 (Romero-Gómez, 2001) y 1.2 (Montiel-González y col., 2004) veces mayor.

El empleo de poliuretano puede resultar un avance significativo para el estudio de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. Se trata de un medio limpio que permite el estudio directo de la formación de biomasa y la síntesis de hidrolasas.

En este trabajo se comprobó el efecto de elevadas concentraciones de sacarosa, contenido de humedad del soporte e incremento en la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa sobre la producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido, usando como soporte inerte al poliuretano, que es un sistema limpio, barato y de fácil preparación en el laboratorio. Al mismo tiempo este trabajo representa un esfuerzo encaminado hacia el estudio científico de los fenómenos de transferencia de masa ligados a la fermentación en medio sólido, que permitirán el estudio del efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento, inducción y producción de enzimas.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten formular las siguientes conclusiones:

- I. Las condiciones seleccionadas para los ensayos enzimáticos fueron una temperatura de 50 ° C, un pH de 4.5 con un buffer de citratos con un tiempo de reacción de 10 minutos.
- II. El tipo de fuente de nitrógeno tiene un efecto importante sobre la producción de invertasa obtenida por fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte, que se observa como una disminución en la actividad enzimática, debida a la acidificación del medio.
- III. El incremento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, no inhibe el crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte inerte, más aún estimula la producción de biomasa.
- IV. La mezcla gaseosa con una composición (O₂/CO₂) de 16/5 % tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* en el mismo sistema de fermentación.
- V. La máxima producción de invertasa (147 U/g s.s.) por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte se obtiene con concentraciones de sacarosa de 200 mg/g s.s.
- VI. No se observan diferencias significativas en la producción de invertasa con las mezclas gaseosas empleadas.

8. PERSPECTIVAS

En este trabajo se presentaron los resultados de la interacción de tres condiciones ambientales de importancia capital en fermentación en medio sólido, concentración de fuente de carbono, contenido de humedad del soporte y concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa, sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* y la producción de invertasa, empleando espuma de poliuretano como soporte inerte.

Entre los trabajos a desarrollarse, para el mejor desarrollo de las ideas planteadas en esta tesis se encuentran la comparación de diferentes soportes naturales y sintéticos, la evaluación del tamaño de partícula sobre el crecimiento microbiano y la producción enzimática, el empleo de mayores concentraciones de CO₂ en la atmósfera gaseosa, el uso de atmósferas enriquecidas con oxígeno, el estudio de los patrones de represión y síntesis enzimática, un análisis morfológico del microorganismo sujeto a estas condiciones de cultivo.

Todo lo anterior con el fin de sustentar la importancia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento microbiano y la síntesis enzimática en sistemas de fermentación en medio sólido, para hacer de esta un proceso viable de aplicación industrial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña-Argüelles, M.E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniestra-Gonzalez, G., Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**: 808-814.
2. Al-Asheh, S., Duvnjak, Z. (1994). Effect of glucose concentration on the biomass and phytase production and the reduction of the phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid-state fermentation process. *Biotechnology Progress*, **10**: 353-359.
3. Arora, D.K., Mukerji, K.G., Marth, I. edit. (1991). *Handbook of applied mycology. Vol. 3. Food and Feeds. Cap.15. pp. 445-449* Marcel Dekker Inc.
4. Ashok, K.B., Kayal, V.N., Gunasekaran, P. (2001). Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **36**: 1241-1247.
5. Auria, R., Ortiz, I., Villegas, E., Revah, S. (1995). Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations. *Process Biochemistry*, **8**: 751-756.
6. Bajracharya, R., Mudgett, R.E. (1980). Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. *Biotechnology and bioengineering*, **22**: 2219-2235.
7. Balakrishnan, K., Pandey, A. (1996). Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**: 365-372.
8. Bellon-Maurel, V., Orliac, O., Christen, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, **38**: 881-896.

9. Cuezco de Ginés, S., Maldonado, M.C., Front de Valdez, G. (2000). Purification of invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100. *Current Microbiology*, **40**: 181-184.
10. Chaudhuri, A., Bharadwaj, G., Maheshwari, R. (1999). An unusual pattern of invertase activity development in the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *FEMS Microbiology Letters*, **177**: 39-45.
11. Chávez, F.P., Rodríguez, L., Díaz, J., Delgado, J.M., Cremata, J.A. (1997). Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases. *Journal of Biotechnology*, **53**: 67-74.
12. Chen, W., Liu, C. (1996). Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **18**:153-160.
13. De la Vega, M.G., Cejudo, F.J., Paneque, A. (1991). Purification and properties of an extracellular invertase from *Azotobacter chroococcum*. *Enzyme and Microbial Technology*, **13**: 267-271.
14. Decker, C.H., Visser, J., Schreier, P. (2000). β -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**: 4929-4936.
15. Domínguez, A., Rivela, I., Couto, S., Sanromán M.A. (2001). Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. *Process Biochemistry*, **37**: 549-554.
16. Duran, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**: 113-125.
17. Durand, A., Renaud, R., Maratray, J., Almanza, S., Diez M. (1996). INRA-Dijon reactor for solid state fermentation: designs and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**: 317-332.

18. Favela-Torres, E., Cordova-López, J., Garcia-Rivero, M., Gutiérrez-Rojas M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, **33** (2): 103-107.
19. Favela-Torres, E., García-Rivero, M., Cordova-López, J., Roussos, S., Viniegra-González, G., Gutiérrez-Rojas, M., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P., Huerta-Ochoa, S. (1997). Kinetics of *Aspergillus niger* growth at high glucose concentrations in different types of the culture. En *Advances in solid state fermentation* Cap 5: Pp. 49-58. Edit. Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. Kluwer Academic Publishers.
20. Feng, K.C., Liu, B.L., Tzeng, Y.M. (2000). *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering*, **23**: 25-29.
21. Ferreira, G., Boer, C.G., Peralta R.M. (1999). Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamari* in solid state fermentation. *FEMS Microbiology Letters* **173**: 335-339.
22. Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R. (2002). Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support. *Bioresource Technology*, **83**: 229-233.
23. Gervais, P., Bensoussan, M. (1994). Solid-state fermentation of the genus *Aspergillus*. En *Aspergillus* Cap. 5 Pp. 101-140. Edit. Smith, J.E. Plenum Press.
24. Gervais, P., Marechal. P.A., Mollin, P. (1996). Water relations of solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**: 347-357.
25. Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., Bensoussan, M. (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**: 457-463.

26. Gervais, P., Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering journal*, **13**: 85-101.
27. Ghildyal, N.P., Gowthaman, M.K., Raghavara Rao, K.S.M.S., Karanth, N.G. (1994). Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentor: effect of temperature gradients. *Enzyme and Microbial technology*, **16**: 253-257.
28. Ho, C.S., Smith, M.D. (1986). Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin fermentations: mycelial growth and penicillin production. *Biotechnology and bioengineering*, **28**: 668-677.
29. Hoogschagen, M., Zhu, Y., As, H., Tramper, J., Rinzema, A. (2001). Influence of wheat type and pretreatment on fungal growth in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* **23**: 1183-1187.
30. Ikasari, L., Mitchell, D.A. (1998a). Mimicking gas and temperature changes during enzyme production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, **20** (4): 349-353.
31. Ikasari, L., Mitchell, D.A. (1998b). Oxygen uptake kinetics during solid state fermentation with *Rhizopus oligosporus*. *Biotechnology Techniques*, **12** (2): 171-175.
32. Kalogeris, E., Fountoukides, G., Kekos, D., Macris, B.J. (1999). Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. *Bioresource Technology*, **67**: 313-315.
33. Klich M.A, Bennet, J.W. (edit). (1992). Ecology of the *Aspergilli* of solid and litter. *Aspergillus: Biología y Aplicaciones industriales*. Ed. Butterworth-Heinemann. Cap.15.
34. Koutinas, A.A., Wang, R., Webb, C. (2003). Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. *Biochemical Engineering Journal*, **14**: 93-100.

-
35. Kozakiewicz, Z., Smith, D. (1994). Physiology of *Aspergillus*. En *Aspergillus* Cap. 2 Pp. 23-40. Edit. Smith, J.E. Plenum Press.
36. L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., Xu, S. (2000). Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *Journal of Biotechnology*, **81**: 73-84.
37. Larroche, C. (1996). Microbial growth and sporulation behaviour in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**: 408-423.
38. Larroche, C., Moksia, J., Gros J.B. (1998). A convenient method for initial dry weight determination in samples from solid state cultivations. *Process Biochemistry*, **33**(4): 447-451.
39. Levonen-Muñoz, E., Bone, D.H. (1985). Effect of different gas environments on bench-scale solid state fermentation of oat straw by white-rot fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**: 382-387.
40. Loera, O., Aguirre, J., Viniegra -Gonzalez, G. (1999). Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**: 103-108.
41. Lonsane, B.K., Saucedo-Castañeda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., Krishnaiah, M.M. (1992). Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry*, **27**: 259-273.
42. Lu, W., Li, D., Wu, Y. (2003). Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. *Enzyme and Microbial technology*, **32**: 305-311.
43. Marsh, A., Mitchell, D.A., Stuart, D.M., Howes, T. (1998). O₂ uptake during solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor. *Biotechnology Letters*, **20**: 607-611.

-
44. Mátrai, T., Mayer, S., Kókai, S., Salamon, I. (2000) Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Food Microbiology*, **61**: 187-191.
45. Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W., Burton, A.L. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, **2**: 127-132.
46. Mitchell, D.A., Meien, O.F., Luz Jr, L.F., Krieger, N. (2002). Evaluation of productivity of zymotis solid-state bioreactor based on total reactor volume. *Food Technology and Biotechnology*, **40**(2): 135-144.
47. Mitchell, D.A., Lonsane, B.K. (1992) Definition, characteristics and potential. En Solid substrate cultivation. Cap 1. Pp. 1-16. Edit. Doelle, H., Mitchell, D.A., Rolz, C.E. Elsevier applied science.
48. Mitra, P., Chakraverty, R., Chandra, A.L. (1996). Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation: an overview. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**: 439-442.
49. Montiel-González, A.M., Fernández, F.J., Viniegra-Gonzalez, G., Loera, O. (2002). Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **102**: 63-70.
50. Montiel-González, A.M., Fernández, F.J., Viniegra-Gonzalez, G., Loera, O. (2004) Effect of water activity on invertasa production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* en prensa.
51. Mukherjee, K., Sengupta, S. (1985). The production of constitutive invertasa and inulinase by mushroom *Panaeolus papillonaceus* in submerged culture *Canadian journal of Microbiology*, **31**:773-777.

-
52. Nagao, N., Matsuyama, T., Yamamoto, H., Toda T. (2003). A novel Hybrid system of solid state and submerged fermentation with recycle for organic solid waste treatment. *Process Biochemistry*, **39**: 37-43.
53. Nagel, F. J., Oostra, J., Tramper, J., Rinzema, A. (1999). Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH nutrients and buffer on fungal growth rate. *Process Biochemistry*, **35**: 69-75.
54. Nakadai, T., Nasumo, S. (1988). Culture conditions of *Aspergillus oryzae* for production of enzyme preparation. *Journal of Fermented Technology*, **66** (5): 525-533.
55. Nandakumar, M.P., Thakur, M.S., Raghavarao, K.S.M.S., Ghildyal, N.P. (1999). Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Letter in Applied Microbiology*, **29**: 380-384.
56. Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T., Atthasampunna, P., Taguchi, H. (1984). Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermented Technology*, **62** (5): 453-459.
57. Nguyen, Q.D., Mattes, F., Hoschke, Á., Rezessy-Szabo, J., Bhat, M.K. (1999). Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. *Biotechnology Letters*, **21**: 183-186.
58. O'Mullan, P.J., Chase, T., Eveleigh, D.E. (1992). Purification and some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**: 341-346.
59. Ooijkaas, L.P., Weber, J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, **18**: 356-360.

-
60. Oostra, J., Comte, E. P., Heuvel, J.C., Tramper, J., Rinzema, A. (2001). Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **74**: 13-24.
61. Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S, Viniestra, G. (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **27**: 498-503.
62. Pandey, A. (1992). Recent process development in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **27**: 109-117.
63. Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**: 81-84.
64. Pandey, A., Ashakumary, L., Selvakumar, P., Vijayalakshmi, K.S. (1994). Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glycoamylase production in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **10**: 485-486.
65. Pandey, A., Selvakumar, P., Ashakumary, L. (1996). Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. *Process Biochemistry*, **31**(1): 43-46.
66. Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Ningam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, **77** (1): 149-162.
67. Piccoli-Valle, R.H., Passos, F.J.V., Brandi, I.V., Peternelli, L.A., Silva, D.O. (2003). Influence of different mixing and aeration regimens on pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*. *Process Biochemistry*, **38**: 849-854.
68. Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V., Karanth, N.G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**: 127-135.

-
69. Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, **1**(3): 1-15.
70. Robinson, T., Singh, D., Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**: 284-289.
71. Rodríguez, J., Perez, J. A., Ruiz, T., Rodríguez, L. (1995). Characterization of the invertase from *Pichia anomala*. *Biochemical Journal*, **306**: 235-239.
72. Romero-Gómez, S.J., Augur, C, Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, **22**: 1255-1258.
73. Romero-Gómez, S.J. (2001). Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación líquida y fermentación sólida. Tesis de doctorado. Universidad Autonoma Metropolitana. Mexico.
74. Rubio, M.C, Maldonado, M.C. (1995). Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Current Microbiology*, **31**: 80-83.
75. Samson, R.A. (1992). Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. J.W., Klich, M.A editors. *Aspergillus: Biología y aplicaciones industriales*. Edit. Butterworth-Heinemann. Cap.16.
76. Samson, R.A. (1994). Taxonomy-current concepts of *Aspergillus* sytematics. En *Aspergillus* Cap. 1 Pp. 1-23. Edit. Smith, J.E. Plenum Press.
77. Sangsurasak, P., Nopharatana, M., Mitchell, D.A. (1996). Mathematical modelling of the growth of filamentous fungi in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**: 333-342.

-
78. Schutyser, M.A.I., Weber, F.J., Briels, W.J., Rinzema, A., Boom, R.M. (2003). Heat and water transfer in rotating drum containing solid substrate particles. *Biotechnology and Bioengineering*, **82**: 552-563.
79. Selvakumar, P., Ashakumary, L., Pandey, A. (1996). Microbial synthesis of starch saccharifying enzyme in solid cultures. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**: 443-449.
80. Shankaranand, V.S., Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. (1992). Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochemistry*, **27**: 33-36.
81. Smith, J.E., Pateman, J.A. (1977). *Genética y fisiología de Aspergillus*. Academic Press, pp.1-80.
82. Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P., Viniegra-González, G. (1996). Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12**: 257-260.
83. Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **39**: 36-41.
84. Turner, N.A., Vulfson E.N. (2000). At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**: 108-113.
85. Viccini, G., Mitchell, D.A., Boit, S.D., Gern, J.C., Rosa, A.S., Costa, R.M., Dalsenter, F.D.H., Meien, O.F., Krieger, N. (2001). Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, **39** (40): 1-23.

86. Viccini, G., Mitchell, D.A., Krieger N. (2003). A model for converting solid state fermentation growth profiles between absolute and relative measurement bases. *Food Technology and Biotechnology*, **41**(3): 191-2001.
87. Vorster ,D.J., Botha, F.C. (1998). Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase. *Phytochemistry*, **49** (3): 651-655.
88. Zech, M., Görish, H. (1995). Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: Reversible inactivation by components of industrial molasses media. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**: 41-46.

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD CRÍTICA DE LA ESPUMA DE POLIURETANO

La humedad crítica se define como el punto de intersección entre las curvas de secado a velocidad constante y a velocidad decreciente, para obtenerla primero se gráfica la pérdida de agua del soporte (g H₂O /g s.s.) en función del tiempo (minutos) como se muestra en seguida (Fig. 20) en donde se observa que después de 25 minutos no existe variación en el contenido de humedad del soporte. Posterior a esto se obtiene la velocidad de secado (g H₂O/ g s.s. min) y se gráfica en función del contenido de humedad del soporte (g H₂O/ g s.s.) esto se muestra en la figura 21 en donde se pueden observar el secado a velocidad constante y a velocidad decreciente Para obtener el valor numérico de la humedad crítica las curvas de velocidad se ajustan a una línea recta y el punto de intersección se calcula igualando las dos ecuaciones.

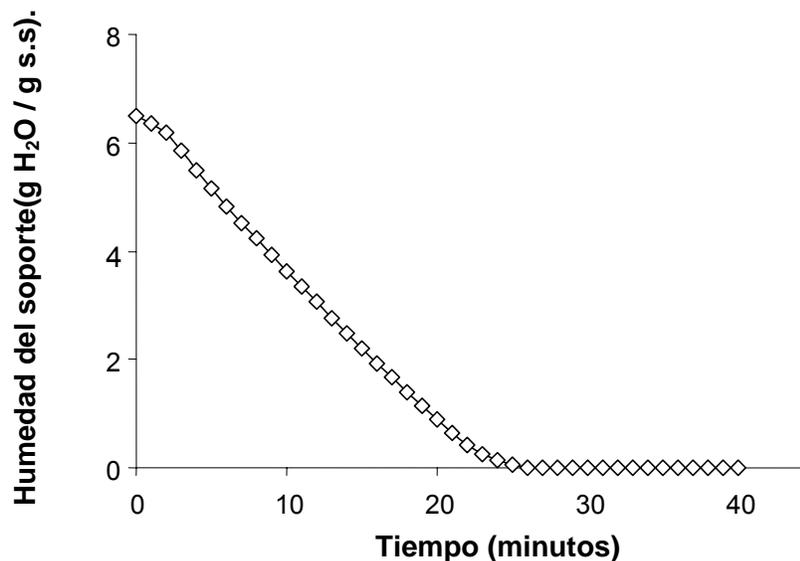


Figura 20 pérdida de agua del soporte en el tiempo

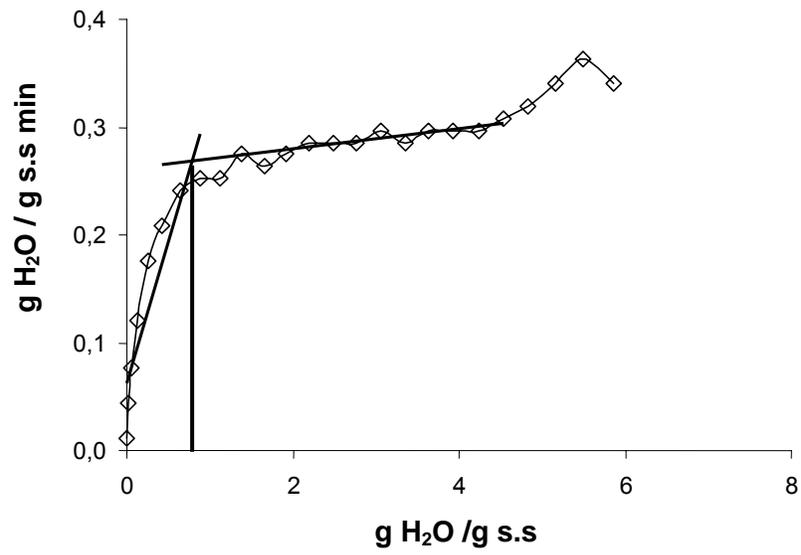


Figura 21 Curva de secado para el poliuretano a 130 ° C

ANEXO 2

ORDEN DE ELUSIÓN DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS POR *A. niger* EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON ESPUMA DE POLIURETANO COMO SOPORTE

Para determinar los metabolitos producidos por *A. niger* C28B25 en fermentación en medio sólido con soporte inerte, el extracto de la fermentación se paso a través de una columna de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Determinándose el orden de elusión de cada compuesto, que se logró comparando los tiempos de retención de cada pico de la mezcla con estándares individuales de cada compuesto, en la siguiente tabla (tabla 6), se muestra el orden de elusión de cada estándar individual así como su tiempo de retención. Por otro lado se comprobó la linealidad del método corriendo estándares de la mezcla con concentraciones de 0.5 g/L a 4 g/L, con intervalos de 0.5 g/L, bajo las mismas condiciones que los estándares individuales.

Tabla 6 Orden de elusión y tiempo de retención de los metabolitos producidos por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte

Compuesto	Tiempo de retención
Ácido oxálico	8.687
Trealosa	9.743
Ácido cítrico	10.33
Sacarosa	11.41
Glucosa	11.45
Fructosa	12.39
Eritrol	14.22
Glicerol	15.8