



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
INVERTASA POR *Aspergillus niger* EN FERMENTACIÓN
SÓLIDA, LÍQUIDA, Y SUMERGIDA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

HUMBERTO CADENA VEGA

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
INVERTASA POR *Aspergillus niger* EN FERMENTACIÓN
SÓLIDA, LÍQUIDA, Y SUMERGIDA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

HUMBERTO CADENA VEGA

DIRIGIDA POR

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODALES

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODAL

Dr. JUAN CAMPOS GUILLÉN

SINODAL

M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA

SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A mí, por comenzar a cerrar ciclos en mi vida.

A mis padres, Guadalupe y Humberto, por enseñarme que los objetivos deben cumplirse con, sin y a pesar de las circunstancias, por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida y que gracias a ellos he llegado a donde estoy.

A mi hermano, Roberto, por estar siempre a mi lado, por todo el apoyo que me ha brindado y demostrarme como siempre que es mi mejor compañero.

A la universidad, por darme las herramientas para cumplir uno de mis principales objetivos en la vida.

Al Dr. Sergio Romero por ese apoyo no solo dentro del aula de clases, quien estuvo desde mi primera clase en la carrera, hasta la titulación.

A los doctores Juan campos, Laura Berumen y Beatriz Álvarez, por brindarme su apoyo en este proyecto.

A mis profesores en general, por todos los aprendizajes brindados durante la carrera.

A mis amigos Lety, Alma y Camilo, quienes, de una forma u otra me han ayudado a cumplir mis metas y han estado cuando los he necesitado.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

ÍNDICE GENERAL

i

INDICE DE CUAROS

iv

INDICE DE FIGURAS

v

RESUMEN

1. ANTECEDENTES

1

1.1 Hongos filamentosos

1

1.1.1 Aspergillus niger

3

1.1.2 Regulación de la síntesis de enzimas por hongos

4

1.1.3 Metabolismo aeróbico

8

1.2 Sacarosa

9

1.3 Invertasa

9

1.4 Fermentación líquida

11

1.5 Fermentación sólida

12

1.6 Fermentación sumergida

14

1.7 Diferencias entre fermentación sólida, líquida y sumergida

15

1.8 Poliuretano

16

1.9 Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

18

1.10 Justificación

18

2. HIPÓTESIS

19

i

3. OBJETIVOS	20
3.1 General	20
3.2 Específicos	20
4. METODOLOGÍA	21
4.1 Materiales	21
4.1.1 Ceba	21
4.1.2 Poliuretano	21
4.1.3 Incubadora	21
4.1.4 Espectrómetro	21
4.1.5 Potenciómetro	21
4.1.6 Microscopio óptico	21
4.1.7 Medios de cultivo	22
4.2 Métodos	22
4.2.1 Fermentación líquida	22
4.2.2 Fermentación sólida	22
4.2.3 Fermentación sumergida	22
4.2.4 Determinación de la biomasa en fermentación líquida	22
4.2.5 Determinación de la biomasa en fermentación sólida	23
4.2.6 Determinación de la biomasa en fermentación sumergida	23
4.2.7 Determinación de pH	23
4.2.8 Extracción de enzimas	23

4.2.9 Extractos Intracelulares	24
4.2.10 Ensayos Enzimáticos	24
4.2.11 Cuantificación de proteína	24
4.3. Análisis estadístico	24
4.4 Diseño experimental	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Biomasa.	26
5.2 pH.	29
5.3 Actividad enzimática	31
5.3.1 Actividad enzimática intracelular	33
5.4 Proteína	36
5.4.1 Proteína intracelular.	38
6. DISCUSIÓN	42
7. CONCLUSIONES	46
8. REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Biomasa, producción enzimática, y productividad por gramo de biomasa.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Comparación del tipo de crecimiento de biomasa producida a 24 horas.	26
2	Comparación del tipo de crecimiento de biomasa producida a 60 horas.	27
3	Producción de biomasa.	28
4	Cinética de pH en los cultivos.	29
5	Comparación de actividad enzimática en cultivos.	31
6	Comparación de actividad enzimática intracelular.	33
7	Productividad de proteína extracelular en cultivos.	36
8	Productividad de proteína intracelular en cultivos.	38
9	Esquema de secreción de hidrolasas por hongos filamentosos.	43

RESUMEN

El uso de enzimas en procesos industriales es de gran importancia, por lo que una producción eficiente y rápida es una prioridad, el cultivo sólido ha demostrado producir las cantidades requeridas, sin embargo este tipo de fermentación implica diversas complicaciones de producción, por lo que se propone que un cultivo sumergido eliminaría estas complicaciones y tendría una producción similar a la del cultivo sólido, en este trabajo se comparó la producción de la enzima invertasa (sacarasa o β fructo-furanosidasa) por una cepa silvestre de *Aspergillus niger* N402 usando sistemas de cultivo líquido, sólido y sumergido. Se utilizó espuma de poliuretano como soporte inerte para fermentación sólida y sumergida, el cual se propone como un sistema modelo para el estudio de las diferencias entre fermentación sólida, líquida y sumergida. Se midieron los siguientes parámetros fisiológicos: la velocidad específica de crecimiento del organismo (μ), el nivel máximo de la biomasa (X_{max}), el rendimiento de biomasa por gramo de sustrato consumido ($Y_{X/S}$), el rendimiento enzimático por gramo de biomasa producida ($Y_{E/X}$) y la productividad de la enzima enzimática (P). Los resultados obtenidos en fermentación sólida, la biomasa producida es mayor que en fermentación líquida, aunque el consumo de sustrato fue muy similar en ambos medios. Los niveles máximos de la invertasa son mucho mayores en fermentación sólida que los obtenidos por fermentación líquida, los cultivos de *Aspergillus niger* en medio líquido produjeron agregados esféricos o "pellets" que son la forma macroscópica característica en este medio. Pero en medio sólido, este organismo creció en forma de un micelio disperso adherido en parte a las trabéculas del polímero y en parte en forma de micelio aéreo en contacto directo con la fase gaseosa, mientras que en el medio sumergido tuvo una producción de biomasa ligeramente superior que el cultivo líquido que a su vez este aumento es consistente con el aumento de la invertasa producida y así los beneficios principales de este método son la facilidad de producción y una posibilidad de escalar el experimento a niveles industriales.

1. ANTECEDENTES

El mercado de enzimas utilizadas en procesos industriales representa alrededor de mil millones de dólares anuales y los hongos filamentosos contribuyen con el 40% del total, se trata de un mercado en expansión, sobre todo por el desarrollo de nuevos procesos que utilizan enzimas conocidas y por la aplicación de enzimas nuevas en procesos conocidos (Visser y col., 2011; Nevalainen y col, 2015).

La mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales se producen por fermentación líquida (FL), pero en los últimos años se han desarrollado sistemas alternativos para la producción de enzimas por hongos filamentosos, como la fermentación sólida (FS). Este sistema de cultivo es más productivo que la FL, e imparte características interesantes al cultivo y a las enzimas producidas (Singhania y col., 2009; Viniegra-González, 2003).

En este trabajo se busca comparar los distintos tipos de fermentación y su relación con la producción de enzima invertasa.

1.1 Hongos filamentosos

Los hongos son organismos eucariontes, que se caracterizan por ser inmóviles, presentar talos, que pueden ser estructuras ramificadas llamadas micelios o cuerpos más compactos denominados basidiocarpos, en lugar de tejidos. Los hongos no realizan la fotosíntesis pues son heterótrofos que viven a partir de la materia orgánica producida por otros organismos. Pueden reproducirse por esporas o por medio de la ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas. Una hifa es una estructura cilíndrica que consta de una pared celular que recubre a una membrana en cuyo interior pueden existir uno o varios núcleos. Además, pueden tener septos que son paredes internas que cortan la continuidad del citoplasma dentro de la hifa y en algunos casos estos septos pueden presentar poros que permiten el paso del citoplasma, incluyendo a sus organelos, estableciendo así, la continuidad citoplásmica dentro de la hifa. Las hifas crecen por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación. En los extremos de estas células es donde se lleva

a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de substratos complejos (Herrera y Ulloa, 2005).

Los hongos filamentosos son comúnmente observados como el crecimiento que aparece sobre las frutas y los alimentos donde se les da el nombre de moho. El término moho es un nombre común que carece de significado taxonómico y se aplica a una variedad de hongos que crecen como organismos semi-microscópicos, cuyo micelio tiende a formar una red suelta en lugar de un tejido denso. Es en esto en que los mohos u hongos filamentosos se distinguen de los grandes hongos carnosos, como las setas comestibles o los champiñones. Los mohos pueden pertenecer a cualquier clase de hongo, pero la mayoría de las especies son Ficomicetos u hongos imperfectos (Deuteromicetos). Los hongos filamentosos se reproducen por esporas o conidias y se distinguen por las características de los tallos que soportan las esporas y los conidióforos. En los *Aspergillus* el conidióforo se eleva a partir de una célula del micelio vegetativo, llamada célula pie, que tiene una pared más gruesa que la del micelio vegetativo. El tallo del conidióforo no está septado y termina en una parte hinchada llamada vesícula. A partir de esta expansión las conidias se forman en cadenas de esporas cuyo segmento inicial se denomina *sterigmata*. En ocasiones la *sterigmata* está ramificada y las esporas que se alzan a partir de las ramificaciones se denominan *sterigmata* secundarias. Las esporas maduras se dispersan en el ambiente y en condiciones adecuadas dan origen a otra colonia de hongos, y cuando las esporas se esparcen comúnmente se mantiene vacío, es decir no contiene protoplasma (Herrera y Ulloa, 2005).

Taxonómicamente los hongos están agrupados en el reino Fungí, la clasificación dentro del reino es complicada y se basa principalmente en el tipo de estructuras reproductoras que se forman tanto en los ciclos sexuales como asexuales. En forma más precisa: la presencia de ciclo sexual, el tipo de estructuras reproductoras, el número de grupos de complementación y la presencia o ausencia de septos, son los principales caracteres para clasificar a los hongos en tres grandes grupos, a saber:

Myxomycota (hongos mucilaginosos), *Eumycota* (hongos verdaderos) y *Lichens* (hongos simbioses). El grupo *Eumycota* se divide a su vez en cuatro grupos que son *Ascomycetos*, *Basidiomicetos*, *Ficomicetos* y *Deuteromicetos* (Herrera y Ulloa, 2005).

Los Ascomycetos y los Deuteromicetos son hongos filamentosos, de estos últimos el género más abundante es *Aspergillus*. En su mayoría no forman cuerpos fructificantes o basidiocarpos, sino que crecen exclusivamente en forma de micelios. Han sido considerados por largo tiempo organismos ideales para el estudio de las características fisiológicas y genéticas de los eucariontes debido a su fácil manipulación en laboratorio, su capacidad para crecer en medios químicamente definidos de bajo costo y a su rapidez de crecimiento que permite obtener varias generaciones en poco tiempo. Además de que, tradicionalmente, se han utilizado a algunos de estos microorganismos para fermentar alimentos y como productores de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Wessels, 1999).

1.1.1 *Aspergillus niger*

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

Tal es el caso de *Aspergillus nidulans* que presenta ciclo sexual por lo que sería más adecuado llamarle *Emericela nidulans*. Sin embargo, la mayoría de las personas lo conocen y citan con su primer nombre por lo cual se ha conservado (Herrera y Ulloa, 2005).

La clasificación del género *Aspergillus* es complicada principalmente porque los requisitos que debe cumplir un hongo para ser considerado como un *Aspergillus* son vagos: presentar esporas de color negro, no tener ciclo sexual conocido y no pertenecer a otro género. Este sistema de clasificación deja muchos organismos parecidos dentro de la misma especie, sin que obligatoriamente lo sean. Últimamente, se ha desarrollado una nueva serie de sistemas de clasificación molecular por medio de análisis de fragmentos de restricción o expresión de genes específicos. La clasificación de *Aspergillus niger*, es por lo tanto propia de un complejo taxonómico más que de una especie, por ejemplo: de acuerdo con los últimos hallazgos se debe utilizar el nombre *Aspergillus niger* variedad *awamori* en lugar de identificar a la especie *Aspergillus awamori*. (Baker, 2006).

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

1.1.2 Regulación de la síntesis de enzimas por hongos

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

control de la expresión genética (Meyer y col., 2010; Ichinose y col., 2013; Brown y col., 2009).

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

a) Gen regulador. Gen que puede localizarse antes o después del gen estructural, así como en alguna otra región de DNA, y codifica para un producto que regula la transcripción del gen estructural.

b) Promotor. Es un sitio de fijación de represores o activadores, es donde inicia la lectura del gen estructural. Está formado por varias secuencias como son la caja TATA, CAT, CG, las cuales son responsables de los niveles basales de transcripción de los genes. La unión del represor al operador evita la transcripción de los genes estructurales, mientras que la unión de un activador aumenta la transcripción del gen estructural.

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

Regulación negativa: en condiciones normales, la unión continua del represor con el promotor impide la transcripción del gen estructural cuando el inductor se halla presente se une al represor, impidiéndole que se una al promotor, lo que permite la transcripción de los genes estructurales. Solo algunos genes de *Aspergillus* se han reportado con este sistema de regulación (Meyer y col., 2010).

Regulación positiva: Se han localizado varias proteínas que se unen a los promotores en presencia del inductor aumentando los niveles de transcripción del gen estructural. Estas proteínas se denominan factores de transcripción. Varias hipótesis se han formulado para explicar la regulación de estas proteínas: en la primera se propone que la presencia del inductor modifica estructuralmente a las proteínas habilitándolas para unirse a la región del promotor, la segunda hipótesis propone que la presencia de glucosa, por ejemplo, promueve la fosforilación de los factores de

transcripción permitiendo la unión de estas proteínas a las regiones promotoras aumentando la transcripción del gen estructural. También se han localizado promotores sensibles a nitrógeno, azufre y fósforo, incluso el gen *pacc* de *A. nidulans* el cual modifica la expresión genética positiva o negativamente dependiendo del pH extracelular (Meyer y col., 2010; Brown y col., 2009).

En el caso de los hongos filamentosos la regulación de la síntesis proteica se realiza a diferentes niveles (Meyer y col., 2010; Brown y col., 2009).

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

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

c) Retroalimentación de una ruta metabólica específica. Dentro de la regulación por retroalimentación se ha identificado una serie de proteínas activadoras que se unen al DNA en regiones de control. Además, se han ido encontrando un número creciente de represores. Estos activadores o represores actúan no sólo sobre un gen, sino sobre un grupo de genes involucrados en una ruta metabólica, como es el caso del gen *alc* de *A. nidulans* que promueve la expresión de los genes inducibles *alcA*, *alcR*, *aldA* involucrados en el metabolismo del etanol (Son y col., 2009; Ichinose y col., 2013).

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

completas. Se ha encontrado que las proteínas responsables de la regulación enzimática son frecuentemente similares entre grupos afines (Meyer y col., 2010; Ichinose y col., 2013).

Es de especial interés la regulación catabólica por carbono en la cual la expresión de un determinado grupo enzimático no sólo está dictada por la presencia del inductor, sino principalmente por la ausencia de glucosa o de algún otro azúcar de asimilación sencilla en cantidades apreciables. En *A. nidulans* se han localizado 3 genes involucrados en la represión catabólica por carbono llamados: *creA*, *creB* y *creC*. El gene *creA* es un inhibidor que actúa uniéndose al DNA en múltiples zonas capaces de aceptarlo. Este gene se ha identificado en *A. nidulans*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma viridae*. La delección o mutación de los sitios de unión a *creA* en el DNA impide la represión por glucosa del gen en cuestión, sin afectar la regulación de los demás, pero la mutación del gen *creA* produce mutantes catabólicamente desreprimidos para la síntesis de una amplia variedad de enzimas (Meyer y col., 2010).

La evidencia acumulada sugiere que los sitios de regulación por unión de proteínas disponibles pueden sobreponerse o ser adyacentes unos a otros indicando una competencia por unión al DNA, de tal modo que la expresión de una proteína específica sería el resultado de la suma de efectos causados por esta competencia (Meyer y col., 2010). Otra regulación se localiza a nivel postranscripcional en el lumen del retículo endoplásmico; donde se modifican las proteínas a secretarse principalmente por el proceso de glucosilación. De este modo la regulación de la expresión enzimática en hongos filamentosos queda ordenada de la siguiente manera, las enzimas se mantienen expresándose, de manera constitutiva en cantidades basales muy pequeñas; debido a la presencia de secuencias promotoras en las inmediaciones del gen estructural. Además, en presencia del inductor, el represor se une a éste y libera el sitio de unión del gen regulador, pero en la presencia de concentraciones altas de glucosa los sitios de unión a proteína son ocupados por inhibidores de tipo *creA*. Al disminuir la concentración de glucosa en el medio se inicia la liberación de los sitios de regulación, al separarse el inhibidor del sitio de unión, es

sustituido por factores específicos de transcripción, de tal modo que, las enzimas empiezan a secretarse dando origen a más inductor llevando entonces a un control por retroalimentación con el substrato. Además, las condiciones prevalecientes en el medio promueven modificaciones postranscripcionales en las proteínas (Meyer y col., 2010; Kumar, y col., 2011; Rodríguez-Zúñiga y col., 2012). Dentro de las modificaciones postranscripcionales más importantes, se ha estudiado la glicosilación de las proteínas en relación con la eficiencia de la secreción en el caso de la quimosina en *Aspergillus niger* var. *awamori* (Nemoto y col., 2009).

1.1.3 Metabolismo aeróbico

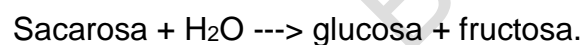
Con base en sus requerimientos o sensibilidad al oxígeno los microorganismos pueden ser clasificados como anaerobios, aerobios estrictos y anaerobios facultativos.

Los microorganismos aeróbicos necesitan oxígeno para obtener la energía de los alimentos, y la concentración del oxígeno en el medio de cultivo juega un papel central en la regulación metabólica. Por ello, en el cultivo de este tipo de microorganismos, el aire debe ser distribuido al interior del líquido de fermentación para pasar al interior de las células por difusión simple, tras esto debe cruzar el citoplasma hasta el lumen mitocondrial. De este modo, el oxígeno consumido por los microorganismos debe pasar a través de varias barreras antes de alcanzar la matriz mitocondrial donde se usará como aceptor de protones al final de la fosforilación oxidativa. La concentración de O₂ que es ligeramente superior al 21% en el aire llega a ser casi nula en la matriz de la mitocondria, el proceso de transferencia de oxígeno se debe a su gradiente de concentración entre las diferentes fases del cultivo. La concentración y la velocidad de transporte del oxígeno del aire a la biomasa puede modificar de manera importante el comportamiento del microorganismo en el cultivo al controlar la producción de ATP y con ello toda la producción energética de los microorganismos (Pirt, 1975; Gougouli y Koutsoumanis, 2013).

1.2 Sacarosa

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

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



Esta reacción es de gran interés para las industrias de bebidas y confites, porque el azúcar invertido es más dulce que la sacarosa, además, no se cristaliza y por ello es posible usarlo como jarabes concentrados estables, que, de paso, tienen el doble de osmolaridad que los jarabes obtenidos como soluciones de sacarosa. Por esa razón, la hidrólisis de la sacarosa ha sido estudiada desde hace mucho tiempo y en especial, desde principios del siglo XIX, ha servido como modelo de la catálisis mediada por la enzima sacarasa, o más comúnmente, invertasa. (Dupas y col., 2017)

1.3 Invertasa

La invertasa es una enzima que es producida por plantas y microorganismos, En los 80's y 90's esta enzima recibió mucha atención como un buen modelo para el estudio de enzimas glucosiladas secretadas por levaduras y hongos filamentosos que tienen como inductores de la síntesis de esta enzima a los azúcares, sacarosa y la rafinosa los cuales también funcionan como sustratos para la invertasa extracelular de *Aspergillus niger* (Mukherjee y Sengupta, 1985; Hussain y col., 2009; Pérez y col., 1996).

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

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

La invertasa es producida por una gran variedad de organismos que pueden utilizar la sacarosa como fuente de carbono. En el ámbito comercial la invertasa se produce principalmente por cepas de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces pastorianus*. Aún dentro del mismo cultivo de levaduras existen diferentes especies de invertasa. Por ejemplo, la invertasa intracelular tiene un peso de 135 KDa, mientras que la invertasa extracelular pesa 270 KDa (Andjelković y col., 2010; Viana y col., 2009; Pelechano y col., 2013).

Contrariamente a la mayoría de las enzimas, la invertasa es muy tolerante a los cambios de pH, presentando una actividad relativamente alta entre pH de 3.5 a 5.5 con el máximo a pH 4.5. La actividad máxima se alcanza a 55°C. Los valores de Km varían mucho de una especie a otra, pero la mayoría se encuentran entre 2 mM a 5 mM, con un valor típico de 3 mM para la enzima libre (Boddy y col., 1993; Trujillo-Toledo., 2019; Mussatto y col., 2009).

1.4 Fermentación líquida

Se puede definir a la fermentación líquida (FL) como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede o no ser aireado por medios mecánicos. La forma de fermentación líquida más utilizada en los laboratorios de investigación es el matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, pues no es raro ver fermentadores con volúmenes superiores a 10 mil litros, en los cuales se producen todo tipo de compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: 1) Dispersa el gas en burbujas más pequeñas incrementando el área de interfase gas-líquido. 2) Incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas. 3) Disminuye el grueso de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia del cultivo. Además, la agitación mezcla el cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto es particularmente importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Jezkova y col., 2021). Los productos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente, por lo que, no son un factor limitante para el crecimiento del microorganismo. La barrera principal de transferencia del O_2 en la FL, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar, aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético que debe realizarse en la FL está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos, esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger*, que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento y producir muchos de los metabolitos de interés (Gougouli y col., 2013; Solomon, 1975; Singhanía y col., 2010).

1.5 Fermentación sólida

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

El modelo de crecimiento miceliano da una ventaja adicional a los hongos filamentosos sobre los microorganismos unicelulares en la colonización de la matriz sólida y en la utilización de los nutrientes del medio de cultivo. El modelo básico de crecimiento de los hongos es una combinación del crecimiento apical con la generación de nuevas hifas por ramificación. Mientras que el crecimiento apical se lleva a cabo de manera lineal, la ramificación se lleva a cabo de manera exponencial y como resultado se logra una alta velocidad de crecimiento y una gran capacidad de cubrir eficientemente la superficie de cultivo (Subramaniyam y col., 2014).

La estructura de la pared celular unida al crecimiento por las puntas y la ramificación da a los hongos una estructura sólida y firme que les permite penetrar en el interior de la matriz sólida. Las enzimas hidrolíticas son excretadas por las puntas de las hifas sin que se diluyan como en el caso de la fermentación líquida lo que hace la acción de las enzimas hidrolíticas muy eficiente y les permite penetrar en la mayoría de los sustratos sólidos, lo que aumenta la disponibilidad de los nutrientes del interior de los sustratos (Singhania y col., 2010)

Existe un gran interés en la utilización de *A. niger* para transformar desechos agroindustriales en productos bioquímicos de valor comercial, por medio de la fermentación sólida (FS), porque se ha encontrado que durante la FS se manifiestan

características fisiológicas diferentes en los microorganismos en comparación con la FL.

Entre los productos comerciales más importantes, se encuentran algunas enzimas que son excretadas al medio y cuya producción por FL se presenta en forma muy disminuida debido a los fenómenos de represión catabólica (Mrudula y Murugammal, 2011). A veces, las enzimas producidas por FS tienen características modificadas, como un aumento en su termorresistencia, menores tiempos de producción y mayor actividad (Thomas y col., 2013; Moo-Young y col., 1983; landolo y col., 2010; Saratale y col., 2014; Hashemi y col., 2010; Viniegra-González, 2014; Mrudula y Murugammal, 2011; Kumar, y col., 2011).

Los efectos que se derivan de la utilización de FS sobre los microorganismos son múltiples como modificaciones en el transporte de azúcares, la composición de la pared, la membrana celular y en la actividad enzimática (Kumar y col., 2020; Liang y col., 2020). Mientras que las bacterias y las levaduras requieren de alta actividad de agua ($A_w > 0.98$), los hongos filamentosos pueden crecer con valores de A_w tan bajos como 0.85, y por esta razón, son microorganismos muy bien adaptados para la fermentación sólida. Pandey (1992) sugiere incluso que un bajo nivel de A_w favorece la germinación y el crecimiento micelial de los hongos (Saratale y col., 2014; Hashemi y col., 2010).

El soporte de la fermentación sólida debe cumplir con varios requerimientos como son:

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

- La mezcla de oxígeno con otros gases y aerosoles deben pasar a través del cultivo con relativa facilidad, la superficie sólido-líquido debe ser un buen hábitat para permitir el crecimiento de microorganismos que crecen rápidamente como bacterias y hongos.
- La matriz sólida debe resistir la compresión y un mezclado suave que podría requerir cada tipo de fermentación. Esto requiere partículas pequeñas y granuladas que no tiendan a unirse unas a otras.
- La matriz sólida debe estar libre de contaminantes y de inhibidores del crecimiento de los microorganismos y debe ser capaz de absorber o contener sustratos para el crecimiento microbiano como carbohidratos, fuentes de nitrógeno y sales minerales.

Estas condiciones son cumplidas por la mayoría de los soportes naturales utilizados en la fermentación sólida como el bagazo de caña, el salvado de trigo, etc. Existen también soportes inertes que cumplen con estos requerimientos y que se han utilizado para la fermentación sólida como la amberlita y, especialmente, el poliuretano.

1.6 Fermentación sumergida

La fermentación sumergida FMS puede ser definida como un estado intermedio en el que se combinan los medios sólido y líquido.

Aunque las fermentaciones sólidas son relativamente fáciles de desarrollar en pequeña escala, el escalado de las mismas a las proporciones necesarias para productos comerciales es bastante complicado, este tipo de problemática es la que se desea evitar con este tipo de fermentación sumergida, ya que la homogeneidad de la temperatura, como del medio y el inóculo es igual gracias a su exterior líquido, que permite una mejor transferencia de calor así como distribución, mientras que la captura de oxígeno y superficie, son mejores gracias a los soportes sólidos.

En este caso se utiliza el mismo soporte que en la fermentación sólida que el medio sólido, espuma de poliuretano, debido a sus características antes descritas, usando

solo 0.1 g de espuma y el mismo medio de cultivo para ser comparado en su producción de biomasa y enzima invertasa.

1.7 Diferencias entre fermentación sólida, líquida y sumergida

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

a) Los coeficientes de difusión efectivos pueden ser muy diferentes entre fermentación líquida y fermentación sólida, porque la relación área/volumen del medio líquido generalmente es varios órdenes de magnitud menor que en la delgada capa de agua extendida en soporte poroso que se da en la fermentación sólida. En un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de líquido, la relación a/v en la interfase es del orden de $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. En cambio, si tal líquido se extiende en una capa delgada y uniforme de un espesor cercano a las 50 micras, el cociente $a/v= 200 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. Debido a que el transporte de oxígeno depende de este cociente, se puede inferir que será más rápido para la fermentación sólida que para la fermentación líquida.

b) Los tiempos de mezclado serán mucho menores en el medio líquido que en el líquido agitado. En forma típica, un matraz Erlenmeyer agitado a 200 rpm tendrá un tiempo de mezclado de unos pocos segundos, mientras que, en una lámina de líquido no agitado, el tiempo de mezclado depende de la difusión de los solutos y típicamente está dada por el cociente, L^2/D_{H_2O} , siendo L la distancia promedio, entre los cúmulos de esporas sembradas, que en el medio de cultivo podrían estar separadas en forma típica, por distancias aproximadas de 100 a 1000 micras. El coeficiente de difusión de la glucosa en agua es $D= 6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$. El tiempo de mezclado resultante estaría en el intervalo de 10^2 a 10^3 seg. Esta diferencia física indica que sería más fácil formar microgradientes de solutos en la FS que en la FL, como, por ejemplo, gradientes de concentración de substratos, productos, enzimas excretadas al medio. Esta propiedad es muy usada para medir la potencia de excreción de productos en pruebas de halos de inhibición por antibióticos y halos de actividad enzimática.

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

d) En el medio sumergido FSM lo que se busca es la combinación de estas dos técnicas, en el cual se tengan los beneficios de ambas, por un lado, la mayor producción de biomasa al tener mayor oxígeno y una superficie a la cual adherirse, y por otro lado la facilidad de homogenizar la temperatura y el medio en el caso de medio líquido, ya que en medio sólido requiere cierta atención cada 12 horas para volver a reacomodar el poliuretano, cosa que a una mayor escala sería muy complejo.

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

1.8 Poliuretano

Un método de fermentación en estado sólido se ha desarrollado utilizando espumas de poliuretano (PUF) como soporte inerte impregnando sobre él un medio de cultivo líquido sintético, donde se simula la composición nutricional y condiciones de cultivo que anteriormente se llevaba a cabo en salvado de trigo. Con este sistema, la

biomasa, que es un parámetro importante para la evaluación de la fermentación en estado sólido puede ser medido directamente (Hu y col., 2011). El PUF anteriormente fue utilizado por Fujishima en 1972, para la producción enzimática de varias especies de hongos. En 1994 Zhu y col. utilizaron PUF para producir nucleasa P1 de *Penicillium citrinium*. Desde entonces el PUF ha sido utilizado más como un proceso de inmovilización celular que como un proceso limpio de producción enzimática para la búsqueda de diseño de reactores más eficientes (inmovilización, detoxificación, obtención de metabolitos).

La composición del medio de cultivo es factor importante ya que influye sobre la diversidad y la calidad de las enzimas. La producción de enzimas en medio sólido con medios de cultivo sintéticos impregnados sobre soporte inerte, permite estudiar el comportamiento de los hongos filamentosos con relación a la composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad del agua, la liberación de calor, así como la influencia de la transferencia de gases. La recuperación de metabolitos en estas condiciones se realiza por prensado lo que permite obtener un producto concentrado. En cultivos sólidos en los cuales el soporte es también el sustrato, es difícil evaluar la influencia de un solo factor sobre el comportamiento de un microorganismo ya que, en gran parte, estos sustratos son muy complejos y dada su composición se dificulta la determinación de los diferentes parámetros importantes en cultivos sólidos (Baños y col., 2009).

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

La espuma atrapa una gran cantidad de aire lo que permite al hongo crecer en un medio rico en oxígeno. Al no ser biodegradable no produce efectos secundarios sobre la inducción o secreción de las enzimas y permite determinar de manera adecuada la biomasa producida por el microorganismo (Mazotto y col., 2003).

En este estudio se utilizó poliuretano como soporte inerte a fin de poder medir lo que realmente está pasando durante el cultivo de *Aspergillus niger* en fermentación sólida.

El uso de este soporte permite regular perfectamente la presencia de inductores que determinan la producción de enzimas. Otra ventaja es que el poliuretano es no biodegradable, lo que permite llevar a cabo la determinación del peso seco real del hongo por gravimetría.

La tercera ventaja está en la porosidad del material, que permite que los espacios del poliuretano se llenen de aire que es fácilmente utilizado por el hongo y que cumple con todos los requerimientos estipulados como necesarios para un soporte inerte de fermentación sólida.

1.9 Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

El método DNS determina la presencia de grupos carbónicos libres (C=O) de los azúcares reductores. Se basa en una reacción redox, en la que el ácido 3,5 dinitrosalicílico provoca la oxidación de los azúcares. Un mol de azúcar reacciona con un mol de ácido 3,5 dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes.

1.10 Justificación

Se ha reportado que el tipo de crecimiento tiene un efecto sobre la producción enzimática y modifica la productividad de la enzima invertasa por *Aspergillus niger* cultivado en fermentación sólida con respecto a la producción en fermentación líquida, debido principalmente a una mayor y más rápida producción de biomasa en fermentación sólida y por una mejor distribución de oxígeno en el medio, por lo que se propone un sistema híbrido llamado fermentación sumergida donde se espera una mayor facilidad de producción debido a la homogenización del medio, el inóculo y la temperatura, además de una mayor posibilidad de escalar la producción, teniendo una producción cercana a la fermentación sólida.

2. HIPÓTESIS

Se supone que el cultivo sumergido, tendrá una producción de invertasa cercana a la producción del cultivo sólido, pero con las ventajas del cultivo líquido como lo son una mejor homogenización del medio, el inóculo y la temperatura.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Comparar el crecimiento y producción enzimática de *Aspergillus niger* en los sistemas de cultivo de fermentación sólida, líquida y sumergida.

3.2 Específicos

- Preparar los sistemas de cultivo de *A. niger* por fermentación sólida, líquida y sumergida.
- Comparar la producción de biomasa en los tres sistemas de cultivo.
- Realizar el análisis comparativo de producción de invertasa para los tres sistemas de cultivo.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Cepa

Se utilizó la cepa silvestre N402, ampliamente utilizada como cepa modelo para estudiar la genética de *Aspergillus niger* (Bos y col., 1988). Fue mantenida en viales de resiembra con medio PDA a 4 °C y se resembró cada 4 meses. Los cultivos para inóculo se cultivaron en PDA durante las 72 horas previas a las fermentaciones.

4.1.2 Poliuretano

La espuma de poliuretano con una densidad media de 17 Kg/m³, se compró de un proveedor comercial, se cortaron en cubos de 5 mm por lado y se lavó dos veces con agua caliente. El poliuretano ya lavado se escurrió y se secó en un horno a 70 °C durante toda la noche. Posteriormente, se introdujo 1 gramo para la fermentación sólida y 0.1 gramos para la fermentación sumergida de poliuretano seco en cada uno de los matraces Erlenmeyer y se esterilizó en autoclave a 15 psi por 15 minutos.

4.1.3 Incubadora

Se utilizó una incubadora MRC LOM-150 a 150 rpm y 30 °C de temperatura.

4.1.4 Espectrofotómetro

Se utilizó un Espectrofotómetro uv-vis Vevor modelo PWFRC005.

4.1.5 Potenciómetro

Se utilizó un potenciómetro Hanna Instruments HI 98107.

4.1.6 Microscopio óptico.

Se utilizó un Microscopio Binocular biológico. Modelo VE-B1.

4.1.7 Medios de cultivo

Se formuló el medio de cultivo con base en el medio de Pontecorvo (Pontecorvo y col., 1953) modificado de la siguiente manera, NaNO_3 15.0, KH_2PO_4 1.76, KCl 0.76, MgSO_4 0.76, FeCl_2 0.001, CuSO_4 0.001, MnCl 0.001, ZnCl 0.001 en g/L. El pH del medio se ajustó a 6.5 y se añadieron 100 g/L de sacarosa el medio se esterilizó a 10 PSI por 15 minutos. La inoculación se realizó con 2×10^7 esporas por gramo de fuente de carbono. El mismo medio inoculado se repartirá en los cultivos sólido, líquido y sumergido.

4.2 Métodos

4.2.1 Fermentación líquida

La fermentación líquida se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, llenos con 25 ml de medio ya inoculado. Se incubó a 30°C en una incubadora orbital a 150 rpm por 24, 48 y 60 horas.

4.2.2 Fermentación sólida

25 ml de medio inoculado se mezcló con 1 gramo de poliuretano estéril preparado como se describe más adelante dentro de un matraz de Erlenmeyer de 250 ml. Se incubó a 30°C por 12, 24, 36 y 60 horas.

4.2.3 Fermentación sumergida

La fermentación sumergida se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio inoculado y se le agregó 0.1 g de poliuretano. Se incubó a 30°C en una incubadora orbital a 150 rpm por 24, 48 y 60 horas.

4.2.4 Determinación de la biomasa en fermentación líquida

Los cultivos de fermentación líquida se retiraron a las 24, 48 y 60 horas según corresponda y se filtró a través de papel filtro Whatman No.1; la biomasa retenida se lavó con 100 ml de agua destilada y se secó en el horno a 70°C , ocasionalmente

una cuarta parte de la biomasa se retiró y se utilizó para determinar la actividad de invertasa intracelular, en estos cultivos la biomasa se determinó por medio de la fracción usada para la determinación de la biomasa seca.

4.2.5 Determinación de la biomasa en fermentación sólida

El poliuretano utilizado para el crecimiento del hongo se extrajo del matraz y se estrujo para obtener el extracto de fermentación sólida; este poliuretano se lavó y se secó a 70 °C, para determinar la fracción de peso seco perteneciente a la biomasa. Ocasionalmente se utilizó un gramo en peso fresco del poliuretano para determinar actividad intracelular y se procedió igual que en FL.

4.2.6 Determinación de la biomasa en fermentación sumergida

El poliuretano utilizado para el crecimiento del hongo se extrajo del matraz y se estrujo para obtener el extracto de fermentación sólida; este poliuretano se lavó y se secó a 70 °C, para determinar la fracción de peso seco perteneciente a la biomasa. El resto del medio se filtró a través de papel filtro Whatman No.1; la biomasa retenida se lavó con 100 ml de agua destilada y se secó en el horno a 70 °C.

4.2.7 Determinación de pH

Se determinó el pH utilizando un potenciómetro Hanna Instruments HI 98107 tomando una muestra de 10 ml del medio previamente filtrado.

4.2.8 Extracción de enzimas

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

4.2.9 Extractos Intracelulares

Los extractos intracelulares se obtuvieron congelando el micelio o el micelio más el poliuretano y moliéndolo en un mortero frío hasta obtener un polvo fino que se re suspendió en buffer frío de acetatos 0.1 M (pH 5.5), la parte soluble se separó por filtración y se ensayó en menos de 6 horas. A la parte insoluble se le determino la actividad de invertasa.

4.2.10 Ensayos Enzimáticos

La actividad de invertasa se determinó por medio de la liberación de azúcares reductores, los cuales se determinaron por DNS (McKee, 2017). Las condiciones de ensayo fueron 30 minutos a 30 °C, 0.1 M de sacarosa 0.35 ml, buffer de acetatos 0.1 M con pH 5.5, 0.5 ml y se utilizó 0.15 ml de extracto enzimático diluido 1/10. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcares reductores por minuto.

4.2.11 Cuantificación de proteína en los extractos

La cuantificación de proteínas se determinó por medio del método de Bradford, en el cual, se tomaron diluciones 1/100 de los extractos, donde se tomaron < 0.8 ml de dilución y se le agregaron 0.2 ml de Reactivo de Bradford, para después vortexear e incubar por 5 minutos, después de periodo de incubación se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm.

4.3.1 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con ANOVA que es el análisis de la varianza que permitió determinar si diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias poblacionales no difieren.

4.4. Diseño experimental

Se utilizó la cepa silvestre *Aspergillus niger* N402 y se mantuvo en viales de resiembra con medio PDA a 4 °C y se resembraron cada 4 meses. Los cultivos para inóculo se cultivaron en PDA durante las 72 horas previas a las fermentaciones.

Se prepararon las fermentaciones por triplicado, preparando en el caso de fermentación sólida, muestras cada 12, 24 y 36 horas, para la fermentación líquida muestras cada 24, 48 y 36 y para la fermentación sumergida 24, 48, 36 y 72 horas.

Después se recolecto la biomasa de acuerdo a cada fermentación y se guardaron las muestras a -20 °C para su análisis.

Se realizaron las pruebas enzimáticas a todas las muestras y se realizó el análisis estadístico con ANOVA.

5. RESULTADOS

5.1 Biomasa.

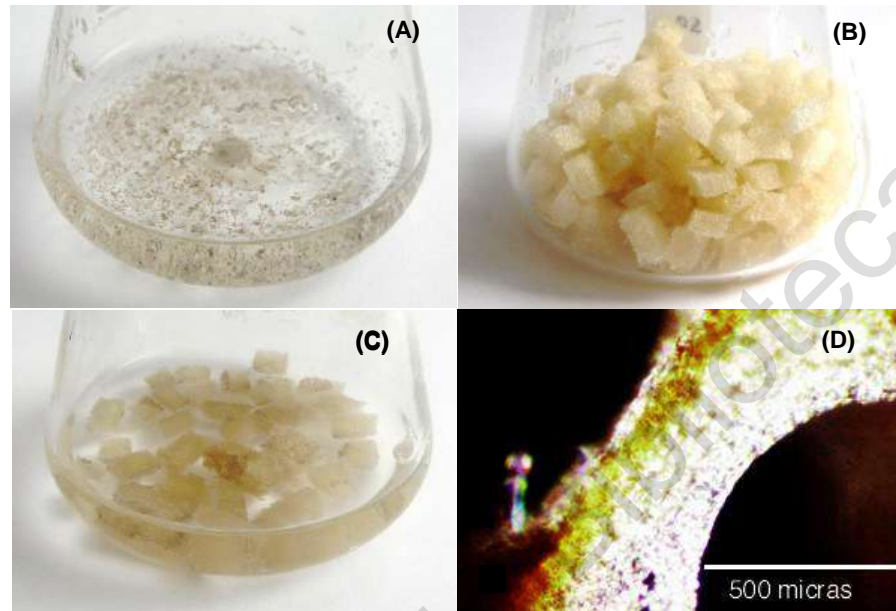


Figura 1. Comparación del tipo de crecimiento de biomasa producida por *Aspergillus niger* N402 a las 24 horas en cultivo líquido (A), cultivo sólido (B), cultivo sumergido (C) y microfotografías de *Aspergillus niger* en poliuretano (D).

En la figura 1 se presenta una comparación del tipo de crecimiento del hongo *Aspergillus niger* en los cultivos líquido, sólido y sumergido tras un periodo de 24 horas de cultivo, en la figura 1(A) podemos observar que en el cultivo líquido se forman esferas de micelio que tiene el nombre de pellets como resultado del crecimiento del micelio en el medio líquido donde no tiene superficie a la cual unirse; en la figura 1(B) en el cultivo sólido no es visible la formación de biomasa ya que ésta comienza a crecer en el interior de los cubos de poliuretano, pero la observación al microscopio, figura 1(D), permite ver como el hongo crece en forma de zarcillo que se enredan alrededor de las trabéculas del poliuretano de manera que no ocupa el espacio aéreo dentro de las burbujas de que está formado el poliuretano (Viniegra y

col., 2001). En la figura 1(C) se muestra el cultivo sumergido donde la biomasa es visible ya que comienza a crecer en las zonas externas de los cubos de poliuretano.

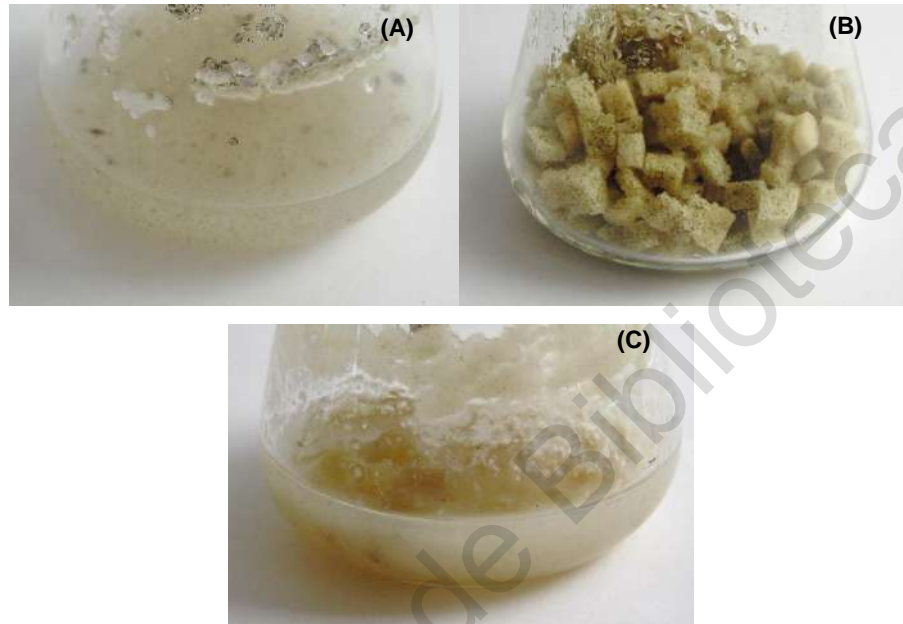


Figura 2. Comparación del tipo de crecimiento de la biomasa producida por *Aspergillus niger* N402 a las 60 horas en cultivo líquido (A), cultivo sólido (B) y cultivo sumergido (C).

En la figura 2 se presenta la comparación del tipo de crecimiento de biomasa en los sistemas de cultivo líquido, sólido y sumergido que se alcanza a las 60 horas de cultivo, en la figura 2(A) se observa la formación de pellets más grandes de biomasa y la adhesión de micelio en la zona superior del líquido que hace contacto con las paredes del matraz, estas zonas de micelio muestran esporulación marcando el final del cultivo. En la figura 2(B) se presenta el cultivo sólido donde cada cubo de poliuretano se encuentra lleno de biomasa, al grado de que ya es visible desde el exterior y es aquí donde podemos notar que los hongos ya han empezado a esporular. En la figura 2(C) se presenta el crecimiento de biomasa del cultivo sumergido donde la biomasa ha crecido dentro de los cubos de poliuretano hasta

llenarlos y podemos observar el mismo comportamiento de adhesión a las paredes del matraz Erlenmeyer, aunque a diferencia del cultivo líquido el micelio libre y el adherido al matraz se desarrolla como micelio disperso.

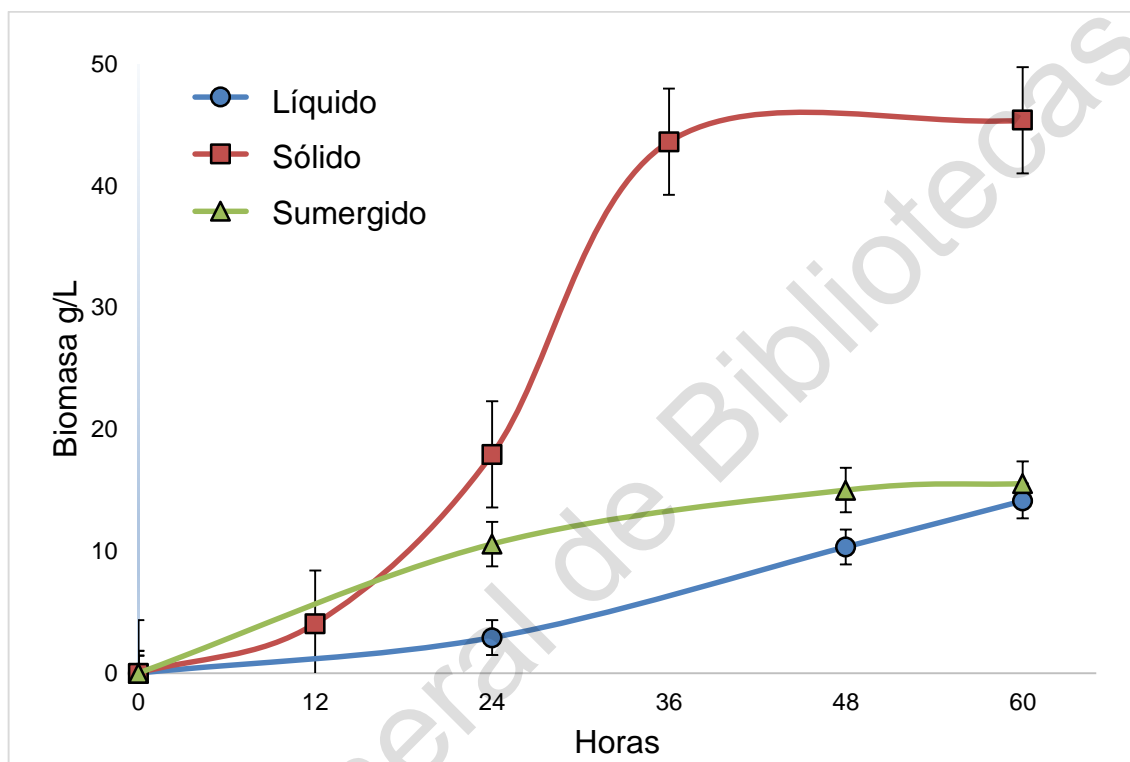


Figura 3. Producción de biomasa por *Aspergillus niger* N402 en cultivo líquido (●) , cultivo sólido (■) y cultivo sumergido (▲).

En la figura 3 se muestra la cinética de producción de biomasa en los sistemas de cultivo líquido, sólido y sumergido. Podemos observar que la acumulación de biomasa en cultivo sólido se realiza de manera exponencial durante las primeras 36 horas y se detiene para el resto del cultivo manteniendo el mismo valor hasta las 60 horas. En los sistemas de cultivo líquido y sumergido el hongo mostró un comportamiento de acumulación de biomasa muy parecido en ambos, con un crecimiento continuo durante todo el cultivo, aunque el cultivo sumergido muestra un crecimiento ligeramente menor en las últimas 12 horas de cultivo. Podemos observar

que en el cultivo líquido se presentó un incremento continuo de biomasa durante todo el tiempo de cultivo alcanzando los 14.14 g/L de biomasa a las 60 horas; mientras que para cultivo sumergido se dio un crecimiento acelerado hasta las 24 horas cuando alcanza el valor de 10.59 g/L de biomasa y posteriormente esta velocidad disminuye sensiblemente por lo que termina con un valor similar a la de la fermentación líquida de 15.5 g/L a las 60 horas. Por otra parte, el cultivo sólido presento una fase de acumulación de biomasa mucho más rápida alcanzando un valor de 43.62 g/l de biomasa acumulada a las 36 horas, momento en que se inicia la esporulación en el cultivo, este valor se mantiene prácticamente igual llegando a 45.60 g/l a las 60 horas.

5.2 pH.

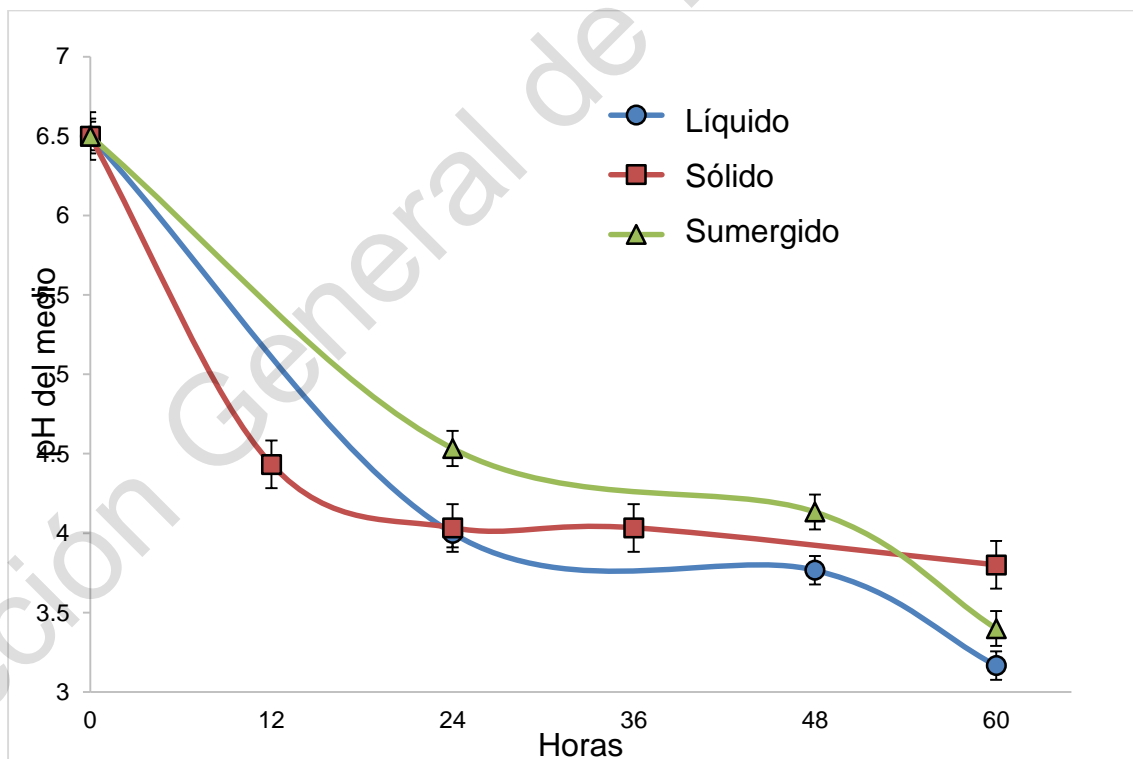


Figura 4. Cinética de pH en los cultivos de *Aspergillus niger* N402 en cultivo líquido (●), cultivo sólido (■) cultivo sumergido (▲)

En la figura 4 se muestra la cinética de pH en los sistemas de cultivo sólido, líquido y sumergido, en la gráfica se puede observar un comportamiento muy similar en los 3 sistemas, mostrando un mayor descenso del pH en el cultivo sólido y este valor posteriormente se mantiene estable, mientras que en el cultivo sumergido se da una disminución más suave que se mantiene sobre el pH del cultivo sólido y es hasta las 60 horas que se alcanza un valor de pH menor al del cultivo sólido, para el cultivo líquido se observa que el pH solo toma 24 horas para alcanzar el valor de cultivo sólido y se mantiene estable hasta alcanzar las 48 horas donde vuelve a disminuir el pH a las 60 horas.

El cultivo líquido alcanzó un valor de 3.76 a las 24 horas y presenta una segunda caída a un valor de 3.16 a las 60 horas de cultivo. En el cultivo sumergido se observa el mismo comportamiento con un valor de 4.53 a las 24 horas manteniéndose estable hasta las 48 horas y mostrando un segundo descenso a un pH de 3.4 a las 60 horas. En el cultivo sólido, la disminución fue más rápida, llegando a un valor de pH igual a 4.43 a las 12 horas de cultivo y alcanza un valor de pH estable entre 4.0 con un valor final de 3.8.

5.3 Actividad enzimática.

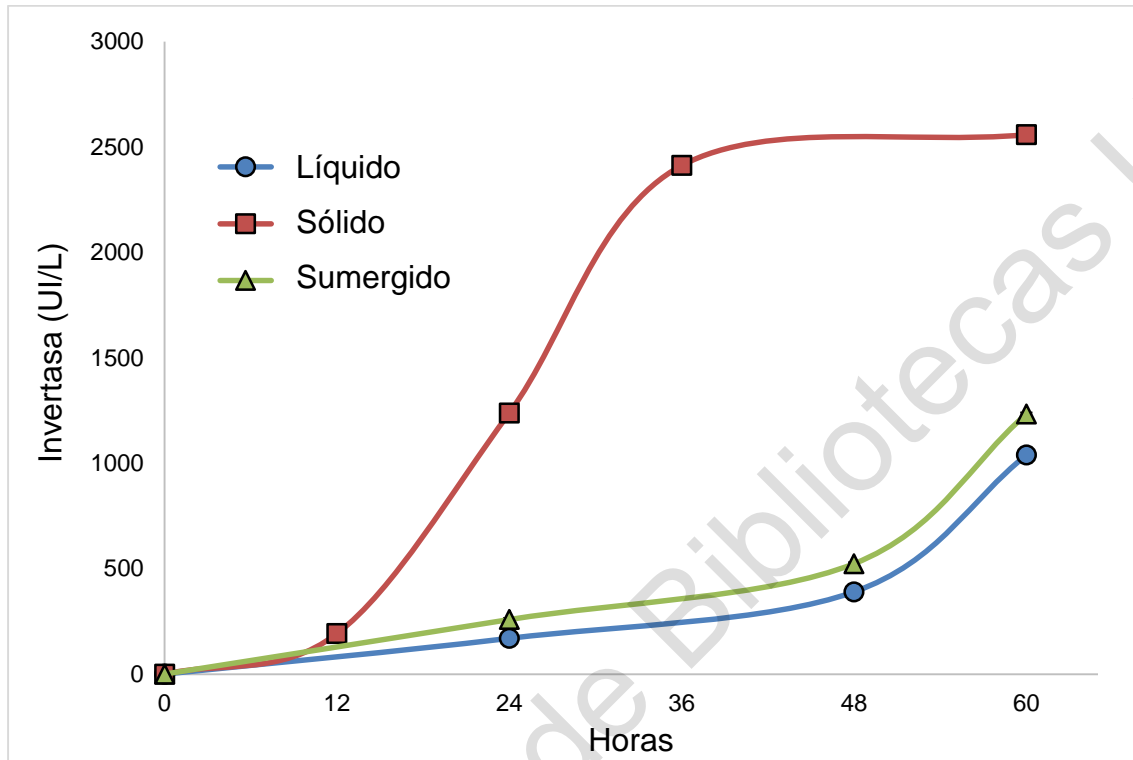


Figura 5. Comparación de actividad enzimática en cultivos de *Aspergillus niger* N402 en fermentación líquida (●), fermentación sólida (■), fermentación sumergida (▲) en UI/L

En la figura 5 se muestra la curva de producción de invertasa en los sistemas de cultivo sólido, líquido y sumergido, en la gráfica podemos observar que el cultivo sólido presenta una mayor actividad de invertasa en mucho menor tiempo que los cultivos líquido y sumergido, que presentan actividades y tiempos de producción muy parecidos entre sí. La producción enzimática por cultivo sólido comienza con un periodo de aumento exponencial a partir de las 12 horas de fermentación alcanzando el punto máximo de producción a las 36 horas, tras lo cual entra a una fase estacionaria. Mientras tanto los sistemas de cultivo líquido y sumergido muestran un comportamiento muy similar de incremento continuo de la actividad hasta las 48 horas y a partir de ahí tienen un pequeño crecimiento exponencial, que coincide con el final de la fermentación.

La producción de invertasa por cultivo sólido alcanza las 2558.46 UI/L a las 36 horas, y este valor de actividad de invertasa se mantiene hasta el final de la fermentación a las 60 horas. Mientras que la curva de producción por fermentación líquida y sumergida parecen comportarse de manera parecida los valores de producción son muy diferentes al término del periodo de aumento continuo a las 48 horas, el cultivo sumergido alcanza el valor de 389.62 UI/L y el cultivo sumergido alcanza un valor de 523.33 UI/L, es decir un 30% más, esta proporción se mantiene después del periodo de incremento acelerado a 60 horas cuando la producción de invertasa crece en un factor aproximado de 2.5 X, pasando a 1038.15 UI/L para cultivo líquido y 1232.59 UI/L para cultivo sumergido, con lo que podemos observar que la producción de invertasa es de al menos el doble en cultivo sólido de lo que se alcanza en los otros dos sistemas de cultivo, y además, el valor máximo de producción se alcanza en solo 36 horas en contra las 60 horas que requieren los sistemas sumergido y líquido.

5.3.1 Actividad enzimática intracelular.

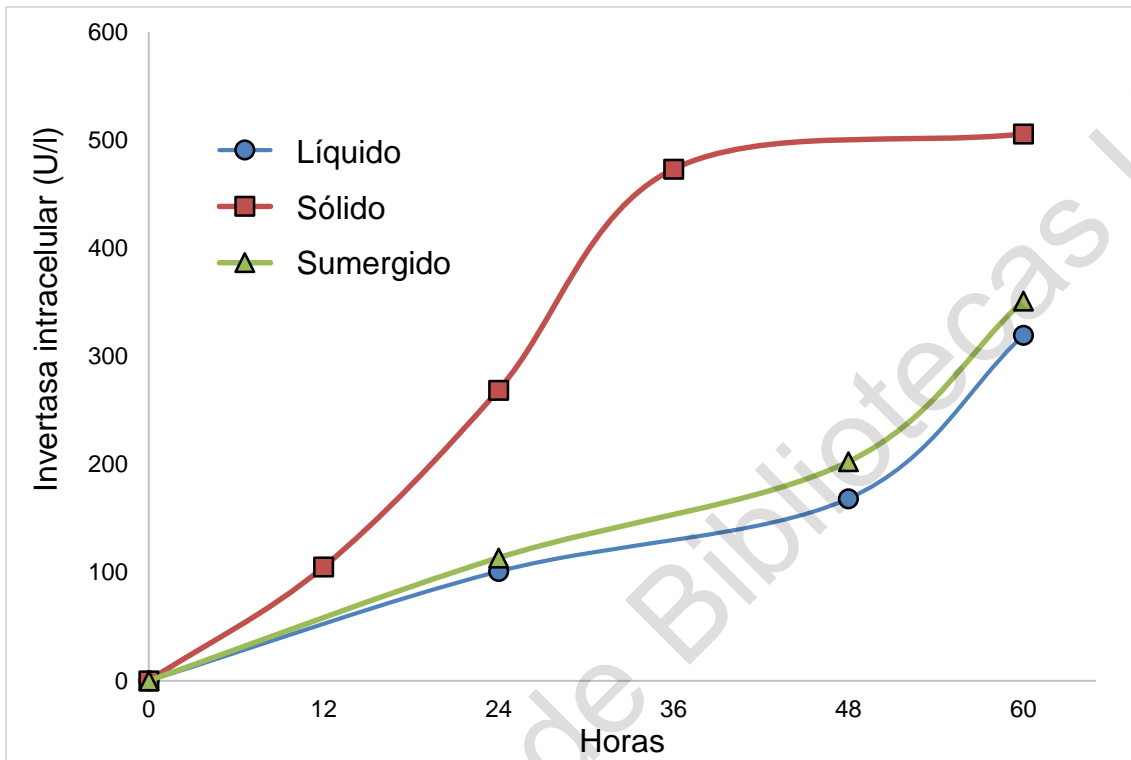


Figura 6. Comparación de actividad enzimática intracelular en cultivos de *Aspergillus niger* N402 en fermentación líquida (●), fermentación sólida (■) fermentación sumergida (▲)

En la figura 6 se muestra la producción de invertasa intracelular en los sistemas de cultivo sólido, líquido y sumergido, en la gráfica podemos observar que el cultivo sólido presenta una mayor actividad de invertasa intracelular y en menor tiempo en comparación de los de los otros dos sistemas de cultivo y éstos a su vez muestran comportamientos muy similares, siendo el cultivo sumergido ligeramente superior.

En el cultivo sólido, la invertasa intracelular tuvo un aumento exponencial a partir de las 12 horas y llegando a un valor máximo de 473.33 U/L a las 36 horas, manteniéndose estable y aumentando muy poco de manera lineal hasta un valor de 505.780 U/L a las 60 horas, mientras que en la fermentación líquida el valor de la invertasa intracelular tuvo un aumento lineal durante las primeras 48 horas de

producción llegando a un valor de 168.519 U/L , después del cual tuvo un aumento exponencial llegando a un valor de 319.63 U/L y la fermentación sumergida mostró un comportamiento muy similar al del cultivo líquido, con una ligera diferencia superior, de la misma manera tuvo un aumento lineal durante las 48 primeras horas de cultivo llegando a un valor de 202.593 y posteriormente teniendo un aumento exponencial de 48 a 60 horas en la que llegó a una actividad de invertasa máxima de 351.48 U/L, la diferencia de invertasa intracelular del cultivo líquido y el sumergido fue de tan solo 31.58 U/L.

La producción de invertasa está relacionada proporcionalmente con la producción de biomasa, el cambio de producción de la biomasa es debido a la disposición de oxígeno en el medio, una disminución de oxígeno, representa una disminución muy grande en la energía disponible y por ello su crecimiento ya que la carencia de oxígeno aumentaría el flujo de carbono a productos secundarios reduciendo la producción de biomasa (Patil y Dayanand, 2006).

La disposición de oxígeno en el medio es resultado del soporte en el cual se encuentra el cultivo, mientras que en el cultivo líquido *Aspergillus niger* se encuentra sumergido en el líquido, cuenta con una disposición de oxígeno de 14.6 mg/L en el cultivo sólido el hongo se encuentra rodeado de aire con un 21% de concentración de oxígeno.

En el caso del cultivo sumergido, al combinar las técnicas se muestra un aumento en comparación con el cultivo líquido en la producción de biomasa y por lo tanto de invertasa, sin embargo, al ser solo el 10% del soporte sólido, el aumento es menor en comparación del cultivo sólido.

Esto no solo nos muestra un cambio considerable en la producción de invertasa, si no en la velocidad de crecimiento, ya que el cultivo sólido a las 36 horas ya ha llegado a su máximo de producción de biomasa y de invertasa.

Estos resultados coinciden con los encontrados en Mason y Egli (1993), quienes sugirieron que la naturaleza del primer nutriente agotado es relevante para el

progreso posterior de la fase de desaceleración, comportamiento observado en los cultivos líquido y sumergido, en donde se puede observar la escases de oxígeno en las últimas horas de cultivo, contra el cultivo sólido, en donde se observa que cuenta con suficiente disposición de oxígeno, pero el nutriente que se agota primero es el carbohidrato.

La invertasa intracelular es la primera en producirse y con mayor velocidad en el caso del cultivo sólido, se encontró un comportamiento muy similar en la producción de ambas, intra y extra celular, mostrando en su nivel de máxima concentración un porcentaje de 16/84 respectivamente, por lo cual muestra ser el sistema de cultivo con una mayor secreción de invertasa al medio.

Durante las primeras horas de cultivo se producen los niveles máximos de invertasa intracelular, pero a medida que el cultivo avanza, en los tres sistemas de fermentación, la invertasa intracelular representa una fracción menor de la actividad extracelular, la cual se incrementa al tiempo que la actividad intracelular disminuye.

La mayor secreción de la invertasa en el medio sólido es debido a la forma del crecimiento del micelio como ha sido reportado por Kunz (2020) con una forma de crecimiento más favorable para la secreción enzimática que el crecimiento en forma de pellet, lo que podría ayudar a explicar los resultados obtenidos debido a que en los modelos estudiados, las enzimas se secretan hacia la punta de las hifas, de tal manera que las enzimas se mezclan con los componentes de la pared celular y se difunden a través de la pared inmadura, lo que permite la secreción de enzimas al medio, este proceso de difusión a través de la pared celular también puede explicar la mayor secreción de invertasa en los cultivos de fermentación sólidos. En la fermentación sólida, la invertasa puede difundirse libremente en el medio, mientras que, en la fermentación líquida, la invertasa quedará atrapada en las partículas, lo que se traduce en una menor liberación en el medio, el proceso de secreción se esquematiza en la figura 2.

Por esta razón se explica por qué hay una mayor secreción de enzimas al medio por parte del cultivo sólido. En fermentación sumergida la relación de invertasa

extracelular e invertasa intracelular son muy similares con los cultivos líquidos, ya que, a pesar de presentar un soporte, la mayor parte se encuentra sumergida, por lo que no logra extenderse en el crecimiento, sino sobre si misma formando los pellets y evitando una mayor secreción y liberando una menor proporción de enzima al medio.

Con esta información se muestra que la producción de biomasa está favorecida, al tener una mayor disponibilidad de oxígeno y al estar distribuido de una mejor manera, y es pieza clave para una mejor producción de invertasa en el cultivo sólido, ya que no solo tendremos una mayor y rápida producción, sino que también una mayor secreción de la enzima al medio.

5.4 Proteína.

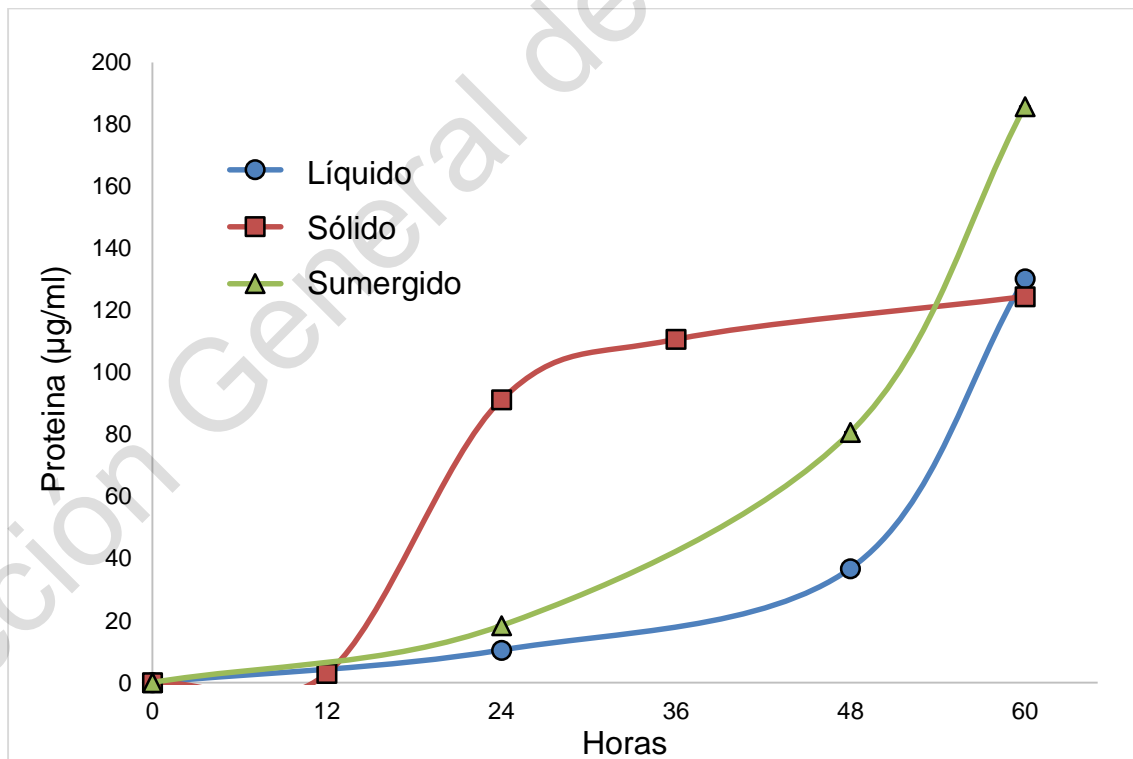


Figura 7. Productividad de proteína extracelular en cultivos de *Aspergillus niger* N402 en cultivo líquido (●), cultivo sólido (■) cultivo sumergido (▲)

En la figura 7 se presenta el perfil de producción de proteína soluble extracelular por *Aspergillus niger* N402 en los sistemas de cultivo sólido, líquido y sumergido a lo largo del tiempo de cultivo, donde podemos observar que los tres sistemas de producción presentan una producción de proteínas extracelulares muy parecidos, la producción de proteína en cultivo sólido presenta una fase exponencial que culmina a las 24 horas y después de ese tiempo muestra un aumento lineal mínimo; mientras que los cultivos líquido y sumergido muestran comportamientos similares, con crecimiento lineal hasta las 48 horas, donde comenzó el crecimiento exponencial en ambos casos, donde el cultivo líquido llega a un valor similar de proteína extracelular que el cultivo sólido y la producción de proteína extracelular del cultivo sumergido supera a los cultivos líquido y sólido.

El cultivo sólido tuvo un crecimiento exponencial a partir de las 12 horas y mantuvo este comportamiento hasta las 24 horas donde presentó una concentración de 91.2 $\mu\text{g/ml}$ y a las 36 horas se incrementó hasta las 110.7 $\mu\text{g/ml}$, para mantenerse estable hasta las 60 horas, llegando a un máximo de 124.5 $\mu\text{g/ml}$ al finalizar el cultivo.

En el cultivo líquido la producción de proteína presentó los valores más bajos de los tres cultivos hasta las 48 horas llegando a una concentración de 36.76 $\mu\text{g/ml}$ y a partir de este punto tuvo un crecimiento exponencial llegando a 130.26 $\mu\text{g/ml}$ de proteína acumulada a las 60 horas, valor prácticamente igual al de cultivo sólido.

El cultivo sumergido presentó un crecimiento continuo hasta las 48 horas cuando alcanzó un valor de 80.69 $\mu\text{g/ml}$ de proteína soluble extracelular y a partir de este momento inicia su crecimiento exponencial para alcanzar el valor de 185.8 $\mu\text{g/ml}$. En todo momento la producción de proteína en el cultivo sumergido, se mantuvo por encima de la producción del cultivo líquido, y después del crecimiento exponencial final, superó el valor de la proteína producida por el cultivo sólido con una diferencia del 40%.

5.4.1 Proteína intracelular.

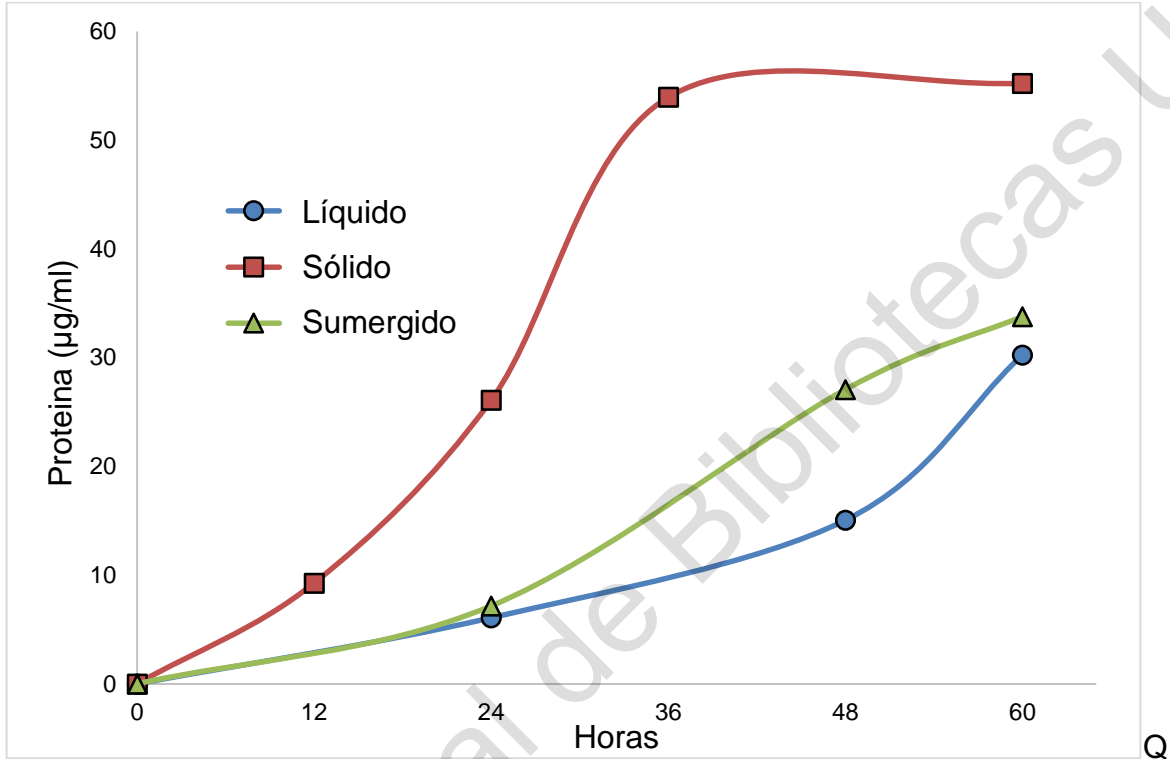


Figura 8. Productividad de proteína intracelular en cultivos de *Aspergillus niger* N402 en cultivo líquido (●) cultivo sólido (■) cultivo sumergido (▲)

En la figura 8 se presenta la cinética de producción de proteína intracelular en los sistemas de cultivo sólido, líquido y sumergido a lo largo del tiempo del tiempo de cultivo de 60 horas. Puede observarse que el cultivo sólido presenta un crecimiento acelerado durante las primeras 36 horas de cultivo y posteriormente se mantienen los niveles hasta la finalización de la fermentación. El cultivo sumergido muestra un crecimiento lineal a lo largo de todo el tiempo de cultivo, mientras que en el caso del cultivo líquido se muestra una fase de producción lineal hasta las 48 horas y a partir de ese momento comienza una fase exponencial hasta las 60 horas, cuando alcanza un valor de producción de proteínas intracelular muy parecido al del cultivo sumergido.

La curva del cultivo sólido muestra un valor de 53.95 $\mu\text{g/ml}$ de proteína a las 36 horas y de ahí sigue una fase de crecimiento muy lenta hasta las 60 horas, llegando a 55.24 $\mu\text{g/ml}$.

El cultivo sumergido alcanzó un valor 33.79 $\mu\text{g/ml}$ a las 60 horas, y el cultivo líquido a pesar de mantener una producción de proteína intracelular baja llegando a una concentración de 15.05 $\mu\text{g/ml}$ de proteína a las 48 horas iniciales para posteriormente tener una producción acelerada y duplicar los valores de concentración de proteína a 30.26 $\mu\text{g/ml}$ al finalizar el cultivo a las 60 horas. El cultivo sólido produjo un 60% más proteína intracelular que los otros dos sistemas de producción lo que puede estar relacionado con la biomasa producida en este sistema de cultivo.

Comparando la producción de proteína soluble contra la biomasa que genera los cultivos, podemos observar que en el caso del cultivo sólido, tiene una rápida producción de proteína, llegando a las 12 horas a un 73.2% del total de la proteína producida, para después tener un descenso en la velocidad, esto es debido al rápido crecimiento que presenta este sistema de cultivo, ya que produce demasiada proteína para poder crecer el hongo, una vez logra este crecimiento, la producción se detiene, y las concentraciones se mantienen estables.

Cuando analizamos la producción de proteínas en los cultivos líquido y sumergido, podemos observar que tiene un periodo de adaptación muy largo y hay una baja producción de biomasa correspondiente con la baja producción de proteína, y a partir de las 48 horas vemos un crecimiento acelerado tanto de proteína, como de biomasa, y así de esta manera corresponde la producción de proteína con la secreción de más cantidad de invertasa al final del cultivo.

5.5 Análisis de la relación entre el crecimiento en cada sistema de cultivo y la producción de invertasa

Cuadro 1. Biomasa, producción enzimática, y productividad por gramo de biomasa de *Aspergillus niger* en cultivo líquido, sólido y sumergido

$X_{\max}(\text{gX/l})$			$E_{\max} (\text{U/l})$			$Y_{E/X} (\text{U/gX})$		
Sol	Liq	Sum	Sol	Liq	Sum	Sol	Liq	Sum
45.4	14.14	15.56	2558.4	1038.1	1232.5	56.3	73.4	79.21

En el cuadro 1 se presentan los valores de producción máxima de biomasa (X_{\max}), Producción máxima de invertasa (E_{\max}) y producción específica de invertasa con relación de la producción de biomasa ($Y_{E/X}$) de *Aspergillus niger* en cada uno de los tres sistemas de cultivo. Los resultados muestran que la biomasa máxima (X_{\max}) producida en el cultivo sólido fue tres veces más elevada que en el cultivo líquido, y la producción del sistema sumergido fue un 10% superior a la producción de biomasa del sistema líquido, los resultados de producción de máxima de invertasa (E_{\max}) repiten el patrón con una producción mucho más elevada en cultivo sólido 2.5 veces más alto que para cultivo líquido y una producción un 20% mayor para cultivo sumergido que para cultivo líquido. Al analizar los resultados de la producción específica de invertasa por gramo de biomasa ($Y_{E/X}$) se puede observar que el cultivo sólido es el sistema que presenta un valor más bajo con 56.23 U/gX, mientras que el cultivo líquido con 73.6 U/gX muestra un valor un 30% más alto que este, pero el valor más alto de producción específica se obtiene con el cultivo sumergido con 79.21 U/gX, es decir un 40 % más que en el caso del cultivo sólido y un 8 % más alto que para el cultivo líquido.

A pesar de que la producción de invertasa en cultivo sólido fue la más alta de los tres sistemas de cultivo, la producción de biomasa resulta ser todavía mayor, esto explica el que la producción específica sea menor a los otros dos sistemas de cultivo, la combinación de biomasa prácticamente igual a la del sistema líquido con una mayor producción de invertasa se dio en el cultivo sumergido, esta combinación permitió

obtener la mayor producción específica de invertasa para los tres sistemas de cultivo, esto nos indicaría que en el cultivo sumergido se están presentando las condiciones adecuadas para la producción de invertasa, pero existen limitaciones en el crecimiento micelial (Kumar y col., 2011).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo nos muestran que el cultivo sólido muestra una mayor velocidad de crecimiento con respecto al cultivo líquido la máxima cantidad de biomasa se alcanza en solo 36 horas contra 60 horas para cultivo líquido y sumergido, esto puede explicarse fácilmente porque este sistema de cultivo permite al hongo crecer sobre un soporte donde la disponibilidad de oxígeno es muy alta, debido a que como se ha reportado el micelio no invade los espacios aéreos del interior del soporte que se mantiene llenos de aire, el cual es sustituido cada 12 horas gracias a la agitación manual del sistema de cultivo, que provee suficiente oxígeno al hongo y le permite crecer con un metabolismo aeróbico donde puede producir grandes cantidades de ATP y acumular biomasa de manera muy eficiente y por lo tanto su única limitación importante sería la cantidad de carbohidratos presentes en el medio de cultivo, los cuales agota en tan solo 36 horas y eso explicaría porque el desarrollo se detenga tras ese periodo de tiempo. Por otro lado, el cultivo sumergido, muestra el crecimiento más rápido de los tres sistemas al principio de los cultivos esto puede estar relacionado con la presencia de un soporte como en cultivo sólido dentro de un medio homogéneo con gran disponibilidad de sustrato gracias a la agitación propia del cultivo líquido, la posterior disminución en la velocidad de crecimiento puede relacionarse a la limitación de oxígeno propia del cultivo líquido, dado que mientras el aire contiene aproximadamente un 21% de oxígeno, la solubilidad del oxígeno en el agua es de solo 50 mg por litro, que si bien pueden ser suficientes para permitir un crecimiento aeróbico cuando la cantidad de biomasa del cultivo es baja limita la capacidad de crecimiento del cultivo sumergido cuando se acumula una cantidad relativamente alta de micelio un punto extra que limitaría el crecimiento en el caso del cultivo sumergido es la saturación del espacio existente en los cubos de poliuretano que al llenarse como podemos observar en la figura 2, limitaría todavía más el ingreso del oxígeno al micelio que crece en el interior de los cubos de poliuretano lo que obligaría al hongo a crecer en forma micro aeróbica limitando su capacidad de generar energía, disminuyendo por ende la formación de biomasa y el consumo de carbohidratos del medio de cultivo al saturarse el espacio

dentro de los cubos de poliuretano se obligaría al hongo a crecer en el medio líquido, como también puede observarse en dicha fotografía.

Al comparar los resultados de la cinética de pH con la gráfica de producción de biomasa se puede notar que el descenso acelerado del pH parece estar relacionado con el comienzo de la fase exponencial y el aumento en la producción de biomasa esta disminución del pH del medio de cultivo por *Aspergillus niger* es recurrente en los reportes de cultivo de *Aspergillus niger* debido a que el hongo produce ácidos orgánicos como parte de su metabolismo normal, al secretarlos en la naturaleza consigue limitar el crecimiento de las bacterias con las que compite por alimento y espacio y al mismo tiempo disuelve y pone disponibles varios metales que son necesarios para su desarrollo, el hierro entre ellos (Papagianni y col.,1999a).

El que los valores de pH sean menores para los cultivos sumergidos y líquido, puede estar relacionado a la combinación de condiciones de cultivo con una gran cantidad de carbohidratos disponibles en el medio de cultivo y la limitación de la disponibilidad de oxígeno que son las condiciones de cultivo usadas para la producción y secreción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* que al acumular producirían el descenso del pH al final de la fermentación (Papagianni y col.,1999b).

Tanto en el cultivo líquido como en el sumergido se muestra un segundo descenso de pH al finalizar el cultivo, lo cual es explicado ya que, al haber una gran cantidad de biomasa producida, la disposición de oxígeno se vuelve muy baja y de acuerdo a lo observado por Xu y col.,1989 y por Kubicek-Pranz y col.,1990 en *Aspergillus niger*, que la disminución de la concentración de oxígeno genera productos intermediarios del ciclo de Krebs como el ácido cítrico así que con estos resultados confirman que la baja concentración de oxígeno en los cultivos líquido y sumergido genera formación de ácido cítrico y por lo cual el pH del medio tiende a descender aún más a partir de las 48 horas, cuando se registra un aumento en la biomasa.

Estos resultados documentan que la fase de desaceleración es un período de mayores reordenamientos metabólicos. Considerando las severas alteraciones fisiológicas provocadas por los nutrientes agotados (Mason y col., 1993)

La curva de producción y secreción de proteína muestra perfiles de producción y secreción muy parecidos a los perfiles de crecimiento para la fermentación sólida y líquida, sin embargo para la fermentación sumergida la producción de proteínas extracelular es mucho más alto que para los otros sistemas de cultivo, lo que puede estar relacionado a la presencia del soporte y la gran velocidad de crecimiento inicial, que permitiría el establecimiento de una maquinaria de síntesis de proteína muy eficiente que a lo largo del cultivo no tendría la posibilidad de ser usada para la síntesis de micelio debido a la saturación del mismo soporte, esto puede ocasionar que las puntas de las hifas secretaran grandes cantidades de proteínas de formación de micelio y pared celular que no tendrían espacio para formarse y por lo tanto los materiales quedaría en forma soluble en medio de cultivo esto queda apoyado por la curva de cuantificación de proteína intracelular que muestran un perfil más normal y así demostraría demostraría que la proteína que se está formando está siendo secretada al espacio extracelular de manera eficiente.

Al comparar las curvas de producción de invertasa con las curvas de producción de biomasa para cada uno de los sistemas de fermentación podemos observar que los perfiles de producción de invertasa siguen una curva similar a la de acumulación de biomasa esto nos indica primero que la invertasa es un metabolito primario que como se sabe es aquella molécula cuya producción está ligada al crecimiento del microorganismo, y en segunda instancia se debe a la fisiología de crecimiento de los hongos filamentosos que para su desarrollo requieren de la secreción continua de los materiales de crecimiento desde la punta de las hifas, y este mecanismo es el mismo que se usa para la secreción de las enzimas extracelulares, de tal forma que la invertasa es producida en el lumen de las enzimas sub apicales junto con las enzimas necesarias para ensamblar los componentes de pared y membrana, esta mezcla se transporta en el interior de las vesículas de secreción, hacia la pared celular y finalmente todo junto es secretado al espacio periplásmico y al medio de cultivo , como se muestra en la figura 9. De esta forma podemos ver que el crecimiento miceliar y la secreción enzimática no solo usan la misma maquinaria, sino que están profundamente involucrados uno con otro de manera que para el

hongo no es posible crecer sin secretar y eso lo convierte en uno de los organismos más eficientes para la producción de enzimas están documentadas producciones que alcanzan los 100 g/L para la glucoamilasa.

Los valores de producción de invertasa en cultivo sumergido muestran una cinética muy parecida al cultivo líquido, este comportamiento puede estar ligado a la dinámica de ingreso de la sacarosa y fructosa en el citoplasma en ambos casos la agitación se encarga de mantener la concentración local de sacarosa en niveles altos lo que favorece la producción de invertasa que estaría limitada por la capacidad de acumulación de biomasa y la capacidad de transferencia de oxígeno de los sistemas de cultivo. En el cultivo sumergido la presencia de soporte permite producir más invertasa al facilitar y estabilizar la cantidad de puntas de hifas del micelio lo que favorece tanto la producción como la secreción enzimática.

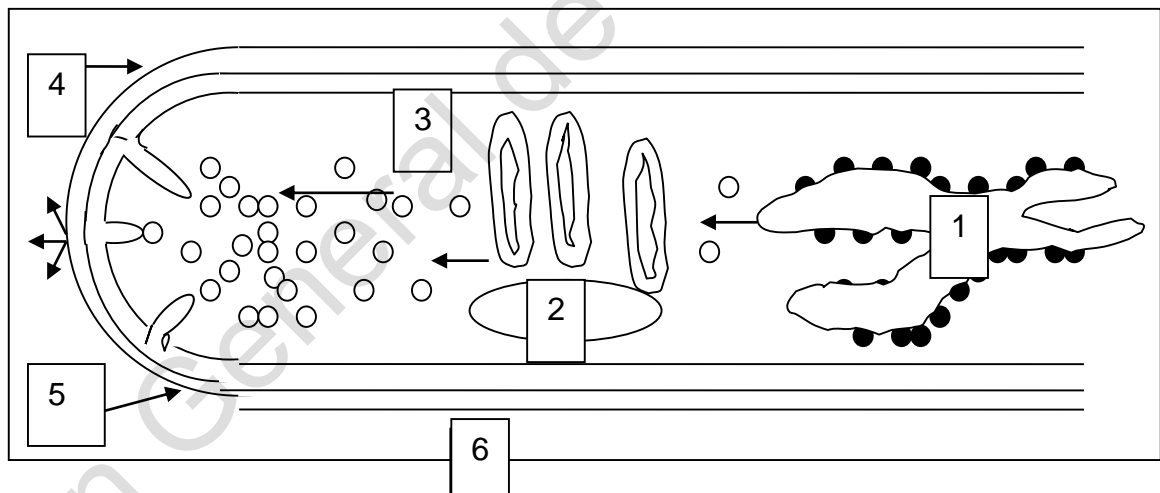


Figura 9 Esquema de secreción de hidrolasas por hongos filamentosos a través de la punta de una hifa, 1) Retículo endoplásmico, 2) Aparato de Golgi, 3) Vesículas de secreción, 4) pared celular, 5) Espacio periplásmico, 6) Medio de cultivo. (Peberdy, 1994).

7. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos, podemos concluir que se obtuvo una mayor producción de invertasa en el cultivo sólido en comparación con los cultivos líquido y sumergido, ya que la producción de la enzima invertasa estuvo ligada directamente a la producción de biomasa en los distintos sistemas de cultivo.

La producción de biomasa está determinada por la distribución de oxígeno en el medio, de esta manera al crecer sobre el soporte sólido el micelio creció de manera más dispersa y extendida permitiendo un mejor intercambio gaseoso en el cultivo y logrando una mejor secreción de la enzima invertasa hacia el medio, a diferencia del cultivo líquido, ya que en este sistema el hongo tiende a crecer sobre sí mismo y presenta pellets con centros muy densos que no permiten un intercambio suficiente de oxígeno y por lo mismo de su crecimiento compacto, no hay una buena secreción hacia el medio, conservando gran cantidad de la enzima en su interior.

De esta manera las condiciones de cultivo favorecen la transferencia de oxígeno al interior de la biomasa en fermentación sólida y la dificultan en fermentación líquida.

Para el sistema de cultivo sumergido presentado en este trabajo, en el que se combinan los sistemas sólido y líquido, nos muestra una significativa mejora en la producción, tanto de biomasa como de enzima invertasa con respecto a la producción del sistema líquido, además mostrando una mayor facilidad en la distribución de temperatura y agitación que el cultivo sólido, en este trabajo solo se evaluó usando el 10% del soporte sólido, sería recomendable continuar este trabajo con mayores concentraciones del soporte al fin de buscar una mejor producción.

8. REFERENCIAS.

Andjelković U, Pićurić S, Vujčić Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry* **2010**;120:799–804.

Baños J, Tomasini A, Szakács G, Barrios-González J. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2009**;108:105–110.

Baker SE. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology* **2006**;44:17–21.

Brown V, Sabina J, Johnston M. Specialized Sugar Sensing in Diverse Fungi. *Current Biology* **2009**;19:436–441.

Boddy L, Bergès T, Barreau C, Vainstein M, Dobson M, Balance D, Peberdy J. Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Current Genetics*. 1993;24:60-66.

Bos CJ, Debets AJ, Swart K, Huybers A, Kobus G, Slakhorst SM. Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. *Curr Genet* **1988**;14:437-43.

Dupas J, Girard V, Forny L. Reconstitution Properties of Sucrose and Maltodextrins. *Langmuir* **2017**;31:988-995.

Gougouli M, Koutsoumanis K. Relation between germination and mycelium growth of individual fungal spores. *International Journal of Food Microbiology* **2013**;161:231–239.

Hashemi M, Razavi S, Shojaosadati S, Mousavi S, Khajeh K, Safari M. Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2010**;110:333–337.

Herrera T, Ulloa M. El reino de los hongos Micología básica y aplicada. 2a. Edición. Mexico: Fondo de Cultura Económica, 2005;13:118-321.

Hu T, Zhou Y, Da L, Wang Y, Liu D, Zhang J, Liu H. Enhanced cellulase production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. *Procedia Engineering* **2011**;18:335–340.

Hussain A, Rashid M, Perveen R, Ashraf M. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* **2009**;47:188–194.

Iandolo D, Piscitelli A, Sannia G, Faraco. Enzyme Production by Solid Substrate Fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on Tomato Pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**;163:40–51.

Ichinose S, Tanaka M, Shintani T, Gomi K. Improved α -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**;98:335–343.

Jezkova Z, Binda E, Potocar T, Marinelli F, Halecky M, Branyik T. Laboratory scale cultivation of *Salinispora tropica* in shake flasks and mechanically stirred bioreactors. *Biotechnol Lett* **2021**;43:1715-1722.

Kubicek-Pranz E, Mozelt M. Changes in the concentration of fructose-2,6-biphosphate in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentrations. *Biochimica et Biophysica* **1990**;1033:250-255.

Kumar S, Sharma H, Sarkar B. Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Science and Biotechnology* **2011**;20:1289–1298.

Kumar V, Ahluwalia V, Saran S, Kumar J, Patel AK, Singhanian RR. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresour Technol* **2021**;323:124566.

Kunz PJ, Barthel L, Meyer V, King R. Vesicle transport and growth dynamics in *Aspergillus niger*: Microscale modeling of secretory vesicle flow and centerline extraction from confocal fluorescent data. *Biotechnol Bioeng* **2020**;117:2875-2886.

Liang CH, Wu CY, Ho WJ, Liang ZC. Influences of carbon and nitrogen source addition, water content, and initial pH of grain medium on hispidin production of *Phellinus linteus* by solid-state fermentation. *J Biosci Bioeng* **2020**;6:616-621.

Mason C. Dynamics of Microbial Growth in the Decelerating and Stationary Phase of Batch Culture. *Starvation in Bacteria* **1993**;10:81–102.

Mazotto A, Couri S, Damaso M, Vermelho A. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2013**;85:189–195.

McKee LS. Measuring Enzyme Kinetics of Glycoside Hydrolases Using the 3,5-Dinitrosalicylic Acid Assay. *Methods Mol Biol* **2017**;1588:27-36.

Meyer V, Wu B, Ram A. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters* **2010**;33:469–476.

Moo-Young M, Moreira A, Tengerdy R. Principles of Solid-Substrate Fermentation. En: *The Filamentous Fungi*. 1a. edicion. Londres: Editorial Arnold, **1983**;vol.4:117-143.

Mrudula S, Murugammal R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, **2011**;42:1119–1127.

Mukherjee K, Sengupta S. The production of constitutive invertase and inulinase by the mushroom *Panaeolus papillonaceus* in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology* **1985**;31:773-777.

Mussatto S, Aguilar C, Rodrigues L, Teixeira J. Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**;59:76–81.

Nemoto T, Watanabe T, Mizogami Y, Maruyama J, Kitamoto K. Isolation of *Aspergillus oryzae* mutants for heterologous protein production from a double proteinase gene disruptant. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**;82: 1105–1114.

Nevalainen A, Täubel M, Hyvärinen A. Indoor fungi: companions and contaminants. *Indoor Air*, **2015**;25:125–156.

Papagianni M, Matthey M, Kristiansen, B. The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**;25:710–717.(A)

Papagianni M., Matthey, M, Kristiansen B. Hyphal vacuolation and fragmentation in batch and fed-batch culture of *Aspergillus niger* and its relation to citric acid production. *Process Biochemistry* **1999**;35:359–366.(B)

Patil S, Dayanand A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology* **2006**;97:2054–2058

Peberdy J. Protein secretion in filamentous fungi — trying to understand a highly productive black box. *Trends in Biotechnology* **1994**;12:50–57.

Pelechano V, Wei W, Steinmetz L. Extensive transcriptional heterogeneity revealed by isoform profiling. *Nature* **2013**;497:127–131.

Pérez J, Rodríguez J, Rodríguez L, Ruiz T. Cloning and sequence analysis of the invertase gene INV 1 from the yeast *Pichia anomala*. *Current Genetics*. **1996**;29:234-240.

Pirt J. Principles of microbial, and cell cultivation. Academic Press. Blackwell Scientific Publications **1975**;3:13-27.

Pontecorvo G, Roper Ja, Hemmons Lm, Macdonald Kd, Bufton Aw. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **1953**;5:141-238.

Rodríguez-Zúñiga U, Couri S, Neto V, Crestana S, Farinas C. Integrated Strategies to Enhance Cellulolytic Enzyme Production Using an Instrumented Bioreactor for Solid-State Fermentation of Sugarcane Bagasse. *BioEnergy Research* **2011**;6: 142–152.

Saratale G, Kshirsagar S, Sampange V, Saratale R, Oh S, Govindwar S, Oh M. Cellulolytic Enzymes Production by Utilizing Agricultural Wastes Under Solid State Fermentation and its Application for Biohydrogen Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2014**;174:2801–2817.

Singhania R, Patel A, Soccol C, Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **2009**;44:13–18.

Singhania R, Sukumaran R, Patel A, Larroche C, Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* **2010**;46: 541–549.

Solomon R. Growth of *Aspergillus* in liquid fermenters. *Filamentous fungi (Industrial mycology)*. 1a.edicion. Londres: Editorial Edward Arnold. **1975**;vol1:322.

Son S, Osmani S. Analysis of All Protein Phosphatase Genes in *Aspergillus nidulans* Identifies a New Mitotic Regulator, Fcp1. *Eukaryotic Cell* **2009**;8:573–585.

Subramaniyam R, Vimala R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. School of Biosciences and technology **2014**;63:10-20.

Thomas L, Larroche C, Pandey A. Current developments in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal **2013**;81:146–161.

Trujillo-Toledo L, Martinez-García D, Pérez C, Rivera-Intriago L, Pérez J, Pais Chanfrau J. Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries. Enzymes in Food Biotechnology **2009**;3:451–469.

Viana P, de Rezende S, Passos F, Oliveira J, Teixeira K, Santos A, Guimarães V. Debaryomyces hanseniiUFV-1 Intracellular α -Galactosidase Characterization and Comparative Studies with the Extracellular Enzyme. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2009**;57:2515–2522.

Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar C, Romero-Gomez S, Díaz-Godínez G, Augur C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Biochemical Engineering Journal **2003**;13:157–167.

Viniegra-González G. New Horizons for the Production of Industrial Enzymes by Solid-State Fermentation. Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI **2014**;10:319–340.

Visser H, Joosten V, Punt P, Gusakov A, Olson P, Joosten R, Wery J. Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a Myceliophthora thermophila isolate, previously known as Chrysosporium lucknowense C1. Industrial Biotechnology **2011**;7:214–223.

Wessels J. Fungi in their own right. **Fungal Genetics and Biology** 1999;27:134-145.

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