

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PRODUCCIÓN DE LISOZIMA RECOMBINANTE POR  
*Aspergillus niger* B1 EN CULTIVO INMOVILIZADO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**OSBALDO JESÚS TREJO DÍAZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PRODUCCIÓN DE LISOZIMA RECOMBINANTE POR  
*Aspergillus niger* B1 EN CULTIVO INMOVILIZADO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**OSBALDO JESÚS TREJO DÍAZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ**

**SINODALES**

**Dr. SERGIO DE JESUS ROMERO GÓMEZ**

**DIRECTOR**

**Dr. ANGEL ROBERTO MARTÍNEZ CAMPOS**

**SINODAL**

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

**SINODAL**

**M. en C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ**

**SINODAL**

---

---

---

---

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1    Hongos filamentosos	3
II.1.1    Uso industrial de los hongos filamentosos	4
II.2 <i>Aspergillus niger</i>	4
II.3    Fábrica metabólica	5
II.4    Sistema de fusión	5
II.5    Fermentación sumergida	7
II.6    Fermentación sólida	8
II.7    Fermentación inmovilizada con espuma de poliuretano	9
III. HIPÓTESIS	11
IV. OBJETIVOS	12
IV.1    General	12
IV.2    Específicos	12
V. METODOLOGÍA	13
V.1    Materiales	13
V.1.1    Cepa	13
V.1.2    Incubadora	13
V.1.3    Espectrofotómetro	13
V.1.4    Potenciómetro	13
V.1.5    Bomba de vacío	13
V.1.6    Microscopio óptico	13
V.1.7    Medios de cultivo	14
V.1.7.1    Medio de Archer	14

V.1.7.2	Medio de Gheshlaghi	14
V.1.7.3	Medio con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno	14
V.1.7.4	Medio con $\text{NaNO}_3$ como fuente de nitrógeno	14
V.2	Métodos	15
V.2.1	Fermentación sumergida	15
V.2.2	Fermentación inmovilizada	15
V.2.3	Preparación del poliuretano	15
V.2.4	Determinación de la biomasa en fermentación sumergida	15
V.2.5	Determinación de la biomasa en fermentación inmovilizada	15
V.2.6	Determinación de pH	16
V.2.7	Cuantificación de proteína en los extractos	16
V.2.8	Ensayos enzimáticos	16
V.3	Diseño experimental	16
V.3.1	Análisis estadístico	16
VI.	RESULTADOS	17
VI.1	Producción de lisozima recombinante en el medio de Archer	17
VI.2	Producción de lisozima recombinante en el medio de Gheshlaghi	21
VI.3	Producción de lisozima recombinante en el medio mínimo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno	25
VI.4	Producción de lisozima recombinante en el medio mínimo con $\text{NaNO}_3$ como fuente de nitrógeno	29
VII.	DISCUSIÓN	33
VIII.	CONCLUSIÓN	37
IX.	BIBLIOGRAFÍA	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Construcción de la fusión Gla-HEWL	6
2	Producción de biomasa por <i>A. niger</i> B1 cultivado en el medio de Archer	17
3	Producción de lisozima por <i>A. niger</i> B1 en el medio de Archer	18
4	Concentración de proteínas liberadas por <i>A. niger</i> B1 en el medio de Archer	19
5	Perfil del pH producido por <i>A. niger</i> B1 en el medio de Archer	20
6	Producción de biomasa por <i>A. niger</i> B1 cultivado en el medio de Gheshlaghi	21
7	Producción de lisozima por <i>A. niger</i> B1 en el medio de Gheshlaghi	22
8	Concentración de proteínas liberadas por <i>A. niger</i> B1 en el medio de Gheshlaghi	23
9	Perfil del pH producido por <i>A. niger</i> B1 en el medio de Gheshlaghi	24
10	Producción de biomasa por <i>A. niger</i> B1 cultivado en el medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	26
11	Producción de lisozima por <i>A. niger</i> B1 en el medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	27
12	Concentración de proteínas liberadas por <i>A. niger</i> B1 en el medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	27
13	Perfil del pH producido por <i>A. niger</i> B1 en el medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	28

14	Producción de biomasa por <i>A. niger</i> B1 cultivado en el medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno	29
15	Producción de lisozima por <i>A. niger</i> B1 en el medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno	30
16	Concentración de proteínas liberadas por <i>A. niger</i> B1 en el medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno	31
17	Perfil del pH producido por <i>A. niger</i> B1 en el medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno	32

## RESUMEN

En este trabajo se comparó la producción de la lisozima de huevo de gallina por *Aspergillus niger* B1 en fermentación sumergida y en cultivo inmovilizado usando espuma de poliuretano como soporte inerte. En la primera parte, la producción se realizó usando dos medios de cultivo diseñados para fermentación sumergida: el medio de Archer (1991) y el medio de Gheshlaghi (2005); en ambos casos se obtuvo una producción más alta de lisozima en fermentación sumergida que en cultivo inmovilizado. En la segunda parte de la tesis se diseñó un medio de cultivo basado en reportes de fermentación sólida con una relación carbono/nitrógeno de 5 y se ensayaron dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y nitrato de sodio. El uso de una relación carbono-nitrógeno más alta permitió aumentar la producción de lisozima aproximadamente en un 15%. La fuente de nitrógeno presentó un efecto radical sobre la producción de lisozima, el sulfato de amonio permitió obtener una producción de lisozima 20% más alta en cultivo inmovilizado que en fermentación sumergida mientras que con el nitrato de sodio la producción de lisozima fue un 40% menor en cultivo inmovilizado que en fermentación sumergida. Los resultados demuestran que es posible obtener rendimientos equivalentes de lisozima en fermentación inmovilizada usando medios mínimos a los obtenidos en fermentación sumergida usando medios complejos, se demostró que la fuente de nitrógeno tiene un papel muy importante sobre la producción de lisozima y como ventaja adicional se obtuvieron resultados que pueden analizarse en su totalidad gracias al uso de medios simples.

## I. INTRODUCCIÓN

*Aspergillus niger* es un hongo filamentoso ampliamente utilizado a nivel industrial para la producción de enzimas y ácidos orgánicos. Tiene la capacidad de secretar grandes cantidades de estos compuestos y la habilidad de realizar modificaciones postraduccionales a sus proteínas por ser un organismo eucarionte y además, cuenta con el status GRAS por la FDA. Gracias a esto se ha propuesto el uso de *A. niger* como fábrica metabólica de proteínas homólogas y heterólogas.

Sin embargo, los rendimientos de proteínas heterólogas obtenidas en cultivos sumergidos de *A. niger* generalmente son del orden de mg/L. Por lo anterior se han ideados sistemas con la ayuda de la biología molecular para intentar resolver el problema. Uno de ellos es el sistema de fusión, el cual consiste en unir el gen de la proteína heteróloga con el gen de una proteína que se exprese de forma adecuada por el hongo; esto ha permitido aumentar los rendimientos de proteína, gracias a la presencia de secuencias propias del hongo en la proteína acarreadora. Pero salvo algunas excepciones, los rendimientos mejorados todavía están lejos de los necesarios para realizar la producción comercial de las proteínas recombinantes.

En la gran mayoría de los trabajos de expresión de proteínas se utiliza un sistema de cultivo en fermentación sumergida (FSm) donde el hongo se desarrolla inmerso en una matriz agitada de medio líquido definido. Existen múltiples reportes de que aun cuando es muy eficiente para la producción de ácidos orgánicos, es ineficiente para la producción de proteínas recombinantes debido a que somete al hongo a varios tipos de limitaciones como hipoxia, estrés mecánico y problemas de intercambio de materiales con el medio de cultivo.

Se ha trabajado en alternativas a la FSm para el cultivo de los hongos filamentosos y se ha reportado que la fermentación sólida (FSO) permite obtener mayores niveles de proteínas propias con menores tiempos de producción y se ha obtenido de manera reiterada la producción de proteínas exclusivas de este tipo de cultivo que normalmente presentan actividades enzimáticas mas altas que las

producidas por Fsm, esto se ha atribuido a la presencia del sustrato en la que se desarrolla el hongo. Un caso representativo es la glucoamilasa B de *Aspergillus oryzae*; la glaB se expresa en un nivel casi 200 veces más alto en FSo que en FSm. Sin embargo, es difícil analizar el crecimiento del hongo y la producción de proteínas en este tipo de cultivo, ya que el soporte es complejo y se hace muy difícil modificar las condiciones de fermentación; contrario a lo que sucede en la FSm donde se conocen la totalidad los componentes del medio y se pueden controlar las condiciones de cultivo, pero la producción de la proteína es mucho menor.

La fermentación inmovilizada (INM) es un sistema de cultivo donde el hongo crece adherido a un soporte que no forma parte del medio de cultivo, este sistema ofrece las ventajas de desarrollo del hongo como si creciera en FSo y permite usar un medio definido con condiciones de cultivo controladas como en la FSm. Para este trabajo se usó espuma de poliuretano (EPU) como soporte inerte, ya que no interfiere de ninguna forma con el desarrollo del hongo o el análisis de la fermentación y en trabajos anteriores ha demostrado ser un buen soporte para la producción de proteínas propias.

La cepa B1 que se usa en este trabajo, es una cepa modificada que contiene un sistema de fusión en el que la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) se encuentra fusionada a la secuencia que codifica los primeros 498 codones del gen de glucoamilasa A de *Aspergillus niger* (*glaA*) y se expresa de forma inducible bajo el control del promotor de glucoamilasa A del hongo.

La combinación de un soporte inerte y una cepa en la que se puede regular la expresión de una proteína recombinante, nos permitirá analizar el crecimiento de la cepa *A. niger* B1 y la expresión de la lisozima recombinante en cultivo inmovilizado y compararlo con los obtenidos en cultivo sumergido; a fin de determinar si la espuma de poliuretano es un soporte adecuado para la producción de proteínas recombinantes por hongos filamentosos.

## II. ANTECEDENTES

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

Los hongos filamentosos son comúnmente conocidos como el crecimiento que aparece frecuentemente sobre las frutas y los alimentos donde se les da el nombre de moho. El término moho es un nombre común que carece de significación taxonómica y se aplica a una variedad de hongos que crecen como organismos semi-microscópicos, cuyo micelio tiende a formar una red suelta en lugar de un tejido denso. Es en esto en que los mohos u hongos filamentosos se distinguen de los grandes hongos carnosos, como las setas comestibles o los champiñones. Los mohos pueden pertenecer a cualquier clase de hongo, pero la mayoría de las especies son Deuteromicetos u hongos imperfectos. Los mohos más comunes pertenecen a las especies de *Aspergillus*, *Neurospora* o *Penicillium* (Romero, 2001).

### II.1.1 Uso industrial de los hongos filamentosos

Los hongos filamentosos se utilizan en muchos procesos industriales, tales como la producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, polialcoholes, pigmentos, lípidos y glicolípidos. Algunos de estos productos son producidos comercialmente, mientras que otros son potencialmente valiosos para la biotecnología. Asimismo sus metabolitos secundarios son muy importantes para nuestra salud y la nutrición y pueden tener un impacto económico muy alto (Adrio y Demain, 2003).

La capacidad que tienen los hongos filamentosos de crecer en sustratos muy simples y de bajo costo, así como su habilidad para producir una amplia gama de metabolitos de utilidad comercial atrajeron un interés considerable para ser explotados como fábricas celulares (Meyer, 2008). Con la ayuda de la biotecnología se ha desarrollado la producción de enzimas fuera de su aplicación tradicional, lo que ha conducido a la identificación de cepas y al desarrollo de variedades mejoradas, permitiendo la producción de grandes cantidades de enzimas industriales, así como de proteínas homólogas y heterólogas (Punt y col., 2002; Nevalainen y col., 2005).

### II.2 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* es un miembro del género *Aspergilli* y es ampliamente utilizado para la producción de ingredientes alimentarios, productos farmacéuticos y enzimas industriales. En su hábitat natural las cepas de *A. niger* secretan grandes cantidades de una amplia variedad de enzimas necesarias para liberar los nutrientes de los biopolímeros (Pel y col., 2007). Esta capacidad secretora es altamente explotada por la industria tanto en fermentaciones sólidas como líquidas (Pandey y col., 1999). *A. niger* tiene una larga tradición de uso seguro en la producción de enzimas y ácidos orgánicos, ya que los productos que se obtienen de este microorganismo tienen el grado GRAS (Generalmente Considerado Como Seguro) otorgado por la FDA (Finkelstein y col., 1989).

### II.3 Fábrica metabólica

La combinación de seguridad con la alta capacidad de producción y el desarrollo de métodos para transformar a *A. niger*, ha abierto la posibilidad de utilizarlos como fábricas metabólicas para la expresión de proteínas recombinantes fúngicas y heterólogas (especialmente de origen animal) de interés comercial (Archer y Peberdy, 1997; Conesa y col., 2001; Adrio y col., 2003).

*A. niger* es capaz de realizar correctamente las modificaciones postraduccionales de casi todas las proteínas heterólogas expresadas en él y secretarlas de manera activa al medio de cultivo (Ward y col., 2005), debido a esto varios investigadores han trabajado para incrementar estos niveles de producción. Se han probado varias estrategias apoyadas por la biología molecular, como la optimización de codones, la modificación de señales de secreción, la sobreexpresión de chaperoninas y la fusión de los genes de proteínas heterólogas con proteínas acarreadoras nativas de *A. niger*, entre otras; gracias a estos avances, los niveles de transcripción de los genes heterólogas no son una limitante en la mayor parte de los casos, pero los niveles de producción siguen siendo muy bajos para su producción comercial (Nevalainen y col., 2005).

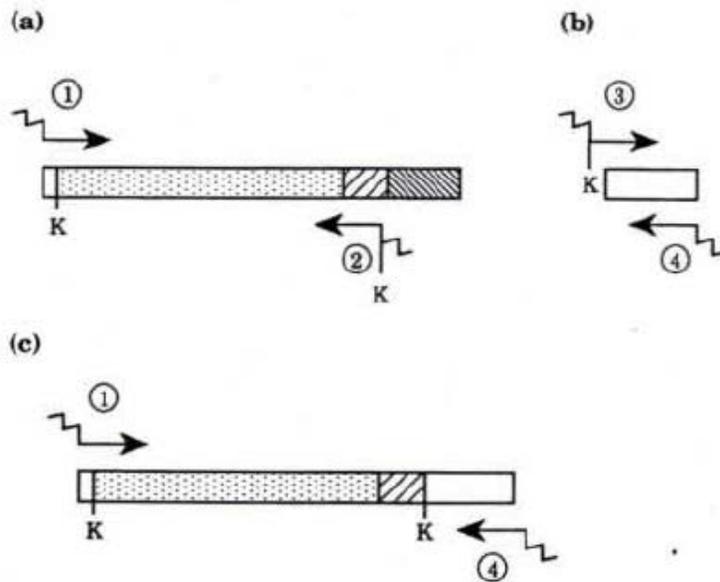
### II.4 Sistema de fusión

Una amplia gama de proteínas de otros hongos de diversas fuentes se han producido en *A. niger* a niveles comercialmente aceptables, pero los rendimientos de proteínas heterólogas secretadas han sido decepcionantes, por lo que ha sido necesario idear estrategias para incrementar los rendimientos de estas proteínas (Conesa y col., 2001).

Una de las estrategias principales para aumentar la producción de proteínas heterólogas es la fusión de la secuencia que codifica para el péptido maduro de la proteína heteróloga de interés tras el fragmento de una proteína nativa del hongo que se sabe que se secreta muy bien, normalmente la glucoamilasa de *A. niger* (Jeenes y col., 1993).

El ejemplo más claro del sistema de fusión es el de la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL, por sus siglas en inglés), en donde la secuencia del gen

de la HEWL es fusionada a la secuencia del gen de la glucoamilasa de *A. niger* por medio de un sitio de hidrólisis llamado KEX2 (Figura 1) (Jeenes y col., 1993).



**Figura 1. Construcción de la fusión Gla-HEWL. (a)** DNA que codifica para el dominio catalítico (aminoácidos 1-440) de la glucoamilasa; DNA que codifica para la región de unión (aminoácidos 441-512) de la glucoamilasa; DNA que codifica para la unión al almidón (aminoácidos 513-616) de la glucoamilasa. **(b)** DNA que codifica la HEWL (excluyendo la señal de secreción). **(c)** DNA que codifica para la proteína de fusión Gla-HEWL. Dos sitios de corte del tipo proteasa KEX2 son indicados por la letra K (Reproducido de Jeenes y col.,1993).

En el sistema de fusión la proteína propia del hongo facilita el paso de la proteína de heteróloga a través del aparato de secreción del hongo y el sitio de proteólisis KEX2 sirve para separar la lisozima madura de la glucoamilasa del hongo en el aparato de Golgi, previo a su secreción; los aminoácidos específicos de este sitio de corte (NVISKR) se incluyen en el pre-péptido de la glucoamilasa misma. (Punt y col., 2002; Van de Ven y col., 1993).

Este sistema permitió aumentar los rendimientos de secreción de la proteína heteróloga fusionada con la glucoamilasa con respecto a los que se obtienen expresando el gen completo de la HEWL. Se ha reportado que esto se debe a que

el nivel de transcripción de mRNA de la HEWL-Gla es mucho más alto que el mRNA de la HEWL sin fusión y a que se incrementa el ingreso del péptido en formación al lumen del retículo endoplásmico donde se realizan el plegamiento y las modificaciones postraduccionales de la proteína (Jeenes y col., 1993; Talabardón y Yang, 2005).

Gracias a estos avances, los niveles de transcripción de los genes heterólogos no son una limitante en la mayor parte de los casos, pero los niveles de producción siguen siendo muy bajos para su producción comercial (Jeenes y col., 1994; Conesa y col., 2001; Nevalainen y col., 2005).

## II.5 Fermentación sumergida

La fermentación líquida o sumergida (Fsm) es un sistema de cultivo donde las células microbianas crecen dentro de una matriz líquida 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 (Papagianni, 2004).

*A. niger* es cultivado en FSm para la producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, alcoholes, pigmentos, lípidos y glicolípidos, ya que a nivel industrial es mucho más barato y sencillo utilizar este sistema de cultivo (Adrio y col., 2003). Debido a esto la mayoría de los estudios sobre la producción de proteínas heterólogas por hongos filamentosos se han realizado en fermentación sumergida. Sin embargo, cada vez se reportan mas trabajos donde se ha demostrado que la secreción de proteínas recombinantes en este sistema de cultivo es un proceso poco eficiente debido a que el hongo sufre de diferentes tipos de estrés, en especial hipoxia y limitación del intercambio de materiales con el medio de cultivo (Pakula y col., 2005; Sims y col., 2005; Arvas y col., 2006).

## II.6 Fermentación sólida

La fermentación sólida (FSo) es un sistema de cultivo de microorganismos donde estos se desarrollan sobre un soporte sólido poroso y humedecido con un medio de cultivo, el cual está extendido en una capa muy fina en contacto con una interfase aérea. La Fso simula el crecimiento natural de microorganismos que se desarrollan sobre sólidos húmedos, existen registros de que la fermentación sólida podría haber sido la primera técnica de la fermentación usada en los tiempos antiguos.

Los microorganismos que se adaptan al cultivo sólido son las bacterias, levaduras y hongos, pero debido a su crecimiento en forma de micelio, la tolerancia a bajas actividades de agua y a condiciones de alta osmolaridad hacen que los hongos y en especial los mohos sean la micro flora natural más adecuada para ser cultivados en fermentación sólida, debido a esto la mayoría de las investigaciones sobre producción de proteínas en FSo se llevan a cabo con hongos filamentosos. (Pandey, 2003).

Se ha reportado que la FSo promueve una mayor producción de proteínas con menores tiempos de cultivo, una mayor secreción proteica, producción de proteínas más resistentes a cambios de pH y temperatura, secreción eficiente de proteínas que son intracelulares en fermentación sumergida, insensibilidad a la represión catabólica e inhibición de la síntesis de proteasas (Lekha y Lonsane, 1994; Romero y col., 2000; Viniegra y col., 2003; Parra y col., 2005; Talabardon y Yang, 2005; Viniegra y Favela, 2006; Mohapatra y col., 2007). Además, existen trabajos que reportan la expresión de genes exclusivos para este tipo de crecimiento (Hata y col., 1998; Oda y col., 2006). El análisis de varios de estos trabajos sugiere que las diferencias en la secreción no solo son cuantitativas, sino cualitativas, y al parecer se deben a que tanto la expresión de genes como las modificaciones postraduccionales y la secreción final de las proteínas se llevan a cabo de una manera diferente a la fermentación sumergida y parecen ser dependientes del tipo de crecimiento en forma de micelio contrario al crecimiento en forma de pellet que se observa en FSm, sin embargo no existe una explicación

contundente para esta fenómeno hasta ahora (Maras y col., 1999; Te Biesebeke y col., 2005; Ishida y col., 2006; Oda y col., 2006).

Por otra parte existen reportes de producción de proteínas heterólogas en Fso que muestran que los rendimientos de producción son los mismos o más bajos que otros sistemas (Punt y col., 2002). Además, tratar de realizar una comparación entre la FSm y la FSo es muy complicado, ya que analizar las diferencias en el tipo de crecimiento y las condiciones de cultivo que son responsables de los cambios de producción y secreción de proteínas es muy difícil, principalmente por que los soportes empleados en este sistema de cultivo son en su mayoría desechos agroindustriales que son bioquímica y estructuralmente muy complejos (Pandey, 2003; Rahardjo y col., 2004; Parra y col., 2005).

La dificultad de análisis de la Fso es mayor debido a que el micelio de los hongos penetra y consume el soporte se hace muy complicado obtener datos confiables de la biomasa producida durante la fermentación y este es un dato primordial en el análisis de cultivos (Koutinas y col., 2003). También, estos soportes pueden modificar las condiciones del cultivo (pH,  $a_w$ ) (Parra y col., 2004), representan una barrera para la difusión de oxígeno y agua (Rahardjo y col., 2004) y los carbohidratos complejos de que están formados pueden inducir o reprimir a familias enteras de proteínas (Te Biesebeke y col., 2006).

Por lo anterior, no se cuenta con la información suficiente que sustente la explicación acerca de las ventajas en producción y secreción de la FSo sobre la FSm (Kobayashi y col., 2007).

## II.7 Fermentación inmovilizada con espuma de poliuretano como soporte

A fin de adquirir información básica sobre la producción y secreción de proteínas por hongos filamentosos crecidos en forma de micelio se han utilizado varios tipos de soportes como pectato de calcio, alginatos y en tiempos recientes la espuma de poliuretano (Romero y col., 2000).

La fermentación inmobilizada (INM) sobre espuma de poliuretano (EPU) como soporte impregnando con un medio de cultivo líquido sintético, intenta simular las condiciones de cultivo que anteriormente se llevaba a cabo en salvado de trigo, para permitir el análisis completo de la fermentación (Romero, 2001). La EPU es un soporte inerte, no degradable por el organismo y con la geometría adecuada para permitir el crecimiento de *A. niger* en forma de micelio disperso (Raimbault, 1998). Con este sistema, la biomasa, que es un parámetro importante para la evaluación de la fermentación en estado sólido, puede ser medida directamente (Zhu y col., 1994).

El primer reporte de uso de la EPU para la producción de enzimas por varias especies de hongos se publicó en 1972 por Fujishima. En 1994 Zhu y col. utilizaron la INM para producir nucleasa P1 de *Penicillium citrinum*. Actualmente la espuma de poliuretano se emplea para la producción de enzimas y metabolitos secundarios con muy buenos resultados (Aranda y col., 2006; Bigelis y col., 2006; Téllez y col., 2006). Además, se ha reportado que la producción de proteínas propias en este sistema es mayor a la obtenida en INM y los tiempos de cultivo son mucho menores, lo que permite obtener una productividad mucho más alta de los cultivos (Romero, 2001). En la actualidad la INM se usa como un proceso de inmobilización celular para aumentar la producción de enzimas propias del hongo, sin embargo, no existen datos que indiquen qué sucede con una producción de proteínas recombinantes heterólogas en este tipo de cultivo.

### **III. HIPÓTESIS**

El uso de espuma de poliuretano como soporte en fermentación inmovilizada para la producción de lisozima por *Aspergillus niger* B1 permitirá obtener mayores niveles de producción que la fermentación sumergida.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Establecer un sistema de producción de proteínas heterólogas por el hongo filamentoso *Aspergillus niger* en cultivo inmovilizado usando el poliuretano como soporte inerte.

### IV.2 Específicos

- Analizar el efecto de la proporción carbono-nitrógeno en el medio sobre la producción de lisozima por *Aspergillus niger* B1 en fermentación inmovilizada.
- Aumentar la producción de lisozima por la cepa de B1 de *Aspergillus niger* B1 por medio de la mejora del medio de cultivo en fuente de nitrógeno y relación carbono-nitrógeno en fermentación inmovilizada.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Cepa

Se usó la cepa B1 de *Aspergillus niger* (Jeenes y col, 1993), que contiene el plásmido pIGF#18 en el que la fusión G498:HEWL, formada por los primeros 498 codones de DNA de glucoamilasa de *A. niger* fusionados a la secuencia codificante madura de la lisozima de huevo de gallina (HEWL) por medio de sitio de corte endoproteolítico KEX2, ha sido puesta bajo el control del promotor de la glucoamilasa de *A. niger*, esta cepa ha sido provista por el Dr. David Archer. La cepa se conservó en forma de esporas desecadas y los cultivos de esporas para inóculo se cultivaron en PDA durante las 72 horas previas a las fermentaciones directamente de cultivos conservados.

#### V.1.2 Incubadora

Se utilizó la incubadora MRC para los cultivos inmovilizados y sumergidos.

#### V.1.3 Espectrofotómetro

Se usó el espectrofotómetro de UV-VIS Thermo-SCIENTIFIC Genesys 10-s para la medición de las actividades enzimáticas y concentración de proteínas.

#### V.1.4 Potenciómetro

Se utilizó el potenciómetro CORNING modelo 442 para la medición del pH.

#### V.1.5 Bomba de vacío

Se usó la bomba de vacío Labconco 195 para la extracción del medio de los cultivos inmovilizados.

#### V.1.6 Microscopio óptico.

Se utilizó el microscopio óptico WESCO modelo FL-T1 para el conteo de las esporas que se inocularon en cada cultivo.

## V.1.7 Medios de cultivo

### V.1.7.1 Medio de Archer

El medio desarrollado por Archer y col. (1997) contiene en g/L: glucosa 2.5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.25; extracto de levadura 0.5; peptona 0.5 y 10% de amortiguador de citratos 0.97M a pH 6.5. El medio se esterilizó a 15 PSI (Libra-fuerza por pulgada cuadrada) por 15 minutos.

### V.1.7.2 Medio de Gheshlaghi

El medio desarrollado por Gheshlaghi y col. (2005) contiene en g/L: almidón 34; peptona 34;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  11.9; extracto de levadura 0.5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.83;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.57;  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.012;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0057;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0077. El medio se esterilizó a 10 PSI por 10 minutos sin el  $\text{CaCl}_2$  y al terminar se le añadió el  $\text{CaCl}_2$  que se esterilizó a 15 PSI por 15 minutos.

### V.1.7.3 Medio con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno.

El medio desarrollado contiene en g/L: almidón 50 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  19;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.35;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.57;  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.012;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0057;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0077. El medio se esterilizó a 10 PSI por 10 minutos.

### V.1.7.4 Medio con $\text{NaNO}_3$ como fuente de nitrógeno.

El medio desarrollado contiene en g/L: almidón 50 g/L;  $\text{NaNO}_3$  24.3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.35;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.57;  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.012;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0057;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0077. El medio se esterilizó a 10 PSI por 10 minutos.

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL y 125 mL de capacidad, en 25 mL de medio más 1 g de espuma de poliuretano, en el caso de la fermentación inmovilizada.

Las condiciones restantes de proceso fueron: inoculación con  $1 \times 10^6$  esporas/L, 30°C y agitación orbital de 200 rpm. Se tomaron muestras cada 12 horas y se determinó la producción de lisozima.

## V.2 Métodos

### V.2.1 Fermentación sumergida (crecimiento en forma de pastilla)

Se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad, con 25 mL de medio. Se incubaron a 30° C en una incubadora orbital a 200 rpm (Gheshlaghi y col., 2005).

### V.2.2 Fermentación inmovilizada (crecimiento en forma miceliar)

Se mezclaron 25 ml de medio inoculado con 1 gramo de poliuretano estéril preparado como se describe enseguida dentro de un matraz de Erlenmeyer de 250 mL. Se incubaron a 30° C hasta su cosecha (Romero y col., 2000).

### V.2.3 Preparación del poliuretano

La espuma de poliuretano con una densidad media de 17 Kg/m<sup>3</sup>, se obtuvo de un solo proveedor comercial, se cortó en cubos de 5 mm por lado y se lavó con agua caliente dos veces. Se secó en un horno a 70° C durante toda la noche. Posteriormente, se introdujo 1 gramo de poliuretano lavado y seco en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizó en autoclave a 15 psi por 15 minutos.

### V.2.4 Determinación de la biomasa en fermentación sumergida

Los matraces completos se extrajeron a los tiempos adecuados y se filtraron a través de papel filtro Whatman No.4; la biomasa retenida se lavó con 50 mL de agua destilada y se secó en el horno a 80° C por doce horas, el peso se determinó por medio de una balanza analítica.

### V.2.5 Determinación de la biomasa en fermentación inmovilizada

El poliuretano utilizado para el crecimiento del hongo se extrajo del matraz y se filtró con una bomba de vacío para obtener el extracto de fermentación inmovilizada; este poliuretano se lavó con 50 mL de agua destilada y se secó a 80° C, el peso seco de la biomasa se determinó por la diferencia del peso del poliuretano antes y después de usarse en el cultivo.

#### V.2.6 Determinación de pH

El pH de los cultivos se determinó de manera inmediata a la obtención de los extractos usando un potenciómetro común.

#### V.2.7 Cuantificación de proteínas en los extractos

Se realizó por medio del método de Bradford (1976) a los extractos que se obtuvieron de cada una de las fermentaciones.

#### V.2.8 Ensayos Enzimáticos

Para determinar la actividad de la lisozima se usó una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* a 0.4 mg/mL en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.2 que se incubó a 30° C. La lisis celular se determinó siguiendo el decremento en la absorbancia a 600 nm por un periodo de 5 min. Una unidad de actividad se define como la caída de  $A_{600}$  de 0.001 por minuto a 30°C, posteriormente la actividad obtenida se reportó en mg/L usando la conversión estándar de 83 u/ $\mu$ g de lisozima de acuerdo con la literatura.

### V.3 Diseño experimental

#### V.3.1 Análisis estadístico

Las curvas de crecimiento, producción enzimática y consumo de azúcares se graficaron y los valores de correlación se obtuvieron por ajuste usando la herramienta solver presente en el paquete de software EXCEL de Microsoft .

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Producción de lisozima recombinante en el medio de Archer.

El medio de Archer es un medio complejo diseñado para la producción de lisozima por hongos filamentosos en fermentación sumergida, por lo que permitió realizar una primera aproximación a la producción de la lisozima recombinante por el hongo *A. niger* B1 en cultivos sumergido (SUM) e inmovilizado (INM) utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte.

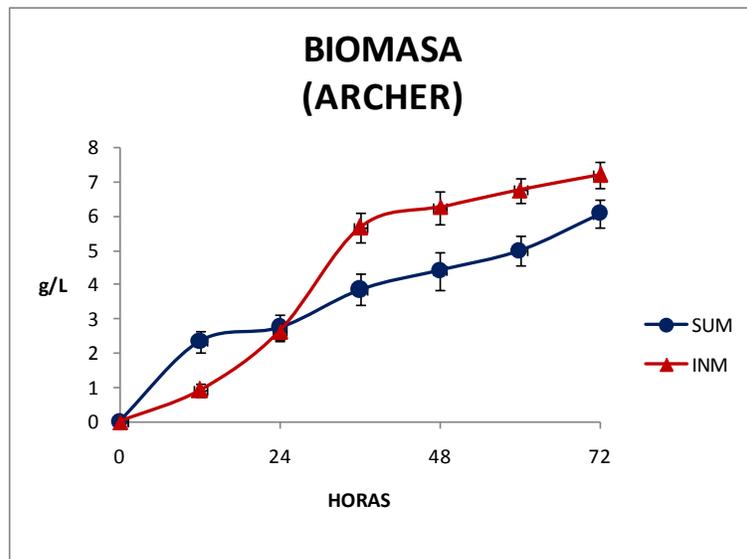


Figura 2. Producción de biomasa por *A. niger* B1 cultivado en el medio de Archer. Desviación estándar mostrada en barras de error.

La figura 2 muestra la producción de biomasa obtenida de los cultivos SUM e INM en el medio desarrollado por Archer y col (1991) en los sistemas sumergido (SUM) e inmovilizado (INM) con la espuma de poliuretano. A las 36 horas en el sistema INM la producción de biomasa es del 80% con respecto al máximo de producción a las 72 horas. El cultivo SUM mostró un crecimiento continuo durante las 72 horas de cultivo. Durante las primeras 12 horas la producción de biomasa en el cultivo SUM es de más del doble con respecto al cultivo INM; a las 24 horas es prácticamente la misma biomasa; a las 36 horas es mayor en INM (5.7 g/L) que

en SUM (3.9 g/L); durante las siguientes 36 horas el comportamiento de la producción de biomasa en el cultivo INM aumentó 20% mientras que en el SUM aumentó casi 40%.

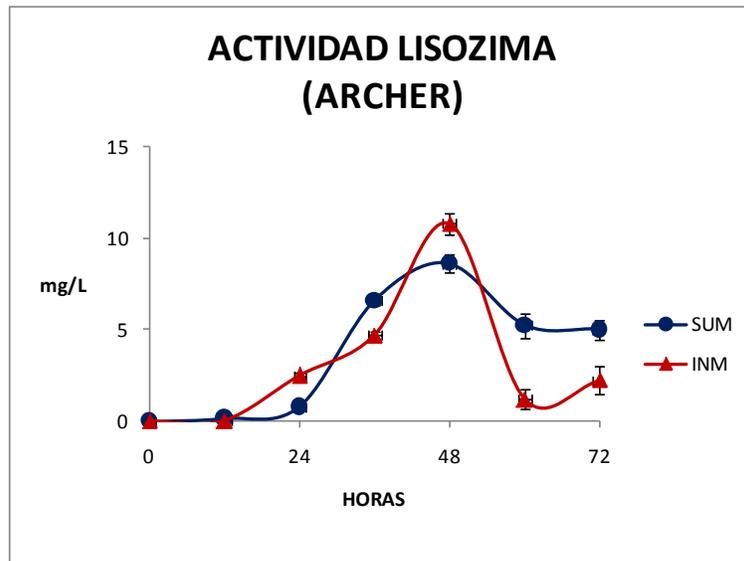


Figura 3. Producción de lisozima por *A. niger* B1 en el medio de Archer. Desviación estándar mostrada en barras de error.

La figura 3 muestra la producción de lisozima recombinante por la cepa B1 de *A. niger* cultivada en el medio de Archer en los sistemas INM y SUM. El sistema INM mostró un incremento continuo hasta las 48 horas obteniendo 11 mg/L, como máximo, luego cayó drásticamente a 1 mg/L a las 60 horas. El cultivo SUM mostró una actividad baja durante las primeras 24 horas de la fermentación y el punto de máximo producción se presentó a las 48 horas de 9 mg/L, después de este momento la actividad cayó a 5 mg/L a las 60 horas para mantenerse constante hasta las 72 horas, el valor máximo de producción es muy parecido al reportado por Archer. Ambos sistemas de cultivo presentaron el punto máximo de producción de lisozima a las 48 horas y una caída de la actividad a las 60 horas, sin embargo, la producción de lisozima fue un 25% mayor en el cultivo INM.

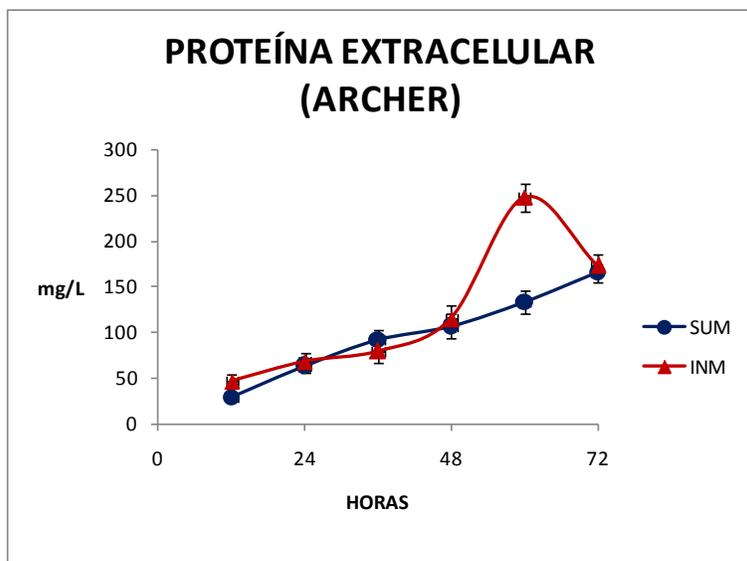


Figura 4. Concentración de proteínas liberadas por *A. niger* B1 en el medio de Archer. Desviación estándar mostrada en barras de error.

La figura 4 muestra la cantidad de proteínas liberadas por *A. niger* B1 al medio de Archer en cultivo SUM e INM. El cultivo INM se mantuvo con un incremento continuo hasta las 60 horas del cultivo, tiempo en el que la cantidad de proteína se elevó de forma significativa a 247.7 mg/L para luego disminuir a 173.6 mg/L a las 72 horas. El cultivo SUM incrementó de forma continua la liberación de proteínas y alcanzar el punto máximo de producción de 170 mg/L a las 72 horas.

La figura 5 muestra la modificación del pH por el crecimiento de *A. niger* B1 en el medio de Archer en cultivo SUM e INM. En el cultivo INM se mantuvo en un rango de pH de  $6 \pm 0.2$  durante las primeras 36 horas del cultivo, luego se elevó a un pH de 8.2 a las 48 horas y se mantuvo en un pH básico hasta las 72 horas. El cultivo SUM mantuvo un comportamiento de pH de  $6 \pm 0.4$  durante 48 horas del cultivo, luego disminuyó a un pH de 5 y por último mostró un incremento significativo hasta 6.2 a las 72 horas.

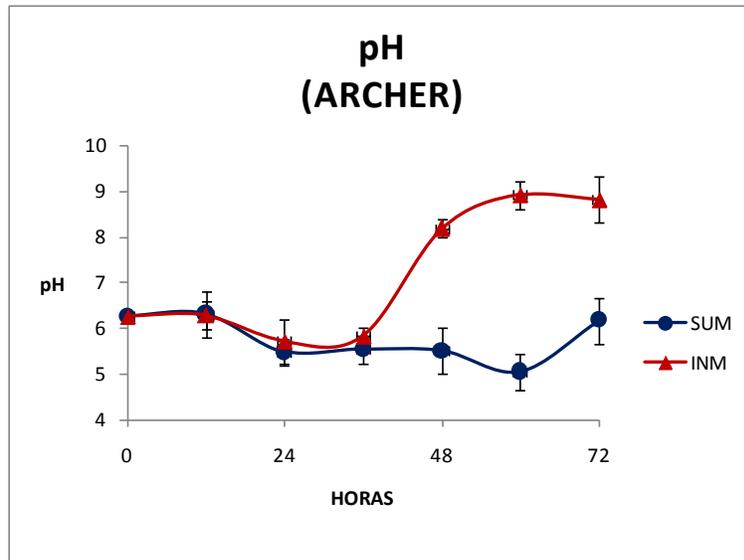


Figura 5. Variación del pH producido por *A. niger* B1 en el medio de Archer. Desviación estándar mostrada en barras de error.

De los resultados anteriores puede afirmarse que la producción de la lisozima en el cultivo INM está directamente relacionada con el crecimiento del hongo, ya que el punto más alto de producción de biomasa coincide con el punto de mayor actividad enzimática (Figura 2 y 3), la caída en la actividad enzimática puede deberse al agotamiento de la fuente de carbono que ocasiona que el hongo comience a morir, lo que a su vez produce una autólisis y la liberación de proteínas intracelulares (Figura 4) que se refleja en el aumento en el pH del medio (Figura 5), entre las proteínas liberadas pueden estar proteasas intracelulares que afectan directamente la actividad de la lisozima, este escenario ya ha sido reportado por Talabardón y Yang (2005) para otro sistema de cultivo inmovilizado.

En el cultivo SUM el desarrollo del hongo mostró un incremento constante de la biomasa y producción de lisozima en las primeras etapas del cultivo (Figura 2 y 3), la velocidad de producción de la lisozima disminuyó en el momento en que el hongo disminuyó su velocidad de crecimiento, en este sistema de cultivo el crecimiento del hongo produjo la acumulación de ácidos orgánicos muy probablemente ácido cítrico provocando que el pH disminuyera (Figura 5) y dado que la producción y secreción de proteasa en *A. niger* están reguladas por el pH,

la caída en el valor del pH puede haber incrementado la liberación de proteasas al medio extracelular (Figura 4) afectando a la actividad enzimática (Papagianni y col., 2002).

## VI.2 Producción de lisozima recombinante en el medio de Gheshlaghy.

El medio desarrollado por Gheshlaghy y col. (2005) fue optimizado para la producción de lisozima de huevo de gallina por la cepa B1 en medio sumergido, por lo que se utilizó para hacer una comparación entre el cultivo SUM y el cultivo INM con espuma de poliuretano en un medio especializado para sistemas sumergidos.

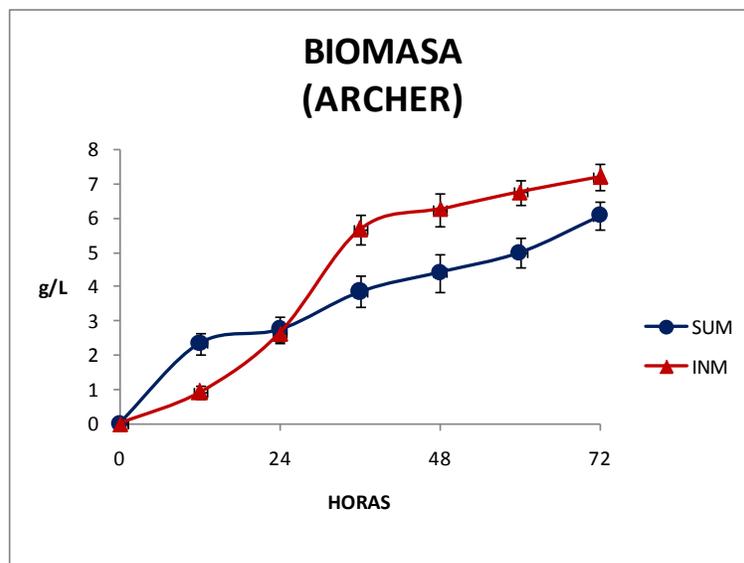


Figura 6. Producción de biomasa por *A. niger* B1 cultivado en el medio de Gheshlaghi. Desviación estándar mostrada en barras de error.

En la figura 6 se muestra la producción de biomasa obtenida en los cultivos SUM e INM en el medio desarrollado por Gheshlaghi y col. (2005) en los sistemas SUM e INM. En el cultivo INM el hongo alcanzó los 9.2 g/L en 24 horas y 19.5 g/L a las 60 horas, sin un incremento significativo hasta las 72 hrs. El cultivo SUM

mostró una producción de biomasa constante, alcanzando 7.3 g/L a las 60 horas del cultivo. A pesar de que la producción de biomasa en el cultivo INM fue de más de 100% mayor que la de SUM, ambas fermentaciones terminaron a las 60 horas.

En la figura 7 se muestra la producción de lisozima recombinante por la cepa *A. niger* B1 cultivada en el medio de Gheshlaghi en los sistemas SUM e INM.

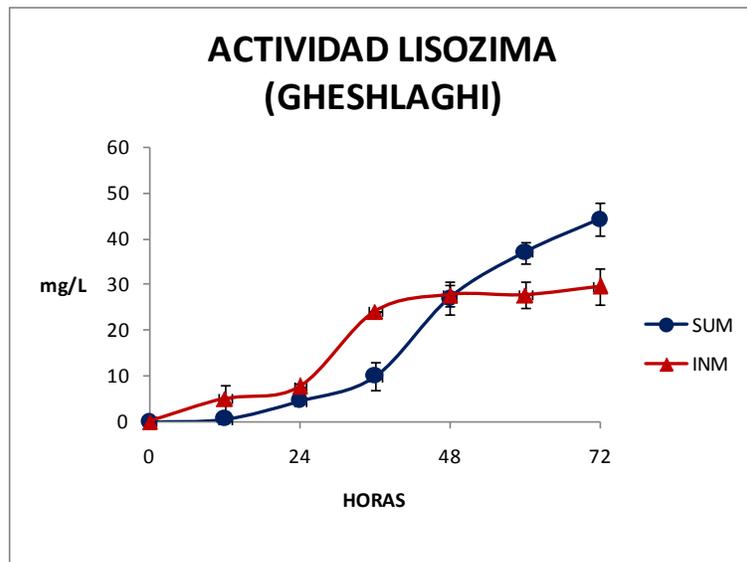


Figura 7. Producción de lisozima por *A. niger* B1 en el medio de Gheshlaghi. Desviación estándar mostrada en barras de error.

La producción de lisozima en el cultivo INM se llevó a cabo de manera lenta en las primeras 24 horas del cultivo, luego se elevó significativamente a las 36 horas a 24 mg/mL y durante las siguientes 36 horas se mantuvo en un incremento muy bajo y continuo. El cultivo SUM mostró una producción de lisozima baja durante 36 horas del cultivo, luego a las 48 horas se elevó la actividad enzimática de forma significativa a 27 mg/L y siguió aumentando hasta llegar a un máximo de 44 mg/L a las 72 horas. Al final de la fermentación el cultivo SUM (44 mg/L) mostró una producción de lisozima mayor con respecto al INM (30 mg/L), sin embargo a las 36 horas la producción en cultivo SUM fue de 10 mg/L mientras que en cultivo INM fue de 24 mg/L.

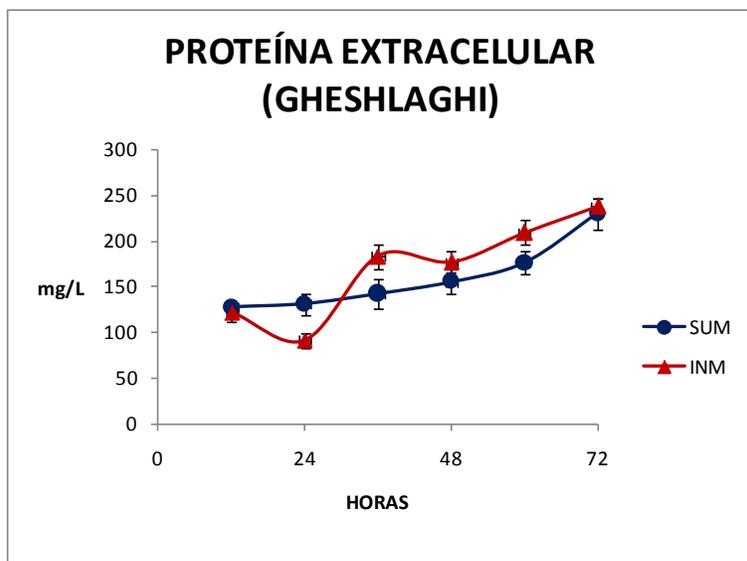


Figura 8. Concentración de proteínas liberadas por *A. niger* B1 en el medio de Gheshlaghi. Desviación estándar mostrada en barras de error.

En la figura 8 se muestra la producción de proteínas secretadas por *A. niger* B1 al medio de Gheshlaghi en cultivo SUM e INM. A partir del valor alto de proteínas detectadas debido a la presencia de 34 g/l de peptona, el cultivo INM mostró una conducta irregular con aumentos y caídas en los valores de proteínas extracelulares obtenidas, a las 24 horas se observó una disminución del 40% con respecto al valor de 12 horas y un aumento a 183.8 g/L a las 36 horas con una disminución a 177.2 mg/L a las 48 horas, este valor volvió a elevarse durante las últimas 24 horas de cultivo hasta llegar a un máximo de 238.1 mg/L de proteínas secretadas a las 72 hrs. En el cultivo SUM la liberación de proteínas se incrementó de forma continua hasta las 60 horas de cultivo teniendo una producción de 176.6 mg/L y luego aumentó de forma significativa a las 72 horas alcanzando su punto más alto 229.9 mg/L. Ambos cultivos coinciden en su punto máximo a las 72 y el valor obtenido fue prácticamente el mismo.

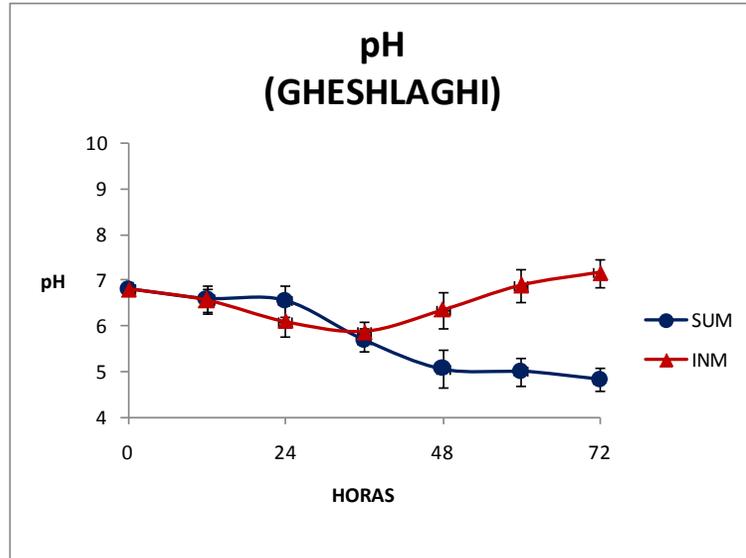


Figura 9. Variación del pH producido por *A. niger* B1 en el medio de Gheshlaghi. Desviación estándar mostrada en barras de error.

La figura 9 muestra la modificación del pH por el crecimiento de *A. niger* B1 en el medio de Gheshlaghi en cultivo SUM e INM. El cultivo INM mostró una disminución continua del pH durante las primeras 36 horas del cultivo llegando a 5.9, luego a partir de las 48 horas aumentó constantemente hasta alcanzar un pH máximo de 7.2 a las 72 horas. El cultivo SUM mostró una disminución continua del pH durante toda la fermentación hasta llegar a un pH mínimo de 4.8 a las 72 horas del cultivo. Ambos sistemas mantuvieron un comportamiento similar durante las primeras 36 horas del cultivo en las siguientes 36 fue totalmente contrario.

Al analizar las graficas del este experimento en conjunto, se observa que la alcalinidad del medio (Figura 9) junto con el incremento de las proteínas extracelulares en tiempos posteriores a las 48 horas, indican la posibilidad de un cambio importante en el metabolismo del hongo hacia metabolismo secundario, lo que explicaría la producción prácticamente nula de lisozima a pesar del incremento significativo en la biomasa acumulada después de las 48 horas de cultivo.

La curva de producción de proteínas extracelulares obtenida para *A. niger* B1 en cultivo INM es muy irregular y esto puede atribuirse a que en este medio no fue

posible determinar las cantidades de proteínas secretadas de manera inequívoca debido a la gran cantidad de peptona presente en el medio en los primeros momentos de la fermentación, lo que produjo valores que salen del comportamiento normal en un fermentación fúngica.

### **VI.3 Producción de lisozima recombinante en medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.**

Los valores obtenidos en la producción de lisozima en fermentación inmovilizada y la dificultad para analizar la producción que se deriva del uso de medios de cultivo complejos llevo a la formulación de medios mínimos de producción basados en los medios de cultivo de fermentación sólida (SSF) publicados en varias fuentes. El factor mas importante que se tomó en cuenta para formulación del medio de cultivo fue la relación existente entre la concentración de fuente de carbono y nitrógeno (C:N) disponibles para el desarrollo del hongo, ya que se ha reportado que esta relación tiene un efecto directo sobre el crecimiento y la producción de proteínas por los microorganismos, la relación C:N de los medio formulados para SSF son normalmente mas altas debido a la presencia de los soportes sólidos formados por carbohidratos.

El medio complejo desarrollado por Archer presenta una C:N de 3 mientras que en el medio complejo desarrollado por Gheshlaghi la C:N es de 3.6, en este trabajo se diseñó un medio de cultivo mínimo con una relación C:N de 5 que es el valor mas común para SSF. También se modificó la fuente de nitrógeno para evitar el uso de peptonas que dificultan el análisis de los resultados y exploramos el efecto del uso de sulfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) y nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) como fuente de nitrógeno.

En la figura 10 se muestra la producción de biomasa por la cepa B1 de *A. niger* cultivada en el medio desarrollado en esta tesis en los sistemas SUM e INM con la espuma de poliuretano usando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

En el cultivo INM la producción de biomasa se incrementó a las 24 y 48 horas estabilizándose a las 72 horas mostrando a esta hora la producción máxima de 11.32 g/L. El cultivo SUM mostró un incremento considerable a las 48 horas y se estabilizó a las 72 horas con una producción máxima de 12.99 g/L.

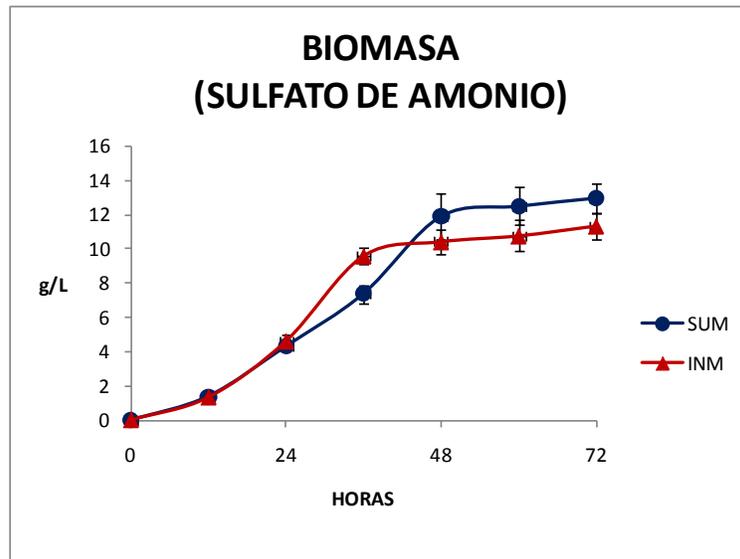


Figura 10. Producción de biomasa por *A. niger* B1 en medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Desviación estándar mostrada en barras de error.

En la figura 11 se muestra la producción de lisozima recombinante por la cepa B1 de *A. niger* cultivada en el medio desarrollado por Romero y colaboradores en los sistemas SUM e INM con la espuma de poliuretano.

El sistema INM mostró una producción continua hasta a las 48 hrs y se estabilizó para las 72 hrs; el punto máximo de producción a las 72 horas fue de 35 mg/L. El cultivo SUM mostró una producción baja durante las primeras 48 horas que se incrementó hasta las 72 horas el punto máximo de producción 22 mg/L. La producción de lisozima fue más rápida en cultivo INM ya que a las 48 horas se obtuvo el 90% de la producción máxima y esta fue 4 veces mayor a la de fermentación sumergida.

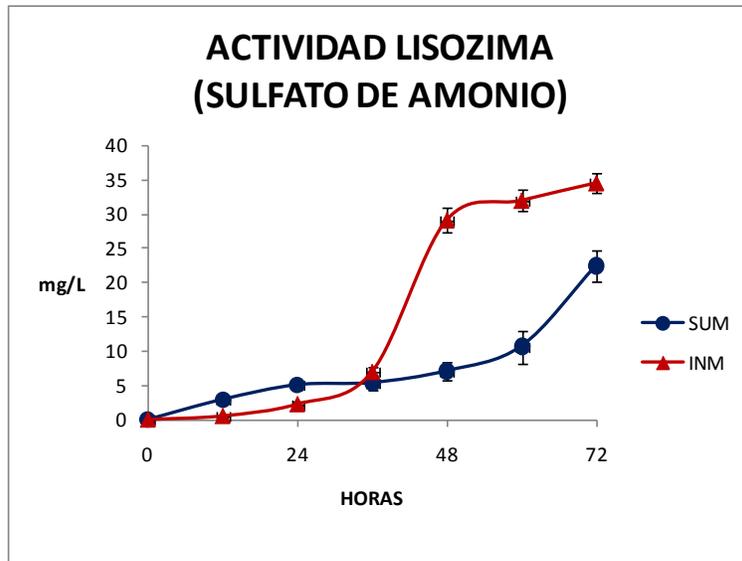


Figura 11. Producción de lisozima por *A. niger* B1 en el medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

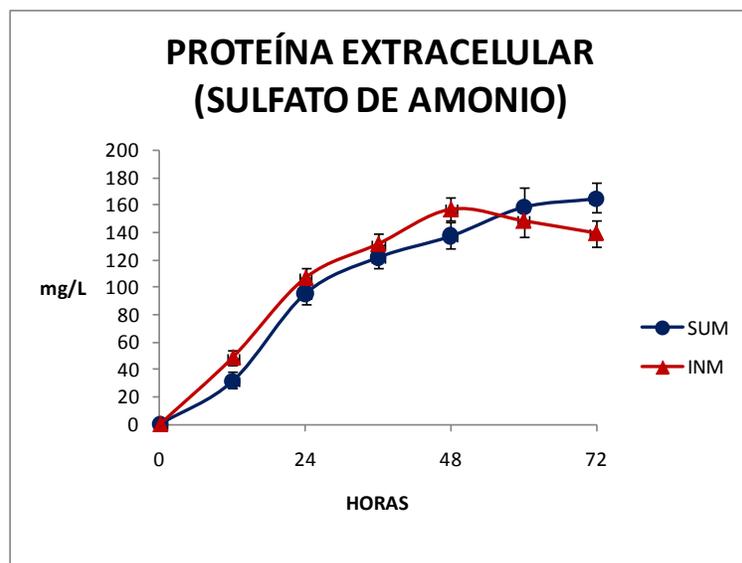


Figura 12.- Concentración de proteínas liberadas por *A. niger* B1 en el medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Desviación estándar mostrada en barras de error.

En la figura 12 se muestra la concentración de proteínas secretadas por la cepa B1 de *A. niger* cultivada en el medio desarrollado por Romero y colaboradores en los sistemas SUM e INM con la espuma de poliuretano. El

cultivo INM alcanzó el punto de máxima producción a las 48 horas con 156.89 mg/mL y un decremento a las 72 horas a 139.56 mg/mL. El cultivo SUM mostró un incremento constante a lo largo de la fermentación y alcanzó el punto máximo de producción a las 72 horas (164.78 mg/mL).

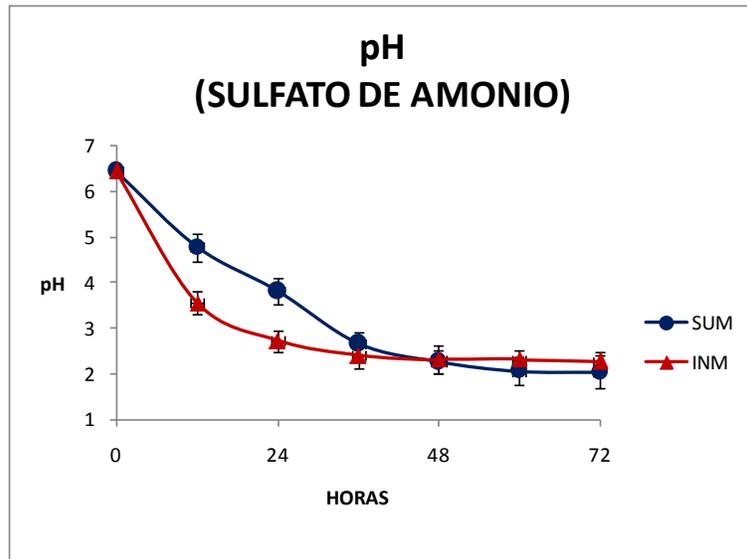


Figura 13.- Variación del pH producido por *A. niger* B1 en el medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Desviación estándar mostrada en barras de error.

En la figura 13 se muestra la modificación del pH por la cepa *A. niger* B1 cultivada en el medio desarrollado por Romero y colaboradores en los sistemas SUM e INM con la espuma de poliuretano. El cultivo INM mostró una caída considerable a las 48 horas a un pH de 2.8 y se mantuvo constante a un pH de 2.3 durante las 48 y 72 horas. El cultivo SUM mostró un valor de pH 3.8 a las 24 horas, que bajó hasta de  $2.1 \pm 0.1$  y se mantuvo constante entre las 48 y 72 horas siguientes. Ambos perfiles tienen el mismo comportamiento en ambos sistemas, lo que nos indica que se acumularon ácidos orgánicos en un comportamiento típico de una fermentación.

Al analizar todas las gráficas de esta sección puede observarse que la fermentación INM se termina prácticamente a las 48 horas donde coinciden la caída de la producción de biomasa, lisozima, la secreción de proteínas y la caída

de los valores de pH, mientras que la fermentación SUM no alcanzó a terminar en la 72 horas del análisis.

#### VI.4 Producción de lisozima recombinante en medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

Se ensayó un segundo medio de cultivo mínimo a una relación C:N de 5 con una concentración de fuente de carbono de 50 g/L conteniendo nitrato de sodio como fuente de carbono.

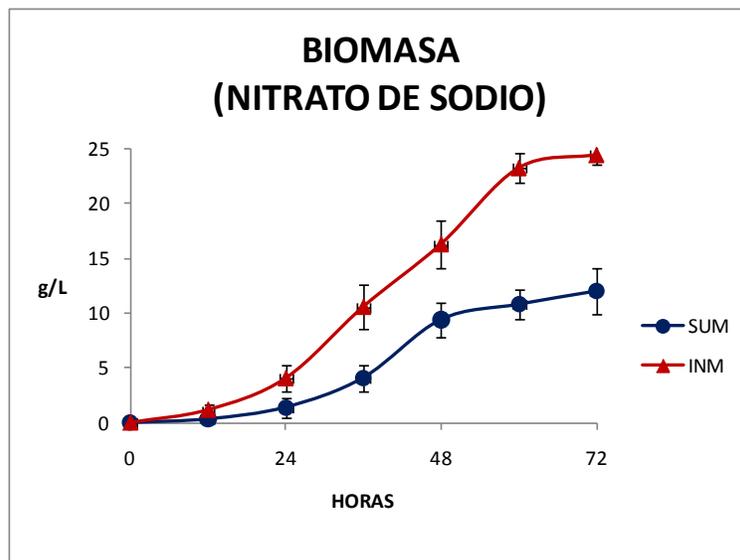


Figura 14.- Producción de biomasa por *A. niger* B1 en el medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de carbono. Desviación estándar mostrada en barras de error.

En la figura 14 se muestra la producción de biomasa por la cepa B1 de *A. niger* cultivada en el medio mínimo con  $\text{NaNO}_3$  como fuente nitrógeno en los sistemas SUM e INM con la espuma de poliuretano. El cultivo INM mostró una producción baja de biomasa a las 24 horas, con un aumentó considerablemente a las 36 horas, horas alcanzando su máxima producción de biomasa a las 72 horas. El cultivo SUM mostró poca producción de biomasa a las 24 horas, con un

incrementó a las 48 horas y a las 72 horas alcanzó la máxima producción. El sistema INM mostró una producción de biomasa de mas del doble que la de SUM a partir de las 36 horas con respecto al sistema SUM, lo que nos indica que este medio es muy favorable para la fermentación INM.

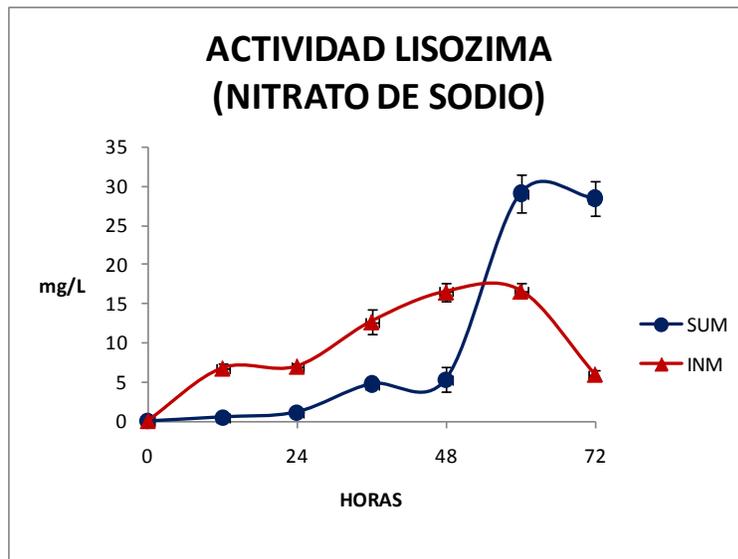


Figura 15.- Producción de lisozima por *A. niger* B1 en el medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de carbono. Desviación estándar mostrada en barras de error.

En la figura 15 se muestra la producción de lisozima recombinante por la cepa B1 de *A. niger* cultivada en SUM e INM con la espuma de poliuretano usando nitrato de sodio como fuente de carbono. El cultivo INM mostró una producción continua durante las primeras 60 horas de cultivo y una caída drástica a las 72 horas. El cultivo SUM mostró una producción baja hasta las 48 horas, y a las 60 horas aumentó significativamente para mantenerse a las 72 horas. Durante las primeras 48 horas la producción de lisozima en INM fue mucho mejor, pero mientras que a las 60 y 72 horas el cultivo SUM presentó una producción mucho mayor.

En la figura 16 se muestra la producción de proteínas por la cepa B1 de *A. niger* cultivada en medio mínimo en los sistemas SUM e INM con la espuma de poliuretano, usando nitrato de amonio como fuente de carbono.

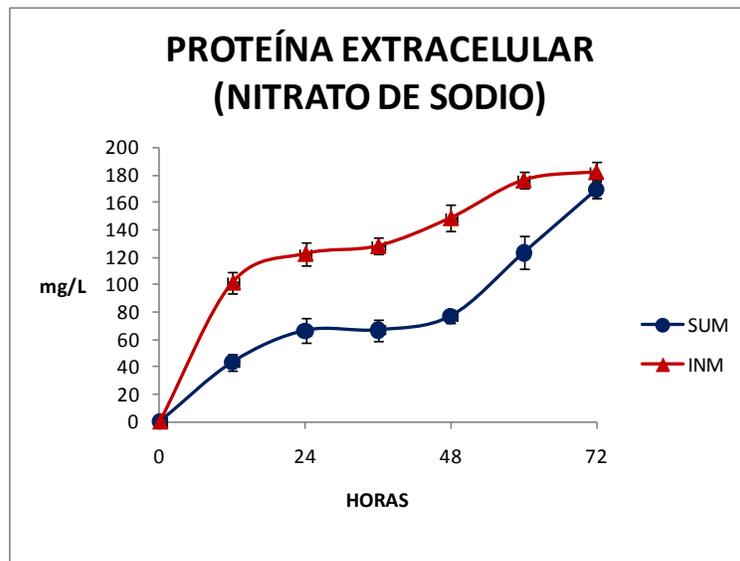


Figura 16.- Concentración de proteínas liberadas por *A. niger* B1 en el medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Desviación estándar mostrada en barras de error.

El cultivo INM mostró el inicio de la producción de proteínas liberadas a las 24 horas incrementándose esta durante toda la fermentación alcanzando su punto máximo de producción a las 72 horas de 182.5 mg/L. El cultivo SUM mostró un comportamiento de disminución hasta las 48 horas y a las 60 y 72 se incrementó de forma considerable en ambos tiempos. En comparación la concentración de proteínas liberadas por el sistema INM siempre fue mayor que en el sistema SUMM, sin embargo a las 72 horas ambos mostraron una producción de proteínas prácticamente iguales.

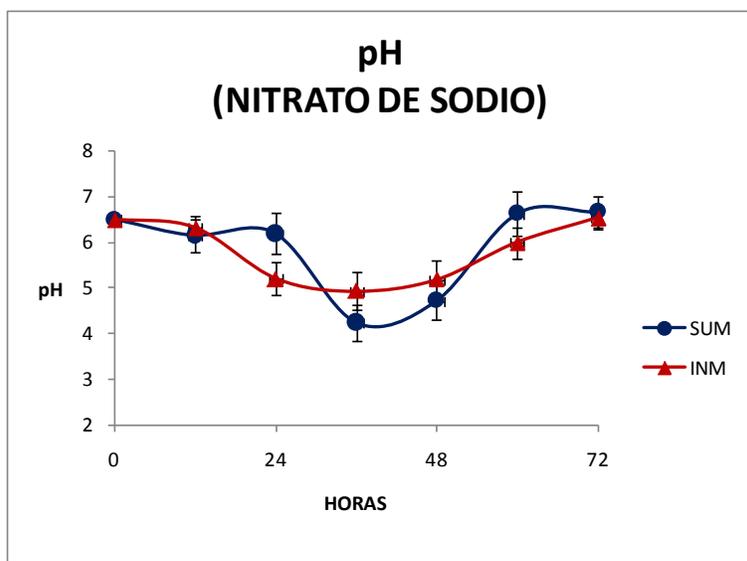


Figura 17.- Variación del pH producido por *A. niger* B1 en el medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

En esta figura se muestra la modificación del pH por la cepa *A. niger* B1 cultivada en el medio desarrollado por Romero y colaboradores en los sistemas SUM e INM con la espuma de poliuretano. El cultivo INM mostró una disminución hasta las 36 horas con pH de 4.94 y aumentó hasta las 72 horas alcanzando un pH al final de 6.54. El cultivo SUM se mostró prácticamente igual hasta las 24 horas, a las 36 horas cayó drásticamente a un pH de 4.25 y luego aumentó considerablemente durante las 48 y 60 horas a un pH de 6.63 y a las 72 horas se estabilizó mostrando un pH final de 6.67. En comparación ambos sistemas disminuyeron hasta las 36 horas y a partir de las 48 horas se incrementó el pH en ambos sistemas y mostraron un pH final muy similar.

El sistema SUM con fuente de nitrógeno de nitrato de sodio necesita un pH ácido muy débil (alrededor de 5.5 a 6.5) para producir mayor lisozima, mientras que al cultivo INM no le beneficia este pH porque aumenta la producción de biomasa y disminuye la producción de lisozima.

## VII. DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos en este trabajo se observa que en general el cultivo INM presentó una velocidad de crecimiento más rápida que la fermentación SUM, esto puede deberse a que simula el crecimiento natural de los hongos donde estos se desarrollan sobre una superficie, la cual les permite tener una mayor disposición de oxígeno, sin embargo los resultados obtenidos distan mucho de los reportados por otros investigadores para el cultivo inmovilizado Romero y col, 2000, reporta una velocidad de crecimiento del doble a la obtenida en fermentación SUM con una producción de biomasa 4 veces más alta, este es el único trabajo de los revisados que contiene el dato de producción de biomasa, la diferencia puede explicarse por que en el trabajo de Romero se utilizaron 3 cepas silvestres, mientras que en este trabajo se usó una cepa modificada genéticamente.

El comportamiento del cultivo INM en el sistema desarrollado por Archer y col. fue prácticamente igual al reportado por Archer y col 1990; como se esperaba ya que presentó una producción máxima de lisozima de 10.76 mg/L mientras que lo reportado por Archer fue de 12.00 mg/L utilizando la misma cepa *Aspergillus niger B1*. En este medio el sistema SUM mostró un comportamiento similar que el cultivo INM donde la fuente de carbono influyó en ambos sistemas ya que al terminarse esta fuente el hongo dejó de crecer, luego el pH del medio comenzó a modificarse alcalinamente en el cultivo INM y ácido en el cultivo SUM provocando una liberación de proteasas en ambos casos causando la degradación de la lisozima recombinante por lo que la HEWL no es estable ante la presencia de proteasas ácidas y básicas, este tipo de comportamiento ya ha sido reportado por Talabardón y Yang (2005) quienes reportan que al final de la fermentación podría darse el fenómeno de autólisis donde se liberan proteínas intracelulares y se da la liberación del citoplasma lo que cambiaría de manera importante y sobre todo rápida los valores de proteínas secretadas y el pH del medio; además un cambio importante en el valor de pH podría inducir la producción de proteasas

intracelulares lo que explicaría la caída en la actividad de lisozima (Ward y col, 2005).

Al realizar las pruebas en un medio con una concentración de fuente de carbono más alta y diseñado específicamente para un cultivo SUM, rediseñado por Gheshlaghi y col (2005), se presentó un incremento considerable en la producción de lisozima ya que en el cultivo SUM se produjeron 48.93 mg/L de lisozima y en el cultivo INM 32.78 mg/L de la misma. Sin embargo no se logró alcanzar lo reportado por Gheshlaghi y col. (2005) la cual fue de 209 mg/L. Una diferencia tan grande en los resultados obtenidos no tiene una explicación sencilla, pero podría deberse a los cambios introducidos en las condiciones de cultivo que pasaron de 25 a 30° C más fácil de mantener en un país de temperatura más alta como México y un manejo diferente de las esporas usadas, aunque es imposible llevar a cabo un análisis más a fondo, debido a la falta de datos en el trabajo de Gheshlaghi como los tiempos de producción y la curvas de crecimiento o producción de biomasa.

En este medio el crecimiento del hongo comenzó a ceder a las 60 horas y no a las 36 horas como en el sistema de Archer, esto debido a la mayor concentración de carbono que lo componen. Sin embargo la producción de lisozima no disminuyó drásticamente como en el sistema de Archer probablemente porque el hongo no comienza a degradarse y liberar proteasas aún cuando en el sistema INM el pH del medio se incrementó de forma considerable igual que en el caso del medio de Archer.

Al analizar la relación que existe entre la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno entre los dos sistemas utilizados se llegó a la conclusión que al haber una relación mayor de C:N se presenta una mayor producción de lisozima por lo que se desarrollaron dos medios mínimos con una relación de C:N de 5.0 ya que la relación del sistema de Gheshlaghi es de 3.6 y del sistema de Archer es 3.0. Adicional a la relación de C:N se tomó en cuenta que en los experimentos anteriores una mayor concentración de fuente de carbono el hongo produjo una mayor producción de lisozima y alargó el tiempo de producción por lo que se incrementó una concentración de fuente de carbono de 50 g/L.

El primer medio desarrollado tuvo como fuente de carbono el almidón y como fuente de nitrógeno el sulfato de amonio. En este medio la producción de la lisozima fue la más alta en comparación con cualquier otro medio (34.42 mg/L) con la característica de que el pH del medio disminuyó de forma considerable a las 24 horas y se mantuvo de forma ácida durante el resto de la fermentación sin afectar el desarrollo del hongo, aunque a las 72 horas el cultivo dejó de crecer probablemente debido a que se agotó la fuente de carbono; la actividad de lisozima se mantuvo y no se degradó a pesar de que el pH disminuyó de manera muy importante (pH 2.1).

El segundo medio desarrollado tuvo como fuente de carbono el almidón y como fuente de nitrógeno el nitrato de sodio. En este medio la producción de lisozima fue de forma desordenada al igual que en sistema SUM; en este último la producción fue significativamente mayor que en INM. A las 72 horas de cultivo en INM la producción de lisozima cayó drásticamente cuando la producción de biomasa se incrementó considerablemente y el pH del medio se incrementó igualmente esto sugiere que el hongo utilizó su energía para seguir desarrollándose y no para producir la proteína recombinante. Mientras que en el cultivo SUM la producción de la lisozima se incrementó a las mismas 72 horas y la producción de biomasa se estabilizó, sugiriendo lo contrario que en el sistema INM.

En el medio con sulfato de amonio como fuente de carbono tuvo una mayor producción de lisozima con respecto al medio con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno debido a la disponibilidad del nitrógeno en forma de amonio, ya que el hongo requiere menos energía que con el nitrógeno en forma de nitrato el cual requiere una mayor cantidad de energía para ser transformado y disponible para el desarrollo del hongo.

El análisis de los resultados obtenidos por cultivo sumergido en comparación con otros sistemas inmovilizados es compleja debido a que los demás sistemas desarrollados como el de Tabardón y Yang (2005) consiste en una membrana de algodón sumergida en el medio de cultivo, el de Parra y col., 2004. Está basado en el uso de pectato de calcio que modifica el valor de la actividad de agua e

introduce al pectato como substrato alimenticio, el único sistema que podría ser usado para comparar de una manera adecuada es el desarrollado por Gyamerah y col, 2002; quienes usaron una resina inerte para la producción de lisozima, sus resultados no son muy halagadores ya que el uso de la resina disminuye la producción de la lisozima tal como sucede cuando usamos el medio de Gheshlaghi en este sistema.

El uso de amonio como fuente de nitrógeno para la producción de proteínas ha sido ampliamente reportado por diversos investigadores, pero es el mismo Archer quien cita al amonio como la fuente de nitrógeno más adecuada para la formación de proteínas recombinantes ya que se ha reportado que el uso de amonio inhibe la formación de proteasas (Archer y col., 1990; Archer y Peberdy, 1997).

En el caso del uso de nitrato de sodio los resultados no se parecen nada que hayamos encontrado en la literatura, pero podemos suponer que la dificultad de incorporar el nitrato resulta en una mayor depresión de la producción de lisozima en el sistema de cultivo inmovilizado que en la fermentación sumergida, pero es interesante como punto de partida de una investigación posterior.

## VIII. CONCLUSIÓN

El sistema de fermentación inmovilizada usando espuma de poliuretano como soporte mostró que al simular el desarrollo natural del hongo *Aspergillus niger* al producir la proteína recombinante modelo como la lisozima (HEWL) en diferentes medios, es más efectiva y eficiente que en un sistema sumergido, que es el sistema de cultivo más usado para la producción de enzimas por hongos filamentosos. El uso de un medio complejo diseñado especialmente para fermentaciones sumergidas obtuvo una producción de lisozima menor en el sistema inmovilizado. Sin embargo, al diseñar un medio mínimo con las características reportadas para fermentación sólida, que son una relación de Carbono:Nitrógeno de 5, una cantidad alta de fuente de carbono y una fuente de nitrógeno simple, la producción de lisozima fue equivalente a los mejores resultados obtenidos en fermentación sumergida.

La fuente de nitrógeno tuvo un efecto muy importante sobre la producción de lisozima en cultivo inmovilizado, mientras que nitrato de sodio indujo una producción mayor de lisozima en fermentación sumergida, el sulfato de amonio permitió una mayor producción en cultivo inmovilizado.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adrio**, J. L., Demain, A. L. **2003**. Fungibiotechnology. International Microbiology Vol. 6: 191-199.
- Aranda**, C., Robledo, A., Loera, O., Contreras, J. C., Rodríguez, R., Aguilar, C. N. **2006**. Fungal invertase expression in solid-state fermentation. Food Technology and Biotechnology. Vol. 44: 229-233.
- Archer**, D. B., **Peberdy**, J. F. **1997**. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. Critical Reviews in Biotechnology. Vol. 17: 273-306.
- Arvas**, M., Pakula, T., Lanthaler, K., Saloheimo, M., Valkonen, M., Suortti, T., Robson, G., Penttila, M. **2006**. Common features and interesting differences in transcriptional responses to secretion stress in the fungi *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Genomics. Vol. 7: 32-49.
- Bigelis**, R., He, H., Yang, H. Y., Chang, L. P., Greenstein, M. **2006**. Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Vol. 33: 815-26.
- Bradford**, M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. Vol. 72: 248-254.
- Conesa**, A., Hondel, C. A., van Lujik, N. **2001**. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. Fungal Genetics and Biology. Vol. 33: 155-71.
- Finkelstein**, D. B., Rambosek, J., Crawford, M. S., Soliday, C. L., McAda, P. C., Leach, J. **1989**. Protein secretion in *Aspergillus niger*. Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. American Society for Microbiology: 295-300.
- Fujishima**, T., Uchida, K., Yoshino, H. **1972**. Enzyme production by molds in sponge culture. Journal of Fermentation Technology. Vol. 50: 724-730.
- Gyamera**, M., Merichetti, G., Adedayo, O., Sharer, J. M., Moo-Young, M. **2002**. Bioprocessing strategies for improving hen egg-white lysozyme (HEWL)

production by recombinant *Aspergillus niger* HEWL WT-13-16.  
Applied Microbiology Biotechnology. Vol. 60: 403-407.

**Gheshlaghi, R.,** Scharer, J. M., Moo-Young, M., Douglas, P. L. **2005.** Medium optimization for hen egg white lysozyme production by recombinant *Aspergillus niger* using statistical methods. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 90(6): 754-760.

**Hata, Y.,** Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., Imayasu, S. **1998.** Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Gene. Vol. 207: 127-134.

**Herrera, T., Ulloa, M. 1990.** El reino de los hongos: Micología básica aplicada. 1ª Ed., Fondo de Cultura Económica. México: 25-30.

**Ishida, H.,** Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y. **2006.** Improvement of the *glaB* promoter expressed in solid-state fermentation (SSF) of *Aspergillus oryzae*. Bioscience and Biotechnology and Biochemistry. Vol. 70(5): 1181-1188.

**Jeenes, D. J.,** Mackenzie, D. A., Archer, D. B. **1994.** Transcriptional and post-transcriptional events affect the production of secreted hen egg white lysozyme by *Aspergillus niger*. Transgenic Research. Vol. 3: 297-303.

**Jeenes, D. J.,** Marczinke, B., MacKenzie, D. A., Archer, D. B. **1993.** A truncated glucoamylase gene fusion for heterologous protein secretion from *Aspergillus niger*. Microbiology Letters. Vol. 107: 267-272.

**Kobayashi, A.,** Sano, M., Oda, K., Hisada, H., Hata, Y., Ohashi, S. **2007.** The glucoamylase encoding gene (*glaB*) is expressed in solid-state culture with low water content. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. Vol. 71(7): 1797-9.

**Koutinas, A. A.,** Wang, R., Webb, C. **2003.** Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. Biochemical Engineering Journal. Vol. 14: 93-100.

**Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Vol. 227(259): 680-5.

**Lekha, P. K., Lonsane, B. K. 1994.** Comparative titres, location and properties of tannin acylhydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state,

liquidsurface and submerged fermentations. *Process Biochemistry*. Vol. 29: 497-500.

**Maras, M., van Die, I., Contreras, R., van den Hondel, C. A. 1999.** Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconjugation Journal*. Vol. 16(2): 99-107.

**Meyer, V. 2008.** Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*. Vol. 26: 177-185.

**Miller, G. L. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31(3): 426-428.

**Mohapatra, P. K., Mondal, K. C., Pati, B. R. 2007.** Production of tannase by the immobilized cells of *Bacillus licheniformis* KBR6 in Ca-alginate beads. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 102(6): 1462-1467.

**Nevalainen, H., Te'ó, V., Bergquist, P. L. 2005.** Heterologous protein of the versatile cell factory. *Trends in Biotechnology*. Vol. 23: 468-474.

**Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Iwashita, K. 2006.** Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72(5): 3448-57.

**Pakula, T. M., Salonen, K., Uusitalo, J., Penttila, M. 2005.** The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology*. Vol. 151: 135-43.

**Pandey, A. 2003.** Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 13: 81-84.

**Pandey, A., Selvahumar, P., Soccol, C. R., Nigam, P. 1999.** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*. Vol. 77: 149-162.

**Papagianni, M., Joshi, N., Moo-Young M. 2002.** Comparative studies on extracellular protease secretion and glucoamylase production by free and immobilized *Aspergillus niger* cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol*. vol. 29 (5) pp. 259-63

**Papagianni, M. 2004.** Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*. Vol. 22: 189-259.

**Parra, R., Aldred, D., Magan, N. 2005.** A novel immobilized design for the production of the heterologous protein lysozyme by a genetically engineered *Aspergillus niger* strain. *Applied Microbiology and Biotechnological*. Vol. 67: 336-344.

**Parra, R., Aldred, D., Archer, D. B., Magan, N. 2004.** Water activity, solute and temperature modify growth and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strains. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 35: 232-237.

**Pel, J. H., de Winde, J. H., Archer D. B., Dyer P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., de Vries, R. P., ... , Stam, H. 2007.** Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*. Vol. 25: 221-231.

**Punt, P. J., Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnu, J., Hondel, C. 2002.** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*. Vol. 20: 200-206.

**Rahardjo, Y. S., Korona, D., Haemers, S., Weber, F. J., Tramper, J., Rinzema, A. 2004.** Limitations of membrane cultures as a model solid-state fermentation system. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 39(6): 504-508.

**Raimbault, M. 1998.** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.1: 3.

**Romero, S. J. 2001.** Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación líquida y fermentación sólida. México. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. 1-24.

**Romero, S. J., Augur, C., Viniegra, G. 2000.** Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. Vol. 22: 1255-1258.

**Sims, A. H., Gent, M. E., Dunn, N. S., Robson, G. D. 2005.** Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by *Aspergillus nidulans* and the unfolded-protein response *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71: 2737- 2747.

**Talabardon, M., Yang, S. T. 2005.** Production of GFP and glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger*: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. *Biotechnology Progress*. Vol. 21: 1389-400.

**Te Biesebeke, R., Boussier, A., van Biezen, N., van den Hondel, C. A., Punt, P. J. 2006.** Identification of secreted proteins of *Aspergillus oryzae* associated with growth on solid cereal substrates. *Journal of Biotechnology*. Vol. 121: 482-5.

**Te Biesebeke, R., van Biezen, N., de Vos, W. M., van den Hondel, C. A., Punt, P. J. 2005.** Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 67(1): 75-82.

**Télez, A., Arana, A., Gonzalez, A. E., Viniegra, G., Loera, O. 2006.** Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 38: 665-669.

**Van de Ven, W.J., roebroek, A. J. van Duijnhoven, H. J. 1993.** Structure and function of eukaryotic pro-protein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases. *Critical Review in Oncogenesis*. Vol. 4: 115–136.

**Viniegra, G., Favela, E. 2006.** Why solid-state fermentation seem to be resistant to catabolite repression. *Food Technology Biotechnological*. Vol. 44: 397-406.

**Viniegra, G., Favela, E., Romero, S., Diaz, G., Augur, C. 2003.** Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 13: 157-167.

**Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J., Singh, A. 2005.** Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 58: 1-75.

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