

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

CBS

**Inducción y Represión de la Síntesis de la
Tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20 en Cultivo en
Medios Líquido y Sólido**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A

Cristóbal Noé AGUILAR GONZALEZ

Septiembre/2000



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93



El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

Cristóbal Noé Aguilar González

El día 8 de Septiembre del año 2000

Comité tutorial:

Director: **Dr. Gustavo Viniegra González**
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: **Dr. Christopher Augur**
Institut de Recherche pour le Developpement- Francia

Asesor: **Dr. Ernesto Favela Torres**
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Comité de evaluación:

Presidente: **Dra. Mayra de la Torre**
CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional

Secretario: **Dr. Mariano Gutiérrez-Rojas**
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: **Dra. Amelia Farres González**
Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal: **Dr. Cutberto J. Galíndez**
ENCB-instituto Politécnico Nacional

Vocal: **Dr. Christopher Augur**
Institut de Recherche pour le Developpement- Francia

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se desarrollo gracias al apoyo (económico y/o técnico) de las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología	(CONACYT)
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa	(UAMI)
Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo	(UAdeC)
Institut de Recherche pour le Developpement.	(IRD-México)
Centro de Investigación en Química Aplicada	(CIQA)
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados	(CINVESTAV-IPN)

Un muy especial agradecimiento a las siguientes personas:

Dr. Gustavo Viniegra González	UAMI
Dr. Ernesto Favela Torres	UAMI
Dr. Christopher Augur	IRD
Dr. Antonio Anzaldúa Morales (+)	UACH
Dra. María de la Luz Reyes Vega	UAdeC
Dr. Jesús Rodríguez Martínez	UAdeC
Dra. Yolanda Garza García	UAdeC
M.C. Heliodoro de la Garza	UAdeC
Dr. Eduardo de los Santos	CIQA
Dr. Jaime Vernón Carter	UAMI
Dr. Arnulfo Albóres	CINVESTAV
Dra. Teresa Rodríguez	UNAN
Dr. Felipe López Isunza	UAMI
Dr. Rafael Chávez	UAMI

Mi más profunda gratitud al apoyo recibido de:

Dra. Arely Prado Barragán
Dra. Isabelle Gaime Perraud
Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Dr. Sergio Huerta Ochoa
Dr. Octavio Loera Corral
Dra. Tania Volke Sepúlveda
Dra. Virginia Nevárez Moorillón
Dr. Medhí Hakil

Gracias a Luciano, Araceli, Marcos, los Alex, Oscar, Romano, Inés, Estéban, Yuri, Rosario, Fátima, Nacho, Juan Pablo, Susana, Maria Elena, Los fitasos, Poncho, Erika, Lupita, Arturin, Gloria y Pato, a mis estudiantes de la UAdeC y a todos los compañeros de la PP4 y del W.

DEDICATORIA

A Dios.

*A mi madre, por el apoyo, cariño, y todos los momentos que hemos compartido. Nunca
terminaré de agradecer la fortaleza y bondad que has depositado en mi.*

*A mis hermanos, Minerva, Norma, Marisela, Carlos, Miguel y Ramón. A todos mis sobrinos.
Toda mi vida es para ustedes.*

*A mis maestros, Gustavo, Ernesto y Christopher.
Estoy orgulloso de haber trabajado con ustedes.*

*A mis amigos: Tony, Nacho, Gus, Juan Carlos, Julio, Ara, Gerardito, Arepra, Neto, Tania,
Tavo, Félix, y Jean Philippe. Han llenado mi corazón de alegrías. Siempre estarán en mi.*

A Bb-Pato-Lin . Por entregarme todo su amor.

CONTENIDO

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
1. ABSTRACT.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. ANTECEDENTES.....	9
3.1 Aspectos generales.....	9
3.2 Represión catabólica.....	13
3.3 Inducción enzimática y represión catabólica en CML y CMS.....	17
3.4 Aspectos cinéticos del crecimiento celular y la formación de productos microbianos.....	21
3.5 Tanin acil hidrolasa.....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	38
5. HIPÓTESIS.....	41
6. OBJETIVOS.....	42
6.1 Objetivo general.....	42
6.2 Objetivos particulares.....	42
7. MATERIALES Y METODOS.....	43
7.1 Microorganismo utilizado.....	43
7.1.1 Conservación del microorganismo.....	43
7.2 Selección y caracterización del soporte.....	44
7.3 Medios de cultivo.....	45
7.4 Preparación del inóculo.....	45
7.5 Cultivo en medio líquido (CML).....	46
7.6 Cultivo en medio sólido (CMS).....	47
7.7 Métodos analíticos.....	47
7.7.1 Contenido de ácido tánico.....	47
7.7.2 Contenido de glucosa.....	47
7.7.3 Contenido de ácido gálico.....	48
7.7.4 Ensayo de la actividad tanasa.....	48
7.7.5 Ensayo de la actividad proteasa.....	49
7.7.6 Estimación de la biomasa fúngica.....	49
7.7.7 pH.....	50
7.7.8 Actividad de agua (Aw).....	50
7.7.9 Contenido de humedad.....	50
7.7.10 Análisis estadístico.....	50
7.8 Relación de inducción y represión (R_{IR}).....	50
7.9 Coeficientes cinéticos.....	51
7.9.1 Parámetros cinéticos de crecimiento.....	51
7.9.2 Parámetros cinéticos de producción de tanasa.....	52

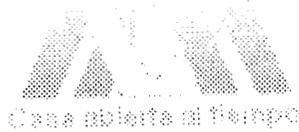
7.10 Presencia de actividades proteolíticas.....	53
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	55
8.1 Perfiles de crecimiento y de producción de tanasa en CML y CMS.....	55
8.1.1 Efecto de la concentración del ácido tánico.....	55
8.1.2 Efecto de la concentración de glucosa.....	66
8.2 Patrones de producción de la tanasa en CML y CMS.....	77
8.3 Influencia del tipo de cultivo sobre la producción de la actividad proteolítica.....	84
8.4 Discusión general.....	91
9. CONCLUSIONES.....	94
10. RECOMENDACIONES.....	96
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
APÉNDICES	
I. Trabajos publicados y presentados en reuniones científicas	
II. Resultados de la selección del soporte	

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
TABLAS	
1. Resumen de los hallazgos históricos relacionados con la tanasa.....	31
2. Patentes sobre la producción y algunas aplicaciones de la tanasa.....	33
3. Composición del medio de cultivo para la producción de la tanasa.....	45
4. Valores de biomasa máxima y de la tasa específica de crecimiento en el cultivo de <i>A. niger</i> Aa-20 usando diferentes concentraciones de ácido tánico en CML y CMS.....	57
5. Valores de productividad de tanasa máxima observados y calculados a diferentes concentraciones iniciales de ácido tánico.....	64
6. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos como valores máximos del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CML y CMS con ácido tánico como única fuente de carbono.....	65
7. Valores de biomasa máxima y de la tasa específica de crecimiento en el cultivo de <i>A. niger</i> Aa-20 usando diferentes concentraciones de glucosa en presencia de ácido tánico en CML y CMS.....	68
8. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos como los valores máximos del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CML y CMS con glucosa en presencia de ácido tánico.....	74
9. Resultados de la actividad proteasa y tanasa producidas por <i>Aspergillus niger</i> en CMS a diferentes relaciones C/N.....	87
FIGURAS	
1. Reacción de hidrólisis enzimática del ácido tánico y del éster metílico del ácido gálico.....	29
2. Cinética de crecimiento de <i>A. niger</i> Aa-20 en CML y CMS con ácido tánico a diferentes concentraciones iniciales.....	56
3. Producción de la tanasa extra e intracelular producidas por <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CML con ácido tánico a diferentes concentraciones.....	58
4. Producción de la tanasa extra e intracelular producidas por <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CMS con ácido tánico a diferentes concentraciones.....	60
5. Valores de la constante K de la tanasa extracelular e intracelular producida por <i>A. niger</i> Aa-20 en CML y CMS a diferentes concentraciones de ácido tánico.....	63
6. Cinética de crecimiento de <i>A. niger</i> Aa-20 en CML y CMS con glucosa diferentes concentraciones iniciales en presencia de ácido tánico.....	67
7. Producción de tanasa extra e intracelular producidas por <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CML con ácido tánico y diferentes concentraciones de glucosa.....	70
8. Producción de tanasa extra e intracelular producidas por <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CMS con ácido tánico y diferentes concentraciones de glucosa.....	72
9. Patrones de inducción de la tanasa en CML y CMS.....	78
10. Efecto de la concentración de glucosa sobre la $R_{1/R}$ de la tanasa en CML y CMS.....	79
11. Relación entre biomasa y actividad tanasa para calcular los coeficientes de rendimiento Y_{EX} en CML y CMS usando ácido tánico y glucosa como fuentes de carbono.....	81
12. Efecto de la fuente de carbono en la producción de tanasa de <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CML.....	83
13. Producción de proteasa de <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CML y CMS a diferentes concentraciones de ácido tánico.....	85
14. Efecto de la adición de un inhibidor de proteasas sobre la actividad tanasa y proteasa de <i>Aspergillus niger</i> Aa-20.....	88
15. Efecto de la adición de un inhibidor de proteasas sobre la producción de biomasa de <i>Aspergillus niger</i> Aa-20 en CML.....	89

ABREVIACIONES Y SIMBOLOS

AMPc	Monofostato de adenosina cíclico
A.T.	Actividad tanasa
A.T.B.	Actividad tanasa basal
CID1	Proteína con actividad bioquímica desconocida
CLS	Cultivo líquido superficial
CML	Cultivo en medio líquido
CMS	Cultivo en medio sólido
C/N	Relación carbono/nitrógeno
CREA	Proteína codificada por el gene regulador de la represión catabólica en <i>Aspergillus</i>
CYC8	Proteína asociada al complejo
E	Actividad enzimática producida (UL^{-1})
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
GRR1	Proteína con actividad bioquímica desconocida
HXK2	Hexocinasa II
k	Coficiente secundario de la producción o destrucción de la tanasa ($Uh^{-1}g^{-1}$)
MIG1	Proteína represora del complejo
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
P_{max}	Productividad máxima de tanasa ($UL^{-1}h^{-1}$)
P_R	Productividad de tanasa ($q_p Y_{E/X}$; $UL^{-1}h^{-1}$)
PUF	Espuma de poliuretano
q_p	velocidad específica de formación de producto ($\mu Y_{E/X}$; $UgX^{-1}h^{-1}$)
q_s	Velocidad específica de consumo de sustrato ($\mu Y_{S/S}$; $gSgX^{-1}h^{-1}$)
REG1	Proteína con actividad bioquímica desconocida
$R_{I/R}$	Relación de inducción-represión
RTA	Reactor de tanque agitado
SNF1	Proteíncinasa
SNF4	Proteíncinasa
SUC2	Enzima invertasa
t	Tiempo de cultivo (h)
TUP1	Proteína asociada al complejo
A	Area de la hifa (cm^2)
G_0	Concentración de glucosa inicial (gL^{-1})
S_0	Concentración inicial de sustrato (gL^{-1})
TTA	Actividad tanasa total (UL^{-1})
X	Concentración de biomasa (gL^{-1})
X_{max}	Concentración máxima de biomasa (gL^{-1})
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa/sustrato ($gXgS^{-1}$)
$Y_{E/X}$	Rendimiento tanasa/biomasa (Ug^{-1})
μ	Tasa específica de crecimiento (h^{-1})



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *13 Tapachalapa*

Capítulo 1
Resumen/Abstract

1. RESUMEN

Este trabajo trata de aclarar en términos de la fisiología microbiana, cuáles son los factores dominantes que explican una mayor productividad de las enzimas excretadas por cultivos microbianos desarrollados en medio sólido comparados con los cultivos en medio líquido. Esto fue evidenciado desde 1991 para el caso de gluco-amilasa producida por *Bacillus licheniformis* M27 y ha sido corroborado por otros investigadores. Sin embargo, hasta muy recientemente no se había intentado explicar estas diferencias como asociadas a coeficientes cinéticos tales como, la tasa específica de crecimiento, μ , el factor de rendimiento de la enzima ($Y_{E/X}$), el nivel máximo de la biomasa (X_{max}) o la tasa específica de destrucción de la enzima en el medio (k). Para ese fin, se decidió estudiar la producción de la enzima tanasa (tanin acil, hidrolasa, EC 3.1.1.20) sobre la cual, Lehka y Lonsane (1994) reportaron que no era excretada al medio de cultivo por *Aspergillus niger* PKL104 cultivado en medio líquido, como lo era en el medio sólido, reportando que se trataba de un sistema enzimático con fisiología muy distinta en ambos tipos de medio de cultivo. Para responder estas cuestiones se decidió utilizar un soporte sólido modelo, la espuma de poliuretano, porque es un material poroso, inerte y con gran capacidad de absorber grandes cantidades de medio líquido y porque ha sido demostrado que funciona como un buen soporte para la producción de enzimas microbianas (Pandey y col., 1999). Entre las preguntas específicas que se desea contestar sobresalen: a) ¿El patrón fisiológico de producción de la tanasa en medio sólido y líquido es el mismo, con respecto a su asociación con el crecimiento y a la presencia o ausencia de un proceso destructivo en el medio?, b) ¿la productividad de la tanasa es mayor en medio sólido que en líquido, debido principalmente porque se produce más biomasa (coeficientes μ y X_{max}) o porque la biomasa produce más enzima ($Y_{E/X}$)?. c) ¿esa productividad es aumentada o disminuida por la adición de glucosa, en presencia de un material inductor (el ácido tánico)? y d) Si hubiese diferencias en la tasa

secundaria de destrucción de la enzima (k) ¿éstas se asocian o no a la presencia concomitantes de proteasas en el medio de cultivo?. Para responder a esas preguntas se procedió a desarrollar un conjunto de experimentos utilizando ácido tánico como fuente de la molécula inductora y la glucosa como represor de la actividad tanasa. Adicionalmente, se evaluó el efecto del ácido gálico (producto de la reacción de hidrólisis del ácido tánico) en la síntesis de la tanasa en cultivo líquido. Para demostrar la capacidad del cultivo sólido para minimizar la represión catabólica en la síntesis de la tanasa se estableció como criterio de evaluación, la comparación de los patrones de producción tanto en condiciones de inducción como de represión de la síntesis de la enzima en ambos sistemas de cultivo. Los resultados obtenidos en la producción de la tanasa demostraron que:

- a) Los títulos de actividad alcanzados son mayores (hasta 6 veces) en cultivo sólido que en cultivo líquido. En cultivo sólido la productividad máxima fue siempre mayor que en cultivo líquido, siendo entre 2 y 7 veces mayor en los experimentos con ácido tánico y hasta 4 veces en aquellos con ácido tánico y glucosa.
- b) En los cultivos con ácido tánico y glucosa-ácido tánico, el análisis combinado de los parámetros cinéticos (μ , $Y_{E/X}$, X_{max}) indicó que el valor de la productividad a diferencia de lo reportado para otras enzimas, está fuertemente influenciado por $Y_{E/X}$ y no por X_{max} ni μ , aunque las diferencias en estos parámetros también fueron importantes, los cuales fueron superiores en cultivo líquido con ácido tánico (X_{max}) y con glucosa-ácido tánico (μ), en comparación con aquellos obtenidos para el cultivo sólido.
- c) Los patrones de producción en condiciones de inducción y represión de la tanasa fueron diferentes en ambos sistemas de cultivo. Altas concentraciones de ácido tánico (superiores a 25 gL^{-1}) afectaron seriamente la relación de inducción de la tanasa en cultivo líquido, mientras que en el

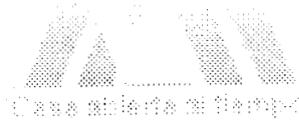
cultivo sólido favorecieron la expresión de la actividad enzimática. La relación de inducción máxima en cultivo líquido fue de 4 mientras que en el cultivo sólido fue de hasta 17. La adición de glucosa a concentraciones bajas (menores a 50 gL^{-1}) provocó condiciones de represión catabólica en la expresión de la tanasa en cultivo líquido. Una concentración de 25 gL^{-1} de glucosa redujo el valor de la relación de inducción por debajo de 1 mientras que a 50 gL^{-1} , la relación fue igual a cero. El uso de altas concentraciones de glucosa en cultivo sólido afectó seriamente la relación de inducción enzimática, aunque no se presentó el mismo fenómeno que en cultivo líquido. Los valores de la relación de inducción disminuyeron hasta 1.3 y 2 para la actividad intra y extracelular, respectivamente. En cultivo líquido, se observó que la actividad tanasa era inestable, lo cual se asoció a la presencia de actividades proteolíticas (al menos 6 veces mayores en cultivo líquido que en cultivo sólido).

- d) Tanto la actividad tanasa intracelular como extracelular en ambos sistemas de cultivo siguieron el modelo de Luedeking y Piret, obteniendo valores negativos para la constante k (grado de asociación del producto al crecimiento microbiano) en cultivo líquido y positivos para el cultivo sólido con ácido tánico como única fuente de carbono. Los valores negativos de k fueron asociados a las tasas de destrucción de la tanasa en el medio de cultivo por proteasas, mientras que el incremento de la actividad tanasa en función de la concentración del sustrato, coincidió con los valores positivos de k en cultivo sólido.
- e) Finalmente, los resultados obtenidos en los cultivos con ácido gálico sugieren que éste actúa como represor por producto final en la síntesis de la tanasa en cultivo líquido.

1. ABSTRACT

This work evaluates the differences in the production profiles of hydrolytic enzymes, when they are produced by liquid and solid state cultures. Such differences were described in the last decade with different enzymes. However, the causes that originate the obtaining of different titers of enzymatic activity have generated a great controversy. In this study, the tannase produced by *Aspergillus niger* Aa-20 was used as model of study. Tannic acid was used as inductor and the glucose as repressor of the tannase activity. Additionally, the effect of the gallic acid in the synthesis of the tannase in liquid culture was evaluated. To explain the capacity of the solid culture to minimize the catabolic repression of the enzymatic activity, the evaluation criterion taken was the comparison of production patterns in both induction and repression conditions of enzyme synthesis in liquid and solid state cultures. The results obtained in the production of the tannase demonstrated that the reached activity titles are higher (up to 6 times) in solid culture than liquid culture. Productivity was higher from 2 to 7 times in solid culture when tannic acid was only used, and up to 4 times with tannic acid and glucose. Combined analysis of the kinetic parameters (μ , $Y_{E/X}$, X_{max}) indicated that the value of productivity is strongly influenced by $Y_{E/X}$ and not by X_{max} or μ , as reported for other enzymes. However, the differences in such last parameters were important in liquid culture with tannic acid (X_{max}) and with glucose-tannic acid (μ), in comparison with those obtained in solid culture. In liquid culture the tannase activity was unstable, and this was clearly associated to presence of protease activities (at least 6 times higher in liquid culture than solid culture. Both tannase activities, intracellular and extracellular followed the Luedeking and Piret model, obtaining negative values of constant k (association rate of product to biomass formation) in liquid culture, and positive values in solid culture with tannic acid as sole carbon source. Negative values of k were related to decomposition rate of tannase in the culture medium by proteases, whilst the increment of tannase

activity in solid culture as function of substrate concentration, coincided with the positive values of k in solid culture. The induction and repression patterns of the tannase were clearly different in both culture systems. High concentrations of tannic acid (higher than 25 gL^{-1}) affected seriously the ratio of induction of the tannase in liquid culture, while in the solid culture favored the expression of the enzymatic activity. Maximum induction ratio in liquid culture was around 4, whilst in solid culture was 17. The addition of low concentrations of glucose (lower than 50 gL^{-1}) caused the catabolic repression of the tannase in liquid culture. In solid state culture, the use of high concentrations of glucose affected the ratio of enzymatic induction seriously, although the phenomenon of catabolic repression was not presented. Finally, it was found that the gallic acid could be a repressor for final product in the tannase synthesis in liquid culture.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

Capítulo 2
Introducción

2. INTRODUCCIÓN

La industria biotecnológica produce una gran cantidad de enzimas usando una combinación de herramientas de la tecnología de fermentación y de la genética moderna. Esta producción se lleva a cabo empleando cultivos líquidos superficiales (CLS), cultivos líquidos sumergidos (CML) y cultivos en medio sólido (CMS). Es importante señalar que desde hace más de 50 años, los científicos decidieron estudiar intensamente el CML, ignorando así al CMS (Raimbault, 1998). Aún así, a partir de los 70's, se han realizado diversos esfuerzos para producir diferentes metabolitos por CMS, especialmente enzimas, debido al lugar prominente que ocupan éstas en los mercados internacionales.

La producción convencional de enzimas microbianas en CML requiere, en la mayoría de los casos; **fuentes de carbono baratas y fáciles de adquirir, inductores específicos de la enzima deseada y una mezcla de sales minerales y otros compuestos orgánicos** (Viniestra-González, 1997). Desafortunadamente, la presencia de altos niveles de la fuente de carbono llegan a disminuir la producción de muchas enzimas (Ramesh y Lonsane, 1991; Shankaranand y col., 1992; Solís-Pereira y col., 1993; Maldonado y Strasser de Saad, 1998). Además, la presencia de proteasas vuelven altamente inestables los extractos obtenidos (Bradoo y col., 1997). Se ha reportado que la adición de azúcares simples o también de pectina en altas concentraciones a un CML inoculado con *Aspergillus niger* tuvo un efecto negativo en la producción de enzimas pectinolíticas (Aguilar y Huitrón, 1986; Maldonado y col., 1989). Sin embargo, se ha demostrado que la adición continua y controlada de pequeñas cantidades de los sustratos (cultivo por lote alimentado), aumenta la productividad de la enzima de cuatro a cinco veces (Aguilar y Huitrón, 1986). La explicación presentada por Aguilar y Huitrón (1986) a este fenómeno se relacionó al balance dinámico entre la demanda y el suplemento de

las fuentes de carbono en el CML, dejando a estos compuestos en una concentración baja. De tal forma que la concentración presente en el medio de cultivo nunca fuese de tal magnitud, que permitiera la manifestación del fenómeno de represión catabólica.

En relación al CMS, en los últimos diez años se ha sugerido que éste tiene una capacidad para minimizar la represión catabólica en la síntesis de diversas enzimas. Ejemplos de lo anterior son los resultados obtenidos en CMS para la producción de α -amilasa por *Bacillus licheniformis* M27 (Ramesh y Lonsane, 1991) y por *A. niger* CFTRI 1105 (Nandakumar y col., 1999), de pectinasas por *A. niger* (Solís-Pereira y col., 1993; Acuña-Argüelles y col., 1995; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Taragano y Pilosof, 1999), de tanasa por *A. niger* PKL 104 (Lekha y Lonsane, 1994), de amiloglucosidasa por *A. niger* CFTRI 1105 (Nandakumar y col., 1999), los hallazgos reportados por George y col., (1997) al estudiar la producción de proteasas por *B. amyloquefaciens*, y de invertasa producida por *A. niger* (Romero-Gómez y col., 2000). En dichos trabajos los altos títulos de actividad enzimática han sido explicados a través de una aparente ausencia de la represión catabólica en CMS.

En los estudios referidos, el tiempo de fermentación para alcanzar los mayores títulos de producción enzimática fue notablemente inferior en CMS que en el CML. La concentración de glucosa utilizada en ambos sistemas de fermentación varió considerablemente en dichos estudios. En CML, concentraciones de glucosa superiores a 10 - 30 gL⁻¹ provocaron una represión catabólica de la síntesis de las enzimas estudiadas, mientras que en CMS, se pudieron emplear concentraciones de glucosa superiores a 100 gL⁻¹. Las explicaciones existentes sobre este tipo de patrón en la producción de enzimas en CMS son muy escasas. Tal vez ninguna de éstas, por si sola pueda justificar la presencia de este tipo de patrón, sino más bien, puede ser el resultado de múltiples factores

involucrados en los procesos fermentativos, tales como la ausencia de agitación, la actividad de agua y la formación de gradientes, entre otros.

En este trabajo se estudiaron desde un punto de vista fisiológico, los patrones de inducción y represión de la enzima tanasa producida por *Aspergillus niger* Aa-20. Estos patrones han sido poco estudiados y los reportes existentes solo se basan en comparaciones de los títulos de la actividad enzimática producida, por lo tanto existen aún algunas incógnitas en: a) ¿cuál es el compuesto inductor? y b) ¿por qué existen diferencias tan grandes en su producción en medio sólido y líquido?. Algunas de estas incógnitas pudiesen resolverse si se evalúa la contribución que puedan tener factores tales como: la producción de biomasa y enzima, el rendimiento de la enzima por unidad de biomasa, y la estabilidad de la enzima excretada al medio de cultivo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen dificultades de tipo técnico para llevar de forma adecuada los análisis de biomasa y producto en el cultivo sólido, sobre todo en los procesos de extracción, en los cuales se presentan grandes interferencias. Para superar dichas deficiencias, se ha recurrido al uso de un soporte inerte no biodegradable: la espuma de poliuretano, para así poder medir de forma reproducible la cantidad de biomasa, las unidades de enzima producida y el consumo del sustrato y con ello, tener por primera vez estimaciones directas de los coeficientes cinéticos del proceso.



Uasa abierta al tiempo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

13/10/2018

Capítulo 3
Antecedentes

3. ANTECEDENTES

3.1 Aspectos generales

Dependiendo de las condiciones de cultivo, el crecimiento microbiano en medios con dos fuentes de carbono presenta un comportamiento denominado como diauxia o de dos fases (Gottschalk, 1982). Este se manifiesta, porque el microorganismo utiliza primero al sustrato de más fácil asimilación o con el cual se requiera el mínimo consumo de energía para introducirlo y metabolizarlo. Cuando éste se acaba, consumirá la otra fuente de carbono. En el caso particular del metabolismo bacteriano, este fenómeno conocido como represión catabólica, se presenta por la inhibición del transporte activo provocado por la alta concentración de uno de los azúcares que ingresan por el sistema fosfotransferasa. Este proceso de regulación consiste básicamente en la represión de la expresión de los genes que codifican para las enzimas necesarias para la degradación y asimilación de sustratos más complejos, y se ocasiona por la alta concentración de sustratos energéticamente preferidos por los microorganismos (Scrimgeour, 1977), debido a que las células se desarrollan en función a un eficiente sistema metabólico basado en un mínimo gasto energético.

Los principales antecedentes sobre el conocimiento de los mecanismos involucrados en el fenómeno de represión catabólica se basaron en el estudio de células procariotas (Livshits y Debabov, 1988), principalmente de *Bacillus subtilis* (Monod y col., 1942), *Escherichia coli* (Magazanick, 1942) y *Pseudomonas multivorans* (Trumbly, 1991). Dichos estudios sirvieron como fundamento para entender los mismos procesos en sistemas biológicos más complejos. En eucariotas, las levaduras del género *Saccharomyces*, han sido las más estudiadas (Gottschalk, 1982; Johnston y Carlson, 1992; Ronne, 1995). Con respecto a los mohos, Anwar y col., (1996) enfocaron sus esfuerzos al aislamiento de

mutantes de *Penicillium purpurogenum* resistentes a represión catabólica. Mientras que, Antier y col., (1993 a y b) aislaron mutantes de una cepa silvestre de *Aspergillus niger* C28B25 productora de pectinasas, usando como fenotipo de selección la resistencia a la 2-desoxiglucosa (Viniestra-González, 1997). Al igual que *S. cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* ha llegado a ser uno de los microorganismos eucariotas que ha sido estudiado más intensamente y en la actualidad, con el apoyo de análisis sobre mutaciones, se ha establecido que el gen CREA de *A. nidulans* participa en los sistemas de regulación controlando la represión catabólica (Shroff y col., 1997).

Por otra parte, en los últimos años se han reportado aspectos particulares sobre el fenómeno de represión catabólica, sobre todo cuando se evalúan los niveles de producción de enzimas inducibles entre el CML y el CMS (Ramesh y Lonsane, 1991; Solís-Pereira y col., 1993; Lekha y Lonsane, 1994; Acuña-Argüelles y col., 1995; George y col., 1997; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Nandakumar y col., 1999; Taragano y Pilosof, 1999; Romero-Gómez y col., 2000). Tales aspectos indican que al adicionar glucosa en concentraciones de hasta 30 gL⁻¹ más el inductor al medio de cultivo en CML, existe una represión casi total de la síntesis de enzimas inducibles, mientras que en CMS se observa una ausencia aparente de este fenómeno.

Ramesh y Lonsane (1991) suponen que dicha ausencia aparente de la represión catabólica en CMS se debe principalmente a factores fisico-químicos, tales como la difusión de nutrientes sobre el soporte, los cuales se dan en presencia de una baja actividad acuosa y también por la adherencia de las células al soporte, lo que implica que las concentraciones de sustrato que se encuentran en contacto con las células microbianas, no son capaces de generar tal fenómeno de regulación.

Solis-Pereira y col. (1993) mencionaron que en el CMS, este fenómeno se debe a diferencias inherentes al mezclado (en este sistema no hay agitación, por lo que la concentración de nutrientes y particularmente la del represor catabólico es heterogénea) y a difusión de los nutrientes en el medio de fermentación (la cual depende directamente de la viscosidad de la fase líquida del medio).

Sobre este aspecto, Lekha y Lonsane (1994) mencionan que la alta producción de la enzima tanasa por *A. niger* PKL 104 en CMS se favorece por un bajo contenido de humedad, ya que la falta de agitación y la baja actividad de agua inciden directamente en la producción enzimática.

Por su parte, Maldonado y Strasser de Saad (1998) reportaron que la diferencia física del tipo de sistema de cultivo influye directamente sobre la fisiología que exhiben los microorganismos durante su crecimiento, y demostraron que la composición de la membrana celular de *A. niger* es diferente cuando se desarrolla en CML o CMS, sobre todo en el tipo y contenido de ácidos grasos. Por lo tanto, se sugieren diferencias en los procesos de transporte de los nutrientes.

Nandakumar y col. (1999) evaluaron la represión catabólica de la biosíntesis de la alfa amilasa y amiloglucosidasa de *A. niger* CFTRI 1105 producidas en CMS y CML, reportando que en este último sistema de cultivo, la adición de glucosa reduce drásticamente la producción de ambas enzimas mientras que en CMS la adición de glucosa hasta en un 15% no estimula o modifica la producción de alguna de las enzimas. Las diferencias encontradas fueron explicadas en términos de una baja actividad de agua y ausencia de agitación en CMS, sugiriendo una reducción en el proceso de difusión en el medio.

Rencientemente, Romero-Gómez y col. (2000) indicaron que las diferencias en la productividad enzimática en ambos sistemas de cultivo están directamente relacionadas con el nivel de biomasa generada, ya que reportaron que a altas concentraciones de biomasa no se presentó la represión catabólica de la invertasa de *A. niger* en CMS, sugiriendo diferencias en los procesos difusionales de los nutrientes en CML y CMS..

Hasta ahora, en CML esta bien documentado el hecho de que si existe acumulación de una molécula represora (tal como glucosa) en presencia de una molécula inductora de alguna actividad enzimática, se presentará la represión catabólica de dicha actividad, por el contrario, en CMS bajo las mismas condiciones de cultivo, no se presentará el mismo fenómeno, incluso la actividad enzimática puede verse incrementada. Sin embargo, es un hecho que aún es escasa la información que permita demostrar las causas de las diferencias tan marcadas en la producción de enzimas en CML y CMS. Además, existe poca información relacionada con los patrones de producción en estos tipos de fermentación. Sobre todo en torno a la explicación de la capacidad que tiene el CMS para minimizar la represión catabólica. Por esta razón, es necesario establecer los factores que influyen en la manifestación de estos tipos de patrones, los cuales tienen grandes implicaciones económicas y prácticas en los procesos industriales convencionales. A continuación se revisan algunos conceptos sobre el fenómeno de represión catabólica, teniendo en mente, que éstos se presentan como información complementaria, ya que los resultados aquí presentados no son aquellos que se obtienen en los estudios clásicos a nivel molecular de inducción y represión.

3.2 Represión catabólica

El mecanismo de represión catabólica ha sido estudiado básicamente en bacterias y se conoce como represión catabólica de carbono, ya que se supone que el metabolismo de carbono controla el proceso. Sin embargo, nuevas evidencias hacen suponer que la represión catabólica se inicia desde el proceso de fosforilación de la glucosa (Ronne, 1995). Ahora se sabe que los hongos y las levaduras muestran una respuesta similar denominada también, represión por glucosa (Baryshnikova y Golovlev, 1997; Pérez, 2000).

El nivel de represión causado por la glucosa depende básicamente tanto del tipo de enzima como de la cepa utilizada (Gancedo, 1992). Dicho nivel puede variar hasta 800 veces (en relación a la actividad basal) en el caso de la enzima invertasa, o tan sólo diez veces como en el caso del citocromo c, la aconitasa e isocitrato deshidrogenasa. Generalmente, la disminución de actividad enzimática está relacionada a un decremento en la concentración correspondiente de RNAm. Esto se explica por el efecto de la glucosa sobre el nivel de transcripción y/o sobre la estabilidad del RNAm correspondiente (Breunig y col., 2000). Comúnmente, la literatura trata el fenómeno de represión de glucosa en términos de control de expresión de genes o como represión transcripcional por glucosa al mismo tiempo que contemplan la degradación del RNAm y un eficiente control de genes, el cual incluye dos mecanismos regulatorios adicionales, la degradación de proteínas (conocida como inactivación catabólica de carbono) e inhibición de la enzima blanco (Klein, 1998).

Entre los microorganismos eucariotas, la levadura *S. cerevisiae* ha sido el modelo más estudiado (Mwesigye y Barford, 1996, Ye y col., 1999) y ahora se sabe que la utilización de algunos azúcares por

estos organismos se controla por represión catabólica: este fenómeno regula la expresión de los genes que participan en el proceso de fermentación a nivel de transcripción. La presencia de glucosa afecta el transporte de los otros azúcares en la célula y por lo tanto, afecta la función reguladora de los mecanismos involucrados en la inducción enzimática (Carlson, 1987, Pyrun y col., 1999).

Los primeros hallazgos importantes logrados en el estudio del fenómeno de represión catabólica en células eucariotas y particularmente en *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* demostraron que éste, es un sistema regulador de muy alta complejidad en relación con los sistemas procariontes (Entian, 1986; Carlson, 1987; Gancedo y Gancedo 1986; Ye y col., 1999; Pyrun y col., 1999; Breunig y col., 2000), determinándose que difería del sistema de regulación descrito para *E. coli*, donde la señal molecular de falta de glucosa en el medio, es el AMPc, el cual activa una proteína (conocida como proteína activadora de catabolito), que participa en el proceso de activación de la transcripción de los operones relacionados. Al contrario, en *S. cerevisiae*, se demostraron evidencias genéticas y bioquímicas de que el AMPc no es el efector directo para la represión catabólica (Eraso y Gancedo, 1984; Gancedo y Gancedo, 1986), ya que el rol principal lo juegan los productos de tres genes, el *hxx2* que codifica para una proteína hexocinasa PII, cuya función de sensor le permite reconocer los niveles de glucosa presentes en el medio; el gen *snf1* cuyo producto es una proteínasa y se requiere para la des-represión de muchos genes represibles por glucosa y el *mig1*, que codifica para una proteína represora, que se enlaza a las regiones de genes represibles por glucosa, tal como el *suc2* (que codifica para la invertasa) según lo reportado por Trumbly (1991). Los productos de estos tres genes participan regulando el transporte de azúcares, lo cual sugiere que la fosforilación de proteínas es el efector principal en el mecanismo de la represión catabólica en *S. cerevisiae* (Celenza y Carlson, 1986).

Por lo cual, se puede decir que la represión por glucosa actúa a dos niveles, la regulación de la transcripción de los genes y además del control de vida media de RNAm (Prieto y col., 2000).

En el trabajo reportado por Trumbly (1991), se propone que en presencia de glucosa, la proteína hexoquinasa codificada por el gen *hvk2*, favorece la forma inactiva del complejo CAT1/CAT3 y a su vez el complejo CYC8/TUP1 es activado y facilita la unión al factor inhibitorio MIG1, lo que da como resultado un decremento en la transcripción de *suc2* en presencia de glucosa. Cuando la concentración de glucosa en el medio es baja, no hay flujo ni señal del gen *hvk2*. A su vez, el complejo SNF4/SNF1 inactiva el complejo CYC8/TUP1, conjuntamente con el factor inhibitorio MIG1 y por lo tanto no se unen a la región promotora del gen *suc2* permitiendo la transcripción.

Es importante considerar que se han logrado progresos en el entendimiento de los sistemas específicos involucrados en este fenómeno, y el uso de análisis genéticos y bioquímicos han permitido considerables avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan este fenómeno en *S. cerevisiae* (Carlson, 1987; Trumbly, 1991; Gancedo, 1992; Ronne, 1995; Mwesigye y Barford, 1996; Klein, 1998; Pérez, 2000; Prieto y col., 2000, Breunig y col., 2000).

En relación a hongos filamentosos es importante destacar los estudios de Allen y col., (1989) quienes aislaron y caracterizaron bioquímica y genéticamente a diversas mutantes de *Neurospora crassa* resistentes a represión catabólica por la desoxiglucosa. Elorsa y Arst (1971) estudiaron mutantes de *A. nidulans* resistentes a la represión catabólica por sorbosa. Antier y col., (1993a) estudiaron mutantes de *A. niger* C28B25 hiperproductoras de pectinasas, las cuales no están sujetas a represión catabólica.

Torres y col., (1996) demostraron la existencia de un transportador de baja afinidad cuando se hace crecer a *A. niger* en medios con altas concentraciones de glucosa. Los dos transportadores de glucosa en *A. niger* conocidos han sido modelados y se ha demostrado que la difusión simple es el mecanismo primario en el consumo de glucosa durante las fase de producción de metabolitos (p.ej. ácido cítrico), cuya síntesis dependen básicamente de la concentración de glucosa y de los procesos difusionales a los que dicha molécula se encuentre sometida en el medio, debido a que estas condiciones gobiernan la tasa específica de consumo de sustrato (Wayman y Matthey, 2000).

De los estudios llevados a cabo sobre la represión catabólica en los mohos, resaltan los de Bailey y Arst (1975) y Arst y Bailey (1977), en los que se evidenció que la proteína codificada por el gen *CREA* en *A. nidulans* desempeña un papel de proteína represora en el mecanismo de regulación genética por represión catabólica. Dicho gen ha sido aislado (Arst y col., 1990; Shroff y col., 1996), clonado y secuenciado (Dowzer y Kelly, 1989; 1991). Asimismo, el gen *creA* de *A. niger* ha sido aislado por hibridación cruzada usando el gen clonado de *A. nidulans*, con el fin de obtener un mayor conocimiento en el análisis comparativo de la represión catabólica tanto en especies de *Aspergillus* como de *Trichoderma* (Drysdale y col., 1993; Strauss y col., 1995; Ilmen y col., 1996; Takashima y col., 1996). Algunas evidencias genéticas sugieren que el gen *creA* es una proteína represora de regulación negativa, que desempeña un papel tanto en condiciones de represión catabólica como en condiciones de desrepresión catabólica (Mathieu y Felenbok, 1995; Shroff y col., 1996; 1997; Vaulard-Mey y Fevre, 2000). Agger y Nielsen (2000) han propuesto un modelo de las interacciones entre los genes reguladores y estructurales que participan en la expresión de la síntesis de la enzima inducible alcoholdehidrogenasa I (sujeta a represión por glucosa) en *A. nidulans*. El modelo supone cinéticas de

equilibrio en el enlace de las proteínas reguladoras a las regiones promotoras de los genes e incluye la posible activación y síntesis de proteínas bajo diferentes condiciones de crecimiento y con diferentes mutaciones en el sistema regulatorio.

Considerando la información generada en los últimos años sobre una variedad de sistemas de represión catabólica, se ha demostrado que se requieren al menos tres elementos: la señal producida por glucosa, una proteína codificada por un gen regulador y un elemento localizado en el gen promotor del gen regulado, capaz de responder a la proteína codificada por el gen regulador (Panneman, 1996). Cabe aclarar que la mayoría de este tipo de estudios han sido llevados a cabo en CML, lo que dificulta aún más el entendimiento de este fenómeno en CMS, por lo que a continuación se realiza una comparación de información relacionada al tema entre ambos sistemas de cultivo.

3.3 Inducción enzimática y represión catabólica en CML y CMS

Existen ciertos aspectos de interés entre las diferencias fisiológicas durante la producción de una misma enzima por la misma cepa en CMS y en CML. Estas variaciones consisten básicamente en diferentes títulos de actividad enzimática producidos en CML y CMS. Los resultados obtenidos para la producción en CMS de α -amilasa por *B. licheniformis* M27 (Ramesh y Lonsane, 1991) y por *A. niger* CFTRI 1105 (Nandakumar y col., 1999), de pectinasas por *A. niger* (Solis-Pereira y col., 1993; Acuña-Argüelles y col., 1995; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Taragano y Pilosof, 1999), de tanasa por *A. niger* PKL 104 (Lekha y Lonsane, 1994), de proteasas por *B. amyloquefaciens*, (George y col., 1997), de amiloglucosidasa por *A. niger* CFTRI 1105 (Nandakumar y col., 1999) y de invertasa (Romero-Gómez y col., 2000), han sido explicados en términos de una aparente ausencia del fenómeno de

represión catabólica en este tipo de cultivo. En el caso de la enzima tanasa, Lekha y Lonsane (1994) reportaron que ésta se produce en mayores títulos en CMS debido a que se produce casi exclusivamente de forma extracelular y no se ve reprimida en presencia de glucosa. Sin embargo, en una contribución más reciente, Lekha y Lonsane (1997) basándose en los estudios de Knudson (1913), consideran que la producción de la tanasa por *A. niger* no está sujeta a represión catabólica. Knudson (1913) también reportó que la síntesis de la tanasa en *A. niger* no se reprime en presencia de sacarosa a una concentración de 0.3 M.

En los trabajos reportados en el párrafo anterior, se ha hecho notar la capacidad de CMS para minimizar de forma significativa la represión catabólica, nunca antes reportada. Dichos estudios no se enfocaron sobre el mecanismo de represión catabólica como causante de la disminución en los títulos de actividad enzimáticos producidos en CML, ya que fueron diseñados con estrategias experimentales para dilucidar las diferencias en los títulos de actividad enzimática en ambos sistemas de cultivo y no sobre la evaluación de tal fenómeno a nivel de mecanismo. Sin embargo se supuso que los bajos títulos de la actividad enzimática en CML, se dan bajo condiciones de represión catabólica, las cuales no están presentes en CMS.

Al respecto, cabe destacar los estudios llevado a cabo por Minjares-Carranco y col., (1997), Maldonado y Strasser de Saad (1998), Nandakumar y col., (1999) y Romero-Gómez y col., (2000). En el primero de ellos se evidenciaron cambios morfológicos (patrones de esporulación) en el crecimiento de *A. niger* y de las propiedades de estabilidad térmica de las pectinasas producidas en mayores títulos en CMS. En el segundo caso, Maldonado y Strasser de Saad (1998) al estudiar la producción de pectinasas por *A.*

niger en CML y CMS, evidenciaron cambios en la composición química de la membrana celular, especialmente en la cantidad de ácidos grasos, concluyendo que tales diferencias modifican la forma de asimilación de la glucosa y por lo tanto los sistemas de regulación, provocando como respuesta títulos de actividad enzimática superiores (hasta 6 veces) en CMS que en CML. En el tercer caso, Nandakumar y col., (1999) reportaron que la adición de glucosa en altas concentraciones en CMS no favorece incrementos en los títulos de actividad amilasa o amilogucosidasa producidos por *A. niger* CFTRI 1105. Sin embargo, en CML observaron reducciones drásticas de ambas actividades enzimáticas. Romero-Gómez y col., (2000) a su vez, asociaron las diferencias de actividad invertasa producida por *A. niger* a los valores de biomasa máxima alcanzada y a la tasa específica de crecimiento (μ), los cuales fueron mayores en CMS que en CML.

Es un hecho que en CML, la glucosa, potencial causante de la represión de la síntesis de las enzimas de interés, puede adicionarse a concentraciones muy elevadas sin que se presente el mismo comportamiento en CMS. Además, el tiempo de fermentación para alcanzar los mayores títulos de producción enzimática es notablemente inferior en CMS que en el CML. La concentración de glucosa utilizada en ambos sistemas de fermentación, varía considerablemente en los estudios citados anteriormente, ya que en CML, concentraciones superiores a 0.055-0.16 M, generan condiciones de represión catabólica de los genes involucrados en la expresión de las enzimas estudiadas, mientras que en CMS, se pudieron emplear concentraciones de glucosa superiores a 0.55 M. Ramesh y Lonsane, (1991) explicaron estos resultados como un proceso de desadaptación total manifestado en CML. A su vez, Viniegra-González (1995) indicó que los patrones de producción de enzimas en ambos sistemas de cultivo esta fuertemente ligada a la difusión de los nutrientes en el medio externo del

microorganismo y a la velocidad con que este los consume. Sin embargo, las explicaciones existentes sobre este tipo de patrón en la producción de enzimas en CMS y CML son escasas, y tal vez ninguna de éstas, por sí solas puedan justificar completamente la presencia de este tipo de patrones, sino más bien, puede ser el resultado de varias o casi todas estas explicaciones. La mayoría de los trabajos mencionados anteriormente carecen de una estrategia experimental definida para la interpretación de diferencias tan marcadas en sistemas de cultivo tan diferentes, ya que aparentemente solo fueron dirigidos para evidenciar las diferencias en los títulos de actividad enzimática de interés.

Romero-Gómez y col., (2000) enfocaron su estudio de producción de invertasa fúngica considerando algunos parámetros cinéticos del crecimiento microbiano, concluyendo que el rendimiento de enzima/biomasa ($Y_{E/X}$) no es significativamente diferente en ambos sistemas de cultivo, en cambio los valores obtenidos para la biomasa máxima (X_{max}) y la velocidad específica de crecimiento (μ) si lo fueron. Es decir, en CMS se produjo más enzima porque se obtuvo más biomasa en presencia de altos niveles de glucosa pero sin la represión catabólica.

Debido a la naturaleza del crecimiento fúngico, es lógico suponer que la concentración de microorganismo (X) influye en la velocidad con que aumenta la población (r_x) y la velocidad con que se forma el producto (q_p), sobre todo si éste es un metabolito primario, como lo es el caso de las enzimas hidrolasas. Lo anterior implica que un estudio cinético sobre la producción de una enzima permitirá la obtención de datos sobre los estados fisiológicos de los microorganismos en CMS y CML. Al respecto, el único estudio orientado sobre represión catabólica en CMS fue el reportado por Nandakumar y col., (1999) quienes evaluaron dicho fenómeno en la biosíntesis de amilasas fúngicas, sin embargo, sus

resultados no aportaron nada nuevo en relación con lo anteriormente publicado por otros investigadores (Ramesh y Lonsane, 1991; Solís-Pereira y col., 1993; Lekha y Lonsane, 1994; Acuña-Argüelles y col., 1995; Goerge y col., 1997; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Romero-Gómez y col., 2000). De tal forma que, al momento no existe un estudio que involucre parámetros tales como el rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) y en producto (Y_p), los cuales son parámetros de importancia fundamental dentro de la microbiología industrial, ya que dan una medida de la eficiencia del proceso de producción. En el caso de enzimas inducibles, su producción en la mayoría de los casos, es consecuencia directa de la degradación o utilización de la fuente de carbono empleada para obtener energía y como molécula inductora, por lo que en este tipo de productos la velocidad de formación tendrá contribuciones importantes. Tomando en cuenta lo anterior y considerando que en el presente trabajo se estudia la producción fúngica de la tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20 en CML y CMS, a continuación se presentan algunos conceptos básicos en el estudio cinético de la producción de enzimas microbianas.

3.4 Aspectos cinéticos del crecimiento celular y la formación de productos microbianos

El crecimiento microbiano es seriamente afectado por condiciones tales como: temperatura, pH, fuerza iónica y la concentración de sustrato, las cuales son generalmente establecidas desde el principio del cultivo y que durante el transcurso de éste, varían en el sistema, a no ser que exista un control externo que limite dicha variación. Para un cultivo por lote, el crecimiento microbiano puede ser estimado a través del modelo propuesto en 1942 por Monod: $\mu = [\mu_{\max}(S/K_s + S)]$. Donde la variación en la formación de biomasa en función de tiempo (dX/dt) es igual a μX , que representa la velocidad de crecimiento celular. X , es la concentración de biomasa; S es la concentración de sustrato; K_s , es la

constante de saturación y , μ = velocidad específica de crecimiento, que tiene un valor que se considera constante en la fase exponencial del crecimiento, cuando éste es proporcional a la cantidad de células presentes. Es importante señalar que existen otros modelos para el crecimiento; son ejemplos el modelo de crecimiento lineal (Quintero, 1990) que ocurre cuando existen limitaciones debidas a velocidades de difusión o de transferencia de masa. Cuando el crecimiento de mohos en CML se da en forma de pellets se utiliza el modelo de Righelato (1975), el cual considera que la capa periférica del pellet crece exponencialmente cuando excede cierto diámetro, provocando que no se difunda el sustrato dentro del pellet con la velocidad suficiente para mantener el crecimiento exponencial en toda su masa. Por otro lado, el modelo de Gompertz (Draper y Smith, 1966), permite calcular el valor de μ , en una relación algebraica tiempo-producto (Saucedo-Castañeda y Gómez, 1989). Sin embargo, el modelo descrito por Monod (1942) ha llegado a ser la expresión empírica más utilizada para describir la velocidad específica de crecimiento.

Si se establece una relación entre la cantidad de biomasa generada con el sustrato consumido y los productos formados se denominan rendimiento o conversión del sustrato [$Y_{X/S} = (X - X_0)/(S_0 - S)$] y rendimiento de formación de producto [$Y_P = (P - P_0)/(X - X_0)$], respectivamente. Ambos son fuertemente influenciados por el tipo de cultivo, las condiciones del mismo y del tipo de microorganismo. A bajas concentraciones de sustrato, la ecuación de rendimiento $Y_{X/S}$ puede incluir un factor que tome en cuenta el mantenimiento celular.

Las velocidades específicas tanto de consumo de sustrato (q_s) como de formación de producto (q_p) se pueden calcular fácilmente si se conoce el valor de μ , ya que $\mu/Y_{XS} = q_s$, mientras que $\mu Y_P = q_p$ (Ertola y col., 1994).

En relación a la evaluación cinética de la formación de productos microbianos, se han propuesto muchos modelos para la producción de muchos metabolitos; tres de ellos han servido notablemente para explicar el comportamiento de sistemas simples: a) el modelo asociado al crecimiento, b) el modelo no asociado al crecimiento y c) el modelo mixto o combinado. El primero modelo considera que el sustrato es transformado estequiométricamente en un solo producto (P), en donde la velocidad de formación está en relación con la velocidad de crecimiento por $dP/dt = \alpha dX/dt$, donde, α = constante estequiométrica. En los casos en que la formación de producto es independiente de la velocidad de crecimiento, $dP/dt = \beta X$, donde, β = constante de proporcionalidad. La constante β representa la unidad de actividad formadora del producto por masa de células en el tiempo (t). El modelo mixto o combinado, propone expresar la producción como la suma de ambas relaciones anteriores: $dP/dt = \alpha dX/dt + \beta X$, lo cual puede ser representada como $q_p = 1/X dP/dt = \alpha \mu + \beta$, donde q_p = tasa específica de formación de producto.

Luedeking y Piret (1959) y Kono y Asai (1969) han aplicado este modelo a diversas fermentaciones con buenos resultados, además, de este modelo se han generado modelos mas complicados, en los cuales α y β son variables o adquieren valores discretos en las cuatro fases del crecimiento microbiano en cultivos por lote. Ertola y col. (1994) mencionaron que el segundo miembro del modelo combinado expresa la velocidad de formación del producto en relación al crecimiento, además en el caso de

enzimas inducibles, su formación es consecuencia directa de la degradación de la fuente de carbono utilizada como inductor, por lo que en este tipo de productos, el conocimiento de la velocidad de formación y el de la asociación producto-biomasa representa contribuciones importantes.

Antes de estudiar las causas primarias de la manifestación de comportamientos diferentes en la producción de enzimas en CML y CMS, es necesario detallar cinéticamente los perfiles de producción en ambos sistemas de cultivo. Esta información proporcionará datos relevantes que permitirán avanzar en el estudio sobre las diferencias en los títulos de producción enzimática en sistemas de cultivo diferentes.

Los estudios reportados indican que el CMS resulta un proceso más atractivo para la producción de enzimas microbianas, en términos de actividad (Ramesh y Lonsane, 1991; Solis-Pereira y col., 1993; George y col., 1997), de estabilidad (Alazard y Raimbault, 1981; Lekha y Lonsane, 1994) y productividad (Acuña-Argüelles y col., 1995; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Romero-Gómez y col., 2000), entre otros. Si en términos de productividad enzimática el CMS es más atractivo que el CML, resulta importante conocer en detalle los aspectos fisiológicos involucrados en estos procesos. Especialmente porque es posible que los parámetros de optimización para cada uno de estos tipos de cultivo sean distintos y obedezcan a diferentes condiciones de cultivo.

Una de las diferencias fisiológicas bien conocidas entre el CMS y el CML es el proceso de esporulación de los hongos, el cual es difícilmente controlable en CML, donde además, se presenta en tiempos más largos con respecto al CMS (Viniestra-González, 1995). Con respecto a hongos filamentosos, se ha

reportado que su crecimiento se ve favorecido en CMS, ya que éste proceso brinda un habitat tipo natural (Ramesh y Lonsane, 1991), caracterizado por los bajos valores de actividad de agua. Pandey (1992) en su revisión sobre procesos de CMS sugiere que uno de los principales parámetros que influyen fuertemente en los niveles de productividad es la actividad de agua, basando su observación en los resultados obtenidos para la producción de poligalacturonasa y celulasa por *Geotrichum condidum* (Davis y Baudoin, 1987) y de poligalacturonasa, D-xilanasas y b-galactosidasas por *Trichoderma viridiae* (Grajek y Gervais, 1987).

Dada la poca información disponible para conocer de forma completa las causas que originan tales diferencias, es necesario conocer parámetros tales como, la relación y el potencial de inducción, la velocidad diferencial de síntesis enzimática, entre otros, los cuales modifican los patrones de producción de los metabolitos de interés en sistemas de CML y CMS. En este último, además es importante considerar los roles que juegan aspectos tales como, la movilidad del agua libre en el soporte, su grado o densidad de empaque, la actividad de agua, concentración real de los sustratos en la vecindad de las células y la afinidad de las enzimas por tales sustratos (inductores/represores catabólicos).

Los estudios de referencia aquí presentados, han reportado que los altos títulos de producción enzimática en la CMS se deben a una reducción de las condiciones de represión catabólica (Ramesh y Lonsane, 1991; Solís-Pereira y col., 1993; Lekha y Lonsane, 1994; Acuña-Argüelles y col., 1995; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Romero-Gómez y col., 2000). Incluso, Bailey y Pessa (1990) en una discusión muy ligera de las diferencias en la productividad, atribuyeron menores títulos de actividad

enzimática en CML a la ruptura celular por las condiciones de cultivo. En estos trabajos, no se discuten aspectos tan importantes tales como, los patrones de producción y las relaciones de inducción y represión catabólica, así como las tasas diferenciales de síntesis enzimática de los sistemas comparados. Pandey y col., (1999) al revisar las enzimas producidas por CMS hacen énfasis en la falta de información encaminada a determinar las causas por las cuales los títulos enzimáticos logrados en CMS son mayores que aquellos obtenidos en CML. Esto, sugiere que para poder establecer diferencias concretas al comparar sistemas tan marcadamente diferentes, primero deben considerarse los aspectos que en este trabajo forman la parte fundamental. Una vez que se haya establecido la influencia de los diferentes factores mencionados se deberá ejecutar la búsqueda experimental que lleve a encontrar las respuestas sobre las cuales se logre un mayor entendimiento sobre los altos títulos obtenidos en la producción de enzimática en la CMS.

Es importante señalar que, a diferencia de los trabajos citados sobre el tema, en el presente texto se indican diferencias en los patrones de producción de la síntesis enzimática considerando otros aspectos importantes, como los relacionados con la presencia de actividades proteolíticas que destruyen las enzimas inducidas y las diferencias en los coeficientes cinéticos en ambos sistemas de cultivo. Para establecer las diferencias en los patrones de producción enzimática en CML y CMS, se utilizó como modelo de estudio la enzima tanasa producida por *Aspergillus niger* Aa-20 usando espuma de poliuretano como soporte inerte del CMS, ya que se sabe que la heterogeneidad del soporte (tal es el caso de los residuos agro-industriales), representa uno de los principales problemas en los estudios fisiológicos, sobre todo en las determinaciones analíticas de las concentraciones de biomasa, oxígeno, sustrato y producto formado; sin embargo, esto puede ser fácilmente resuelto con el empleo de

soportes inertes (Favela y col., 1995), ya que aquí se presentan un menor número de interferencias (Zhu y col., 1994). Es importante considerar que el empleo de un soporte inerte, permite relacionar la cantidad de biomasa generada con la caída de presión en los reactores de fermentación durante el crecimiento microbiano (Auria y col., 1993). Dicha demostración permite medir aquello a lo que se le ha denominado impedimento estérico del CMS (Laukevics y col., 1984), y que es función directa del grado de empaque del reactor y por lo tanto con la cantidad de espacios disponibles que pueden ser ocupados por la biomasa que se genera durante el proceso de fermentación, por tal motivo resulta importante considerar la versatilidad de los soportes inertes a seleccionar (Viniegra-González, 1995).

Las diferencias encontradas en el presente estudio, se basan en una discusión fisiológica en términos de coeficientes cinéticos y rendimientos, infiriendo de esta forma la generación o ausencia de condiciones de represión catabólica en los sistemas de producción enzimática evaluados, utilizando para ello al ácido tánico como fuente de carbono y energía, además como fuente de inductor de la actividad tanasa, además se utilizó la glucosa como fuente de carbono y energía y como molécula represora de la actividad tanasa.

3.5 Tanin acil hidrolasa

La tanasa cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en la molécula de los taninos hidrolizables y de los ésteres del ácido gálico (Lekha y Losane, 1997). Esta enzima es producida por hongos filamentosos, principalmente por especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Iibuchi y col., 1967; Rajakumar y Nandy, 1983; Kawakubo y col., 1991; Lekha y Lonsane, 1994; García-Peña,

1996; Bajpai y Patil, 1996), pero también la producen bacterias (Deschamps y col., 1983; Skene y Brooker, 1995) y levaduras (Aoki y col., 1976). Además, esta actividad esterasa ha sido detectada en diversos vegetales (Sourlangas, 1947; Madhavakrishna y col., 1960). La tanasa se aplica comercialmente en la manufactura de algunas bebidas y alimentos, en la industria química-farmacéutica, cervecera y de alimentación animal (Ribereau-Gayon, 1973; Coggon y col., 1975; Chae y Yu, 1983; Pourrat y col., 1985; Sittig, 1988; Lekha y col., 1993). Sin embargo, el uso de la tanasa a gran escala está severamente limitado, debido a diferentes factores, entre los cuales, el costo de producción y el insuficiente conocimiento de la enzima son los más importantes.

La enzima tanasa es una hidrolasa (3.1.1.20) que actúa sobre algunos taninos, principalmente los hidrolizables (i.e. derivados de la galoil-glucosa). Para ejemplificar lo anterior, en la figura 1 se muestra la reacción de hidrólisis de una mol de ácido tánico (Figura 1a) y de un éster metílico del ácido gálico (Figura 2b). Sobre el ácido tánico (un tanino hidrolizable), la tanasa genera glucosa y ácido gálico como productos finales de la reacción (Haworth y col., 1958). Los compuestos intermediarios en esta hidrólisis son: 1,2,3,4,6-pentagaloil-glucosa, 2,3,4,6-tetragaloil-glucosa y dos tipos de monogaloil-glucosa. Cuando el sustrato de la reacción es el metil éster del ácido tánico o el metil galato, la tanasa genera ácido gálico y alcohol métilico como productos finales (Ibuchi y col., 1972). La Figura 1a muestra la reacción catalizada por la tanasa sobre el ácido tánico, el cual puede o no estar metilado, si no lo está, la molécula de glucosa puede unirse a través de enlaces tipo éster a radicales R_2 (ácido digálico) sobre los carbonos 1,2,3 y 4, y al radical R_1 (ácido gálico) sobre el carbono 6. Si el ácido tánico está metilado, el radical R_2 será reemplazado en todas las posiciones por un radical R_3 (m-digalato metilado; no se muestra en la figura) (García-Peña, 1996).

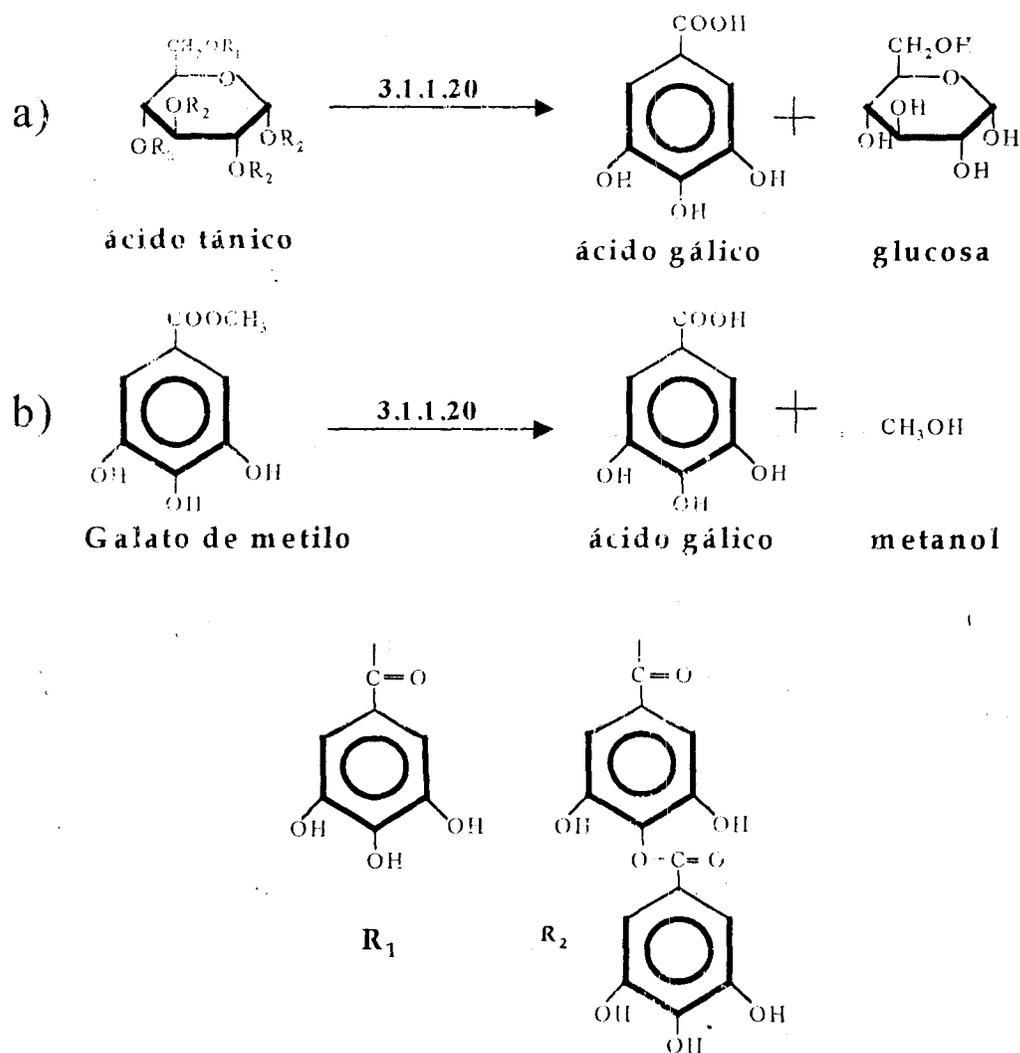


Figura 1. Hidrólisis enzimática del ácido tánico (a) y del éster metílico del ácido gálico (b).

La tanasa juega un papel importante en la formación de los taninos complejos en las plantas, los cuales por definición son un grupo de compuestos fenólicos hidrosolubles con diferentes pesos moleculares, los cuales dependerán de los enlaces que posean con proteínas, polisacáridos (son ejemplos la celulosa y la pectina) y gelatina (Swain y Bate-Smith, 1962), por lo que los valores de dichos pesos varían entre 500 y 3000 g mol⁻¹; además, la tanasa está involucrada en la maduración de las frutas

debido a que desesterifica algunos ésteres formados a partir de los ácidos quebulínico, gálico y hexahidrofénico con la glucosa (Madhavakrishna y col., 1960).

Los taninos se clasifican en dos grandes grupos: los taninos hidrolizables y los condensados. El primer grupo involucra un alcohol polihídrico esterificado con ácido gálico o alguno de sus derivados, por lo que se clasifican en las familias de galotaninos y elagitaninos; el segundo grupo está formado por fenoles del tipo flavona conocidos como flavolanos (Nishira y Joslyn, 1968; García-Peña, 1996; Lekha y Lonsane, 1997). El contenido en azúcares y la disponibilidad como sustratos de la tanasa son dos diferencias entre los taninos hidrolizables y los condensados. Goodwin y Mercer (1983) reportaron que los taninos condensados no poseen residuos de azúcares, solamente son polímeros del flavan-3-ol o del flavan-3,4-diol (Lekha y Lonsane, 1997). Así también, George y Sen (1960) demostraron que la tanasa no actúa sobre este tipo de taninos, únicamente sobre los taninos hidrolizables.

La mayor parte de los trabajos relacionados con la enzima han considerado aspectos de producción, extracción, purificación y caracterización de la tanasa producida vía microbiológica, usando hongos filamentosos, principalmente del género *Aspergillus* a través de procesos de fermentación en medio líquido. La Tabla 1 muestra un resumen de los hallazgos más relevantes relacionados con la tanasa. En forma general, se puede establecer que la tanasa fúngica producida por cultivos líquidos se expresa en bajos títulos y se encuentra asociada a la biomasa del microorganismo lo que representan gastos adicionales en su proceso de producción debido a que las células microbianas deben romperse para la extracción de la enzima (Lekha y Lonsane, 1994).

Tabla 1. Resumen de los hallazgos históricos relacionados con la tanasa.

Evento	Referencia
Formación de ácido gálico por <i>P. glaucum</i> y <i>A. niger</i> , los cuales fueron capaces de crecer sobre ácido tánico	Teighem, 1867
El tanino se hidroliza por <i>A. niger</i> con una enzima llamada tanasa	Fernback, 1901
Estudio de propiedades de la tanasa y reporte de la inducibilidad de la misma	Pottevin, 1901
Purificación de la tanasa de <i>A. oryzae</i> producida sobre un medio de salvado de trigo	Kita, 1917
Reporte de las propiedades y de la especificidad de la reacción de la tanasa	Dykerhoff y Ambruster, 1933 Mikhlin y Gulkina, 1933 Thom y Raper, 1945
Uso de la tanasa en la producción de ácido gálico usando ácido tánico como sustrato en fermentación en estado sólido con <i>A. niger</i>	Fang, 1940
Purificación y cristalización de la tanasa de <i>Caesalpinia coriaria</i>	Madhavakrishna y Bose, 1961
Purificación y caracterización de la tanasa producida por <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> y <i>A. Oryzae</i>	Dhar y Bose, 1964 Yamada y col., 1968 libuchi y col., 1967
Detección y purificación de una tanasa de origen animal (bovino) a partir de la membrana mucosa del rumen y del intestino delgado de becerros	Begovic y Duzic, 1976 Begovic y Duzic, 1977
Producción de una tanasa producida por cepas bacterianas usando como sustrato la corteza de nogales	Deschamps y col., 1983
Purificación y caracterización de la tanasa producida por <i>P. chrysogenum</i>	Rajakumar y Nandy, 1983
Descripción de la esterificación del ácido gálico con una tanasa inmovilizada y otra soluble, usando diferentes alcoholes y dioles	Weetal 1985
Caracterización de la actividad tanasa en extractos de té	Thomas y Mutagh, 1985
Inmovilización de la tanasa en micelas inversas para la producción de propilgalato Identificación y purificación de 2 isoenzimas de la tanasa de <i>A. Oryzae</i>	Gathon y col., 1989 Beverini y Metche, 1990
Hidrólisis del ácido tánico a ácido gálico usando una tanasa fúngica inmovilizada en el mismo micelio	Barthomeuf y col., 1994
Estudio comparativo de los títulos de actividad tanasa y localización de la enzima producida por <i>A. niger</i> PKL 104 en fermentación líquida sumergida y superficial y en fermentación en estado sólido	Lekha y Lonsane, 1994
Purificación de epigallocatequina de un hidrolizado enzimático preparado con tanasa, usando cromatografía HSCC	Du y col., 1994

Continuación de la Tabla 1...

Optimización de la biosíntesis de la tanasa por <i>Rhizopus oryzae</i>	Hadi y col., 1994
Uso de la tanasa en la reducción de fitato en frijoles (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)	Gustafsson y Syberg, 1995
Selección de hongos productores de tanasa extracelular	Bradoo y col., 1996
Producción de tanasa por fermentación en medio sólido	Chatterjee y col., 1996
Optimización paramétrica y regulación bioquímica de la tanasa extracelular producida por <i>A. Japonicus</i>	Bradoo y col., 1997
Evaluación de la seguridad de una preparación enzimática de una tanasa derivada de <i>A. Oryzae</i>	Lane y col., 1997
Revisión crítica sobre la producción y aplicaciones de la tanasa	Lekha y Lonsane, 1997
Inducción de la tanasa en algunos miembros de <i>fungi imperfecti</i>	Bajpai y Patil, 1997

La tanasa puede obtenerse a partir de fuentes vegetales, animales y microbianas. En el caso de las fuentes vegetales, la enzima está presente en plantas con alto contenido de taninos, localizándose tanto en frutas, hojas, vainas, ramas y cortezas de árboles como el "konnam", "el mirabolano" y el "badúl" (Madhavakrishna y col., 1960; Pourrat, y col., 1985; Lekha y Lonsane, 1997). A partir de fuentes animales, la tanasa puede extraerse de la mucosa ruminal e intestino delgado de bovinos (Begovic y Duzic, 1976, 1977). Además, se ha reportado que algunos insectos producen la enzima durante el estado larvario (Nierenstein, 1930). La fuente más importante de la enzima es vía microbiana, debido a que las enzimas producidas son más estables que sus análogas obtenidas de otras fuentes (Lekha y Lonsane, 1997). Así también, los microorganismos pueden producirla en grandes cantidades de forma constante. Se conocen diversas patentes para la producción de la enzima y algunas aplicaciones de la misma. La Tabla 2 presenta una lista de patentes relacionadas con la tanasa.

La tanasa puede ser producida por bacterias de los géneros: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella* (Deschamps y col., 1983), por la enterobacteria, *Streptococcus bovis* (Osawa y Walsh, 1993) y por la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* (Skene y Brooker, 1995). Se acepta generalmente que las bacterias son organismos muy sensibles a la presencia del ácido tánico, pero las bacterias referidas fueron capaces de crecer sobre este compuesto y degradarlo. En el caso de las levaduras, Aoki y col., (1976) reportaron que una cepa del género *Candida* produjo la tanasa, siendo hasta el momento el único reporte publicado. Los hongos filamentosos son los microorganismos que más han sido estudiados, entre los que se incluyen especies de los géneros: *Ascochyta*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Trichothecium* y *Penicillium*, según lo reportado por Lekha y Lonsane (1997); adicionalmente, Bajpai y Patil (1996, 1997) también reportaron a los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*.

Tabla 2. Patentes publicadas sobre la producción y algunas aplicaciones de la tanasa

Tipo	Título	Número	Autores/Propietario/Año
I	Producción de tanasa por <i>Aspergillus</i>	Jpn.Pat.72,25,786	Y. Fumihiko y M. Kiyoshi, 1975
I	Manufactura de tanasa con <i>Aspergillus</i>	Jpn.Pat.62,272,973	S.Okamura (Kikkoman Corp.) y K. Yuasa (Inabata y Co.Ltd.), 1987
I	Elaboración por fermentación de la tanasa	Jpn.Pat.63,304,981	S.Okamura, K. Mizusawa, K. Takei, Y. Imai, y S. Ito (Kikkoman y Inabata), 1988
I	Proceso para la producción de la tanasa y su aplicación para la obtención de ácido gálico con <i>Aspergillus</i>	Eur.Pat.339,011	E. Vandamme, M. Jerome, A.Vermiera y M.Maria, 1989
II	Conversión de té verde usando tanasa y hojas de té naturales	U.S.Pat.3,812,266	G.Sanderson, N. Englewood, P.Coggon y N.Orangeburg, 1974.
II	Té soluble en agua fría	U.K.Pat.1,280,135	P.Coggon, H. Graham y G.Sanderson, 1975
II	Extracción de té en agua fría	Ger.Pat.2,610,533	P.Coggon, H. Graham, A. Hoefler y G. Sanderson (Unilever NV), 1976
II	Solubilización enzimática de crema de té	U.S.Pat.3,959,497	Y.Takino (Coca-Cola), 1976
II	Té	U.K.Pat.1,546,508	P.Coggon, H.Graham, A. Hoefler y G.Sanderson, 1979
II	Tratamiento enzimático de té negro	Eur.Pat.135,222	C.Tsai (Procter & Gamble), 1985

Nota: Tipo I: patentes de producción de tanasa por fermentación líquida
Tipo II: patentes de aplicaciones de la tanasa

Recientemente, Bajpai y Patil (1996, 1997) llevaron a cabo una serie de estudios comparativos relacionados con la producción de la enzima tanasa por varias especies fúngicas, encontrando que *F. solani*, *T. viride* y *A. fischerii* fueron mejores productores de la enzima que el hongo más ampliamente estudiado y caracterizado como el mejor productor de tanasa, *A. niger*. Hay que considerar que para usos industriales de producción de tanasa, los microorganismos seleccionados deben contar con el certificado de cepa GRAS (Generally Recognized as Safe).

Los pocos estudios relacionados con los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de la tanasa en los microorganismos han provocado que en la actualidad existan grandes controversias sobre este tópico. En un estudio pionero, Knudson (1913) reportó que la tanasa de *A. niger* se induce únicamente cuando el microorganismo crece en presencia de ácido tánico dando como productos finales de la hidrólisis el ácido gálico y la glucosa (Nishira y Mugibayashi, 1953). Esto no concuerda con lo reportado por Seiji y col, (1973) quienes mencionaron que la actividad tanasa de varias cepas fúngicas (incluyendo a *A. niger*) se expresa cuando el microorganismo crece únicamente sobre glucosa. Recientemente Bradoo y col., (1997) demostraron que la enzima tanasa producida por *A. japonicus* puede expresarse aún en ausencia del ácido tánico cuando el microorganismo se hace crecer sobre otros sustratos, tales como algunos monosacáridos, disacáridos, polisacáridos o incluso sobre peptona y caseína, considerando que la enzima se expresa de forma constitutiva. Estos niveles de actividad pueden ser considerados como los niveles basales de expresión, de los cuales depende que el microorganismo utilice eficientemente a los taninos hidrolizables como fuente de carbono y energía. Bajpai y Patil, (1997) reportaron que la tanasa producida por algunas especies de los géneros

Fusarium, *Trichoderma* y *Aspergillus* puede inducirse por diversos compuestos, tales como: pentagalactoglucosa, metil galato, ácido gálico y el pirogalol; ellos sugieren que la regulación de la tanasa no puede ser controlada por inhibición por retroalimentación, debido a que el ácido gálico es el producto final de muchos sustratos empleados como inductores de la actividad tanasa, ni tampoco por represión catabólica. Sobre estas aportaciones puede cuestionarse que el ácido gálico induzca la expresión de la actividad tanasa, debido a que dicha enzima por naturaleza es una esterasa, e incluso este ácido ha sido involucrado en el mecanismo de regulación de la actividad por producto final (Bradoo y col., 1997).

Por otra parte, también se ha cuestionado que el ácido tánico sea el inductor de la actividad tanasa, debido a que es una molécula de gran tamaño y muy reactiva, lo que implica que este compuesto no puede atravesar la membrana celular del microorganismo. Esto lleva a pensar que probablemente uno de los intermediarios formados sea en realidad el inductor de la actividad. Sobre este aspecto, Lekha y Lonsane (1997) proponen que la inducción de la tanasa se lleva a cabo de forma similar a la de las celulasas, en donde se requiere de ciertos niveles basales de la enzima, necesarios para iniciar la hidrólisis del sustrato y generar de esta forma al inductor de la síntesis de la enzima.

La producción a nivel comercial de la tanasa es a través de CML utilizando hongos filamentosos, en los cuales la enzima se expresa de forma intracelular. Beverini (1987) demostró que la enzima se encuentra inmovilizada en la pared celular de *A. oryzae*, por esta razón, es muy importante contar con un método de recuperación apropiado para extraer la enzima de forma activa. Algunos estudios han reportado que los procesos de extracción de la tanasa empleando proteínas hidrofílicas pueden favorecer el proceso de extracción (Golden y Hatton, 1987; Grovenco y Vergegehem., 1987; Yokoyama

y col., 1988). En adición, Yamada y col. (1968) reportaron que la tanasa de *Aspergillus sp* siempre se expresa de forma extracelular a bajos niveles y esta asociada al crecimiento (Doi y col, 1973).

Las condiciones generales para la producción de la tanasa por las especies del género *Aspergillus* en cultivos sumergidos son: temperatura de 30 a 33°C, pH de 4.5 a 5.8 y velocidad de agitación entre 160 y 250 rpm (Adachi y col., 1968; Doi y col., 1973; Rajakumar y Nandy, 1983; Lekha y Lonsane, 1994; Barthomeuf y col., 1994; Bajpai y Patil, 1997).

En 1994, Hadi y col. llevaron a cabo una serie de estudios de optimización de la biosíntesis de la tanasa usando una cepa de *R. oryzae* y encontraron una actividad de 6.12 U mL⁻¹ cuando el hongo se cultivó en un medio Czapek Dox con 2% de ácido tánico, 1% de glucosa, 0.05% de nitrato de sodio, un pH inicial de 5.0 y un periodo de incubación de 4 días. Otro estudio similar fue desarrollado por Bradoo y col., (1997) usando una cepa de *A. japonicus*, reportando que la tanasa se produce constitutivamente sobre azúcares simples y complejos, aunque los títulos se aumentan cuando se cultiva en presencia de ácido tánico. Dicho reporte involucró una optimización paramétrica que condujo a un incremento de 13% en la producción de la enzima a condiciones de 30°C, pH 6.6, con 0.2% de glucosa en un medio mínimo y ácido tánico al 1%. Adicionalmente, Bajpai y Patil (1997) estudiando a *F. solani*, *T. viride* y *A. fischerii* recomendaron el uso del metil galato como inductor además del empleo del ácido tánico para la producción a nivel industrial de la tanasa .

Por otra parte, es escasa la información disponible sobre la producción de la tanasa a través de otros procesos de producción. Un ejemplo de dichos procesos es el CMS (Lekha y Lonsane, 1994;

Chatterjee y col., 1996), sobre el cual se han reportado atractivas ventajas para la producción de la tanasa. En este tipo de cultivo la tanasa se produce a niveles mayores que los obtenidos en CML. Esto es importante si se consideran aspectos económicos. Además, se ha reportado que la tanasa producida por *A. niger* y *R. oryzae* en este sistema es estable en un rango amplio tanto de temperatura como de pH, lo que hace aún más atractivo el CMS para la producción de la tanasa. Sin embargo, es necesario la realización de más esfuerzos y de investigación aplicada para poder optimizar un proceso de producción de tanasa por este tipo de cultivo.

En general, se puede mencionar que para llevar a cabo la producción fúngica de la tanasa a nivel industrial reduciendo costos y siendo atractiva y factible, es necesario hacer estudios en diversas áreas de investigación alrededor de la enzima. Es necesario un entendimiento completo acerca de su regulación, de su capacidad catalítica, de su especificidad, de aspectos de producción óptima a nivel industrial, entre otros aspectos más. Adicionalmente, es necesario establecer las mejores condiciones para su producción, y de su comportamiento catalítico a través de un manejo adecuado de las condiciones de ensayo.



Una casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *13 Tapalapa*

Capítulo 4
Justificación

4. JUSTIFICACION

Los resultados obtenidos en diversos modelos enzimáticos de estudio por diversos autores sobre la capacidad del CMS para minimizar el fenómeno de represión catabólica se han asociado a diferentes factores medio-ambientales, los cuales influyen directamente en la fisiología del microorganismo (Ramesh y Lonsane, 1991; Solís-Pereira y col., 1993, Acuña-Argüelles y col., 1995, Lekha y Lonsane, 1994; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Taragano y Pilosof, 1999; Nandakumar y col., 1999; Romero-Gómez y col., 2000). Como se discutió en el capítulo anterior, en estos trabajos, no se han tomado en cuenta aspectos tan importantes tales como, los patrones de producción y las relaciones de inducción y represión catabólica, así como las tasas diferenciales de síntesis enzimática de los sistemas comparados. Además, en la actualidad es insuficiente el conocimiento para explicar las diferencias en los títulos de actividad enzimática alcanzados en CML y CMS.

Lo anterior es la base del presente trabajo, el cual considera que para poder establecer diferencias concretas al comparar sistemas de cultivo tan diferentes, primero se deben de establecer los patrones de producción de la enzima de interés en condiciones de inducción y de represión, de tal forma que permita sentar las bases suficientes para que en trabajos futuros se demuestren las causas que originan tales diferencias. Una vez que se haya establecido la influencia de los diferentes factores mencionados se deberá ejecutar la búsqueda experimental que lleve a encontrar las respuestas sobre las cuales se logre un mayor entendimiento sobre los altos títulos obtenidos en la producción de enzimática en la CMS.

Es importante señalar que, a diferencia de los trabajos citados sobre el tema, en el presente texto se indican diferencias en los patrones de producción de la síntesis enzimática considerando además la influencia que tiene la presencia de actividades proteolíticas que destruyen las enzimas inducidas y las diferencias en los coeficientes cinéticos en ambos sistemas de cultivo.

Para establecer las diferencias en los patrones de producción enzimática en CML y CMS, se utilizó como modelo de estudio la enzima tanasa producida por *Aspergillus niger* Aa-20 usando espuma de poliuretano como soporte inerte del CMS, el cual es un material poroso, capaz de retener grandes cantidades de medio líquido (Zhu y col., 1994) y que permite tener sistemas de cultivo homogéneos en donde se facilitan las determinaciones analíticas de las concentraciones de biomasa, sustrato y producto formado. Las diferencias encontradas en el presente estudio, se discuten en términos de coeficientes cinéticos y rendimientos, infiriendo de esta forma la generación o ausencia de condiciones de represión catabólica en los sistemas de producción enzimática evaluados, utilizando para ello al ácido tánico como fuente de carbono y energía, además como fuente de inductor de la actividad tanasa, además se utilizó la glucosa como fuente de carbono y energía y como molécula represora de la actividad tanasa.

La falta de experimentos dirigidos a detallar claramente la llamada "ausencia aparente de represión catabólica" en CMS y la manifestación tan clara de dicho fenómeno en CML cuando se produce la misma enzima en ambos sistemas de producción, justifican el presente trabajo, el cual pretende ser un estudio sistemático que permita explicar desde un punto de vista fisiológico las diferencias en los títulos de actividad enzimática en ambos sistemas de cultivo. Posteriormente, una vez establecidos los

aspectos fisiológicos se podrán abordar en otros estudios aspectos tales como los relacionados a los fenómenos de difusión de los nutrientes, de oxígeno y de los productos,

También el trabajo reúne información entorno al modelo enzimático seleccionado, la tanasa, especialmente sobre sus aspectos de producción en cepas fúngicas. Cabe adicionar, que la tanasa no se encuentra como producto purificado en el mercado industrial de enzimas y que los extractos que se comercializan se caracterizan por ser altamente inestables. El interés en seleccionarlo como modelo de estudio se relacionó además a la evaluación de los aspectos que influyen directamente en la inestabilidad de tales extractos. De tal forma que, con la información generada en este estudio se abran nuevas líneas de investigación sobre la tanasa y así a la generación de conocimientos que permitan una optimización en la producción de la enzima y su posterior comercialización en forma purificada o en extractos cuya actividad enzimática sea estable.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

Capítulo 5
Hipótesis

5. HIPÓTESIS

- La productividad de tanasa de *Aspergillus niger* será mayor en cultivo en medio sólido que en cultivo en medio líquido.
- Estas diferencias en productividades se deberá principalmente a mejores condiciones de inducción y represión.
- La mayor tasa de destrucción de tanasa en cultivo en medio líquido se debe a un aumento de la proteólisis.
- *Aspergillus niger* es más resistente a la inhibición por exceso de glucosa en cultivo en medio sólido que en cultivo en medio líquido.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

Capítulo 6

Objetivos

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la producción de tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20 en cultivos en medios líquido y sólido bajo condiciones de inducción y represión.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un modelo experimental que permita evaluar la producción de tanasa fúngica bajo condiciones de inducción y represión en cultivo en medio sólido, usando como soporte espuma de poliuretano y compararlos con los obtenidos en cultivo líquido.
- Determinar el efecto del incremento en las concentraciones de inductor (ácido tánico) y represor (glucosa) en la producción de la tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20 en cultivos en medios líquido y sólido.
- Evaluar la presencia de actividades proteolíticas en los extractos enzimáticos de la tanasa obtenidos del CML y del CMS para definir si son tales actividades las responsables de la inestabilidad de dichos extractos obtenidos por CML.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

Capítulo 7
Materiales y Métodos

7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MICROORGANISMO UTILIZADO

En todos los experimentos se usó la cepa de *Aspergillus niger* Aa-20 (colección IRD-UAMI), caracterizada por crecer en medios con altas concentraciones de ácido tánico y con alta producción de la enzima tanasa (Ramírez, 2000).

7.1.1 Conservación del microorganismo

Las esporas de *A. niger* Aa-20, fueron almacenadas a -20°C en tubos crio-protectores (conservación a largo plazo usando el "bead storage system", Technical Service Consultants Limited) y en tubos eppendorff (conservación a mediano plazo, usando una mezcla de glicerol al 10% - leche descremada al 8.5%).

7.2 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SOPORTE

Para llevar a cabo los cultivos en medio sólido, se utilizó como soporte la espuma de poliuretano (PUF). La selección del soporte incluyó cuatro tipos de PUF (Expomex, México), a los cuales se les analizó el grado de retención de agua (capacidad de absorción en gramos de agua por gramo de PUF) y el porcentaje de humedad al máximo grado de retención de agua. El PUF seleccionado fue aquél conocido comercialmente como Super Firme 20-24, el cual se caracterizó a través de un análisis estructural y un análisis microscópico para medir el tamaño de pared y de porosidad. Los resultados obtenidos se presentan en el apéndice II.

7.3 MEDIOS DE CULTIVO

El medio de propagación de la cepa fue el agar papa dextrosa (PDA) distribuido y solidificado en matraces erlenmeyer de 250 mL, el cual se inoculó con esporas de *A. niger* Aa-20 y se incubó por 5 días a 30°C. El medio de cultivo utilizado para la producción de la tanasa reportado previamente por Lekha y Lonsane (1994) y codificado como Medio 1 (Tabla 3), fue modificado en la fuente de nitrógeno por el efecto en el pH que tiene el sulfato de amonio al disociarse (Medio 2). Para su preparación el medio se esterilizó a 121°C por 15 minutos. El ácido tánico se esterilizó por filtración en membranas de nylon (0.45 μm) y se adicionó al medio de cultivo estéril hasta alcanzar la concentración deseada.

En el estudio de inducción, diferentes soluciones de ácido tánico (Sigma, U.S.A) fueron esterilizadas por filtración y adicionadas a una concentración final de 12.5, 25, 50 y 100 gL^{-1} . Además, en el CMS se adicionó una concentración final de 160 gL^{-1} .

En el estudio de represión (resultados en la sección 8.2), se preparó el medio de cultivo a una concentración de 25 gL^{-1} de ácido tánico y se complementó con diferentes concentraciones de glucosa (6.25, 12.5, 25 y 50 gL^{-1} para el CML y de 6.25 a 200 gL^{-1} para el CMS). Adicionalmente, en CML también se estudió el efecto del ácido gálico como única fuente de carbono sobre la síntesis de la tanasa, usando una única concentración de 25 gL^{-1} .

Tanto en el estudio de inducción y represión de la producción de la tanasa de *A. niger* Aa-20, los niveles de actividad enzimática considerados como basales fueron obtenidos en cultivos donde la única fuente de carbono y energía fue glucosa a una concentración inicial de 30 gL^{-1} .

Tabla 3. Medios de cultivo para la producción de tanasa fúngica

Componente	Medio 1 (g.L ⁻¹)*	Medio 2 (g.L ⁻¹)**
KH ₂ PO ₄	1.0	4.38
NH ₄ NO ₃	2.0	
(NH ₄) ₂ SO ₄		8.76
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	0.88
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.02	0.088
MnCl ₂ .6H ₂ O	0.004	0.018
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.002	0.0088
FeSO ₄ .2H ₂ O	0.0025	0.012
Acido tánico	20.0	0 a 100 g.L ⁻¹ (CML) 0 a 160 g.L ⁻¹ (CMS)
Glucosa		0 a 50 g.L ⁻¹ (CML) 0 a 200 g.L ⁻¹ (CMS)

* Medio reportado por Lekha y Lonsane (1994)

** La concentración de sales corresponde a aquella utilizada en la preparación de un medio a una concentración al 25 g.L⁻¹ de ácido tánico. Sin embargo, la composición del medio cambia en función de las concentraciones de glucosa y ácido tánico para mantener la relación de nutrientes constante.

7.4 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se inocularon 50 mL de agar papa dextrosa (contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL), con esporas de *A. niger* Aa-20, éstos se incubaron a 30°C por 5 días y las esporas producidas se cosecharon con una solución de Tween 80 al 0.01% y se contaron en una cámara de Neubauer.

7.5 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO (CML)

Los matraces Erlenmeyer (250 mL) conteniendo 50 mL del medio de cultivo a un pH inicial de 5.5, se inocularon con 2.5 mL de la suspensión de esporas (2×10^7 esporas por mL de suspensión) y se incubaron a 30°C por 48 h usando una agitación de 220 rpm. La biomasa se separó por filtración en papel Whatman No. 41. El caldo de cultivo libre de células fue utilizado como extracto enzimático crudo.

El micelio se lavó tres veces con solución salina, se congeló con nitrógeno líquido, se maceró en un mortero y el pulverizado se resuspendió con una solución amortiguadora de acetatos (200 mM, pH 5.5). Los restos celulares se removieron por centrifugación y el sobrenadante resultante se utilizó como extracto de la enzima tanasa asociada al micelio (la cual fue considerada como una actividad intracelular, por desconocer su localización en la célula).

7. 6 CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO (CMS)

El CMS se llevó a cabo usando PUF 20-24 de baja densidad ($240 \text{ g(m}^3)^{-1}$) como soporte absorbente del medio líquido. La espuma se preparó siguiendo la técnica reportada por Zhu y col., (1994), y se pulverizó en un molino de plásticos (Brabender® OHG Duisburg). Los reactores tubulares (reactores de vidrio de 25 x 180 mm) se empacaron con 10 g del material inoculado (2×10^7 esporas g^{-1} de PUF). Las condiciones de cultivo fueron: 30°C, aireación de 20 mL min^{-1} ; pH inicial de 5.5, humedad inicial de 65% y, un tiempo de incubación de 48 h. Para obtener los extractos enzimáticos, 5 g del material fermentado se mezclaron con agua destilada (1:10 p/v) y se agitaron en vortex por 1 min. Las partículas sólidas se filtraron (Whatman 41), y el filtrado claro se utilizó como extracto enzimático extracelular. Los sólidos retenidos se lavaron tres veces con 50 mL de solución fisiológica. El extracto enzimático intracelular se obtuvo al congelar el material sólido lavado con nitrógeno líquido, y se recuperó de la forma descrita para el extracto de la tanasa asociada al micelio proveniente del CML. Para establecer un criterio de comparación entre el CML y el CMS, todas las evaluaciones analíticas realizadas (i.e biomasa) se definen en g L^{-1} considerando como base de cálculo, el volumen de agua en el medio de cultivo.

7.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

7.7.1 Contenido de ácido tánico

La concentración de ácido tánico fue evaluada a través de la técnica de fenol-sulfúrico para azúcares totales, usando como estándar para preparar la curva patrón, ácido tánico (grado: polvo amarillo, SIGMA) en un rango de concentraciones de 0 a 2 gL⁻¹. El análisis consistió en adicionar un mL del extracto crudo a un tubo de ensayo en baño de hielo; posteriormente se adicionaron 2 mL del reactivo fenol-sulfúrico (1 gL⁻¹) lentamente por las paredes del tubo, éste se agitó en el baño de hielo y se llevó a baño maría en ebullición por 5 minutos. Finalmente se enfriaron las muestras a temperatura ambiente y se leyó su absorbancia a una $\lambda = 480$ nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV160 A). La concentración de ácido tánico se obtuvo al corregir el valor obtenido, restando el contenido de glucosa en la muestra.

7.7.2 Contenido de glucosa

Para evaluar la concentración de glucosa tanto en los cultivos como en los ensayos de difusión de dicha molécula, se empleó un Kit enzimático para glucosa (Cod. 1001191, Spinreact, España).

7.7.3 Contenido de ácido gálico

La concentración de ácido gálico se evaluó por cromatografía de líquidos (Cromatografo Thermostepration Products), utilizando una bomba Constametric 3200, un Integrador Lctalk HPLC software. Jeringa Hamilton (100 μ L), sonicador Branson 2200. Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Columna: Spherisorb ODS2 5 μ L

Fase móvil: metanol : ácido fórmico 1% (5 : 95)

Velocidad de flujo: 1.5 mL min⁻¹

Volumen de inyección: 20 µL

Detector: Spectromonitor 5000 (Thermoseparation Products)

Para poder cuantificar la concentración de ácido gálico, el área obtenida en el cromatograma se leyó en una curva patrón de referencia.

7.7.4 Ensayo de la actividad tanasa

La actividad tanasa, tanto extracelular como la asociada al micelio, se ensayó usando el método propuesto por Beverini y Metche (1990), el cual fue seleccionado después de hacer una comparación entre 5 métodos reportados en la literatura y uno modificado en nuestro laboratorio; dicha comparación fue publicada en la revista *Brazilian Archives in Biology and Technology*, 1999, Vol. 42, pp. 355-361. Los resultados obtenidos de la comparación pueden consultarse en el apéndice I. Una unidad enzimática tanasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de ácido gálico por mL por minuto. El método consiste en hacer reaccionar 50 µL de extracto enzimático con una solución de ácido tánico (1 mL a una concentración de 0.5 gL⁻¹) por 30 min; la reacción se detiene al adicionar 200 µL de ácido clorhídrico 2 M. La mezcla de reacción se filtra en membranas de nylon y se inyecta al HPLC. El estándar fue ácido gálico (Sigma, USA) con el que se construyó la curva patrón de 0 a 1 gL⁻¹.

7.7.5 Ensayo de la actividad proteasa

La actividad proteasa se ensayó usando el método espectrofotométrico modificado de Dosoretz y col.,

(1990). Una unidad proteasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de molécula azo colorante del sustrato, el cual produce un cambio de absorbancia ($\lambda = 520 \text{ nm}$) de 0.001 por mL por minuto.

7.7.6 Estimación de la biomasa fúngica

El contenido de la biomasa formada en el CML se determinó por gravimetría (peso seco). Debido a las dificultades que presenta la estimación de la biomasa formada en el CMS (problemas con la separación de la masa celular e interferencias con los reactivos utilizados), ésta se estimó usando el método indirecto reportado por Córdova y col., (1996) el cual se basa en estimar la concentración de proteína con el microensayo de Bradford (Bio-Rad®). Este método, evalúa solamente la proteína presente en el micelio, pues bajo las condiciones de hidrólisis, la proteína contenida en las esporas no se extrae. El método consiste básicamente en una hidrólisis ácida-térmica de la pared celular. Una porción de 0.2 g de material húmedo fermentado se colocó en un tubo de ensayo, al cual se le adicionaron 5 mL de ácido fosfórico 150 mM y se calentó en baño maría a ebullición por 7 minutos. La muestra se centrifugó y el líquido sobrenadante fue utilizado para evaluar el contenido de proteína por el microensayo de Bradford. La absorbancia de la muestra se leyó a 595 nm y el contenido de biomasa se calculó a partir de una curva patrón construida al graficar Abs-595nm vs concentración de biomasa.

7.7.7 pH

El pH de los cultivos tanto líquidos como sólidos se evaluó directamente en los extractos crudos obtenidos para ensayar la actividad tanasa extracelular, usando un potenciómetro Conductronic pH 20.

7.7.8 Actividad de agua (Aw)

La Aw de las muestras del CMS se evaluó usando el equipo aquaLab (Decagon).

7.7.9 Contenido de Humedad

El contenido de humedad de las muestras del CMS se evaluó, colocando un gramo del material fermentado en las charolas de la termobalanza OHAUS (Mod. 6010), usando una potencia de 5 watts y un tiempo de secado de 30 minutos (suficiente para alcanzar un peso constante).

7.7.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los valores medios son los reportados. Adicionalmente, se usó el análisis de varianza, la prueba de comparación de medias de Tukey y la prueba de t para evaluar los resultados obtenidos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InStat para Macintosh (versión 2.03, 1994 Graphpad Software).

7.8 RELACIÓN DE INDUCCIÓN Y REPRESIÓN ($R_{I/R}$)

Considerando la inducción enzimática como un incremento de la actividad tanasa producida por *A. niger* Aa-20, provocado por la presencia de un inductor, y la represión como el cese en la producción de tal actividad por la presencia de glucosa en ambos sistemas de cultivo, el nivel de inducción y represión en la producción de tanasa por *A. niger* Aa-20 se calculó usando la siguiente ecuación:

$$R_{I/R} = \frac{A.T.}{A.T.B.} \quad (1)$$

Donde: $R_{I/R}$ es la relación de inducción-represión que considera los niveles de actividad tanasa producidos en presencia de inductor (y glucosa en el caso del estudio de represión) en relación, a los niveles de actividad producidos en ausencia del inductor. A.T. corresponde a los niveles de actividad tanasa producida en presencia de ácido tánico (estudio de inducción) y de glucosa y ácido tánico (estudio de represión). A.T.B. corresponde a los niveles de la actividad tanasa obtenida de un cultivo con glucosa como única fuente de carbono y energía. Es importante aclarar que a diferencia de los estudios de inducción en los que se adicionan pulsos de la solución de inductor (y/o represor) al caldo de cultivo, los estudios de inducción y represión que aquí se presentan, se efectuaron durante la etapa del crecimiento exponencial del microorganismo, añadiendo el inductor (y/o represor) desde el inicio del cultivo.

7.9 COEFICIENTES CINÉTICOS

Los parámetros cinéticos usando en este trabajo fueron estimados de la siguiente forma:

7.9.1 Parámetros cinéticos de crecimiento

La producción de biomasa, estimada como X (gL^{-1}), fue modelada con la ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[1 - \frac{X}{X_{\max}} \right] X \quad (2)$$

Donde, μ , es la máxima tasa específica de crecimiento, y X_{\max} , es el valor de equilibrio para X donde, $dX/dt = 0$. La solución de la ecuación (2) es la siguiente:

$$X = \frac{X_{\max}}{\left[1 + \frac{(X_{\max} - X_0)}{X_0} e^{-\mu t} \right]} \quad (3)$$

Siendo, X_0 , el valor de X , cuando, $t = 0$.

7.9.2 Parámetros cinéticos de producción de tanasa

La producción de la enzima tanasa, E (UL^{-1}), fue estimada de acuerdo al modelo de Luedeking y Piret (1959):

$$\frac{dE}{dt} = Y_{E/X} \frac{dX}{dt} + kX \quad (4)$$

Donde, $Y_{E/X}$ (Ug^{-1}), es el coeficiente de rendimiento de producción y se definió como UI de tanasa por gramo de X . k , ($Uh^{-1}g^{-1}$), es similar a β (constante de proporcionalidad definida en los antecedentes) y fue considerada como el coeficiente secundario de la producción ($k > 0$) o destrucción enzimática ($k < 0$). La solución de la ecuación (4) $E = E(X)$, es dada por la siguiente ecuación:

$$E = E_0 + Y_{E/X} (X - X_0) + \frac{kX_{max}}{\mu} \ln \left[\frac{(X_{max} - X_0)}{(X - X_0)} \right] \quad (5)$$

Siendo, E_0 , el valor de E , cuando, $X = X_0$. La evolución de, $E = E(t)$, puede ser estimada por la inserción de $X(t)$ obtenida de la ecuación (3) en la ecuación (5).

Para estimar los parámetros cinéticos μ , X_{max} , k y $Y_{E/X}$ de las ecuaciones 3 y 5, $X(t)$ y $E(t)$, se utilizó el procedimiento Solver de Microsoft Excel. El algoritmo minimizó la suma de los errores al cuadrado, comparando los datos experimentales con los valores teóricos dados por la ecuación. Es importante señalar que para estimar la producción de la enzima tanasa a través del modelo de Luedeking y Piret (1959), los valores de $Y_{E/X}$ utilizados, fueron también estimados y resueltos por el mismo procedimiento,

ya que también, éstos fueron calculados por la correlación lineal entre la actividad tanasa y la biomasa formada y posteriormente utilizados para discutir la sección 8.2 de Resultados y Discusiones.

Conociendo los valores las constantes ya definidas μ y $Y_{E/X}$, se puede estimar a velocidad específica de formación de la enzima, definida como q_P , la cual se calculó de la siguiente forma:

$$q_P = \mu Y_{E/X} \quad (6)$$

Además, también se puede conocer la velocidad específica del consumo de sustrato, definida como q_S , y calculada de la siguiente forma:

$$q_S = \mu / Y_{X/S} \quad (7)$$

donde el rendimiento biomasa sustrato, $Y_{X/S}$, se estimó de la correlación lineal entre los valores de la concentración de ácido tánico y biomasa respectivamente..

La productividad, P , fue definida para cada, $t > 0$, como $E(t)/t$, teniendo el valor de referencia, P_R , definido en la ecuación (8) y, $P_{\max} = [E(t)/t]_{\max}$, como el valor máximo de la productividad observada para cada corrida experimental.

$$P_R = \mu Y_{E/X} X_{\max} \quad (8)$$

7.10 PRESENCIA DE ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS

Tanto en los cultivos sólidos y líquidos que involucraron el uso de ácido tánico como única fuente de carbono, se llevaron a cabo análisis de la actividad proteolítica, debido al comportamiento cinético de

producción de la tanasa. Dado que en CML, la actividad proteolítica fue siempre mucho mayor, se evaluó la producción de las enzimas tanasa y proteasa en presencia de un inhibidor de proteasas, para lo cual se llevaron a cabo una serie de cultivos, empleando una concentración inicial de ácido tánico de 12.5 gL^{-1} . Un volumen de $10 \mu\text{L}$ del inhibidor (No. p-8215. Sigma, USA) se adicionó a las 10 h del cultivo, el cual se monitoreó durante 48 h.

Debido a que no se detectó actividad proteasa en los extractos enzimáticos de los CMS se evaluó el efecto de diferentes relaciones carbono/nitrógeno (C/N) en la producción de las actividades tanasa y proteasa. Las relaciones C/N evaluadas fueron 4.5 y 11.1. En este experimento, se usaron glucosa y ácido tánico como fuentes de carbono a una concentración inicial de 25 gL^{-1} en ambos casos. Las actividades enzimáticas se ensayaron a las 0 y 48 h del cultivo.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

Capítulo 8

Resultados y Discusión

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 PERFILES DE CRECIMIENTO Y DE PRODUCCIÓN DE TANASA EN CML Y CMS

El estudio cinético del efecto de la glucosa y el ácido tánico a diferentes concentraciones sobre el crecimiento y la producción de la tanasa de *A. niger* Aa-20 en CML y CMS ha sido enviado para su publicación en el *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Apéndice I). Además, la sección correspondiente a la influencia de la fuente de carbono sobre la tanasa producida por *A. niger* Aa-20 en CMS ha sido publicada en el capítulo 44 del libro *Coffee Biotechnology and Quality* editado por la compañía editorial holandesa Kluwer Academic Publishers-Dordrecht (Apéndice I). A continuación se presentan los resultados obtenidos con el uso de ácido tánico y posteriormente con la glucosa y ácido tánico.

8.1.1 Efecto de la concentración del ácido tánico

La tanasa ha sido reportada como una enzima inducible por ácido tánico, cuando éste es utilizado como una única fuente de carbono (Aoki y col., 1976; Lekha y Lonsane, 1994; Yamada y col., 1967), además, se ha reportado que la concentración adecuada para su producción varía entre 0.1 a 10% (Aoki y col., 1976; Lekha y Lonsane, 1997). En el presente estudio, el crecimiento de *A. niger* Aa-20 y la producción de la tanasa fueron evaluados en CML y CMS con diferentes concentraciones iniciales de ácido tánico ($S_0 = 12.5, 25, 50$ y $100, \text{gL}^{-1}$). Las cinéticas de crecimiento de *A. niger* Aa-20 en CML y CMS se presentan en la Figura 2. En CML, el incremento en la concentración inicial de ácido tánico a 50gL^{-1} favoreció un mayor crecimiento de *A. niger* Aa-20, sin embargo, una concentración inicial de 100gL^{-1} afectó significativamente ($\alpha=0.05$) el crecimiento del microorganismo, probablemente por un efecto de

inhibición, lo cual se sugiere dada la tendencia que presentó el valor de μ y X_{\max} en función de la concentración inicial de ácido tánico (Tabla 4).

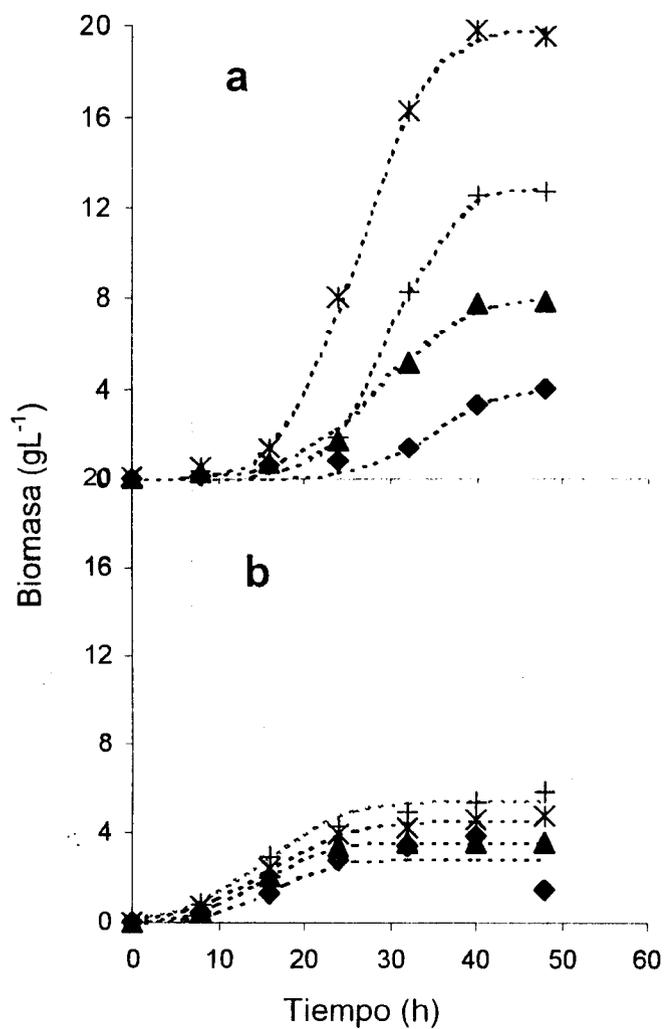


Figura 2. Cinética de crecimiento de *A. niger* Aa-20 en CML (a) y CMS (b) con ácido tánico a diferentes concentraciones de ácido tánico: 12.5 (♦), 25 (▲), 50 (*) y 100 gL⁻¹ (+). La línea continua son valores estimados con la ecuación logística.

Por el contrario, en CMS el incremento en la concentración inicial de ácido tánico de 12.5 a 100 gL⁻¹ favoreció el crecimiento de *A. niger* Aa-20, incluso este fue más rápido que en CML, aunque los valores obtenidos para X_{max} fueron menores. Los valores obtenidos de μ en ambos sistemas de cultivo concuerdan con los reportados por Romero-Gómez y col. (2000), sin embargo, los valores de X_{max} fueron totalmente diferentes, lo cual puede estar fuertemente influenciado por el tipo de sustrato empleado, ya que ellos usaron sacarosa como inductor de la invertasa, un compuesto de mayor fácil asimilación que el ácido tánico, el cual ha sido considerado como agente antibacteriano.

Tabla 4. Valores de la biomasa máxima (X_{max}) y de la tasa específica de crecimiento (μ) en el cultivo de *A. niger* Aa-20 usando diferentes concentraciones de ácido tánico en CML y CMS.

So (gL ⁻¹)	CML		CMS	
	Xmax (gL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Xmax (gL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
12.5	3.5	0.13	3.9	0.29
25.0	7.9	0.23	4.1	0.29
50.0	19.7	0.25	4.7	0.22
100.0	12.5	0.15	5.5	0.22
160.0	ND	ND	5.9	ND

ND: no determinada.

De forma similar a lo reportado por Romero-Gómez y col. (2000), en CMS el crecimiento del microorganismo, se da en micelio (como enredadera) sobre las trabéculas del poliuretano, teniendo grandes espacios libres, lo que sugiere que el cultivo no está limitado por la transferencia de oxígeno como en el caso del CML (Marsh y col., 1998), tal como se da en CML, ya que sobre este sistema de cultivo el crecimiento se da en forma de "pellets".

La cinética de producción de la actividad tanasa extra e intracelular en CML se muestra en la Figura 3. Los valores máximos de ambas actividades aumentaron con el incremento en el contenido de ácido tánico y los valores de actividad máxima correspondientes a la actividad extracelular fueron hasta casi 10 veces mayores ($2,500 \text{ UL}^{-1}$) en comparación con los obtenidos de la actividad intracelular (250 UL^{-1}).

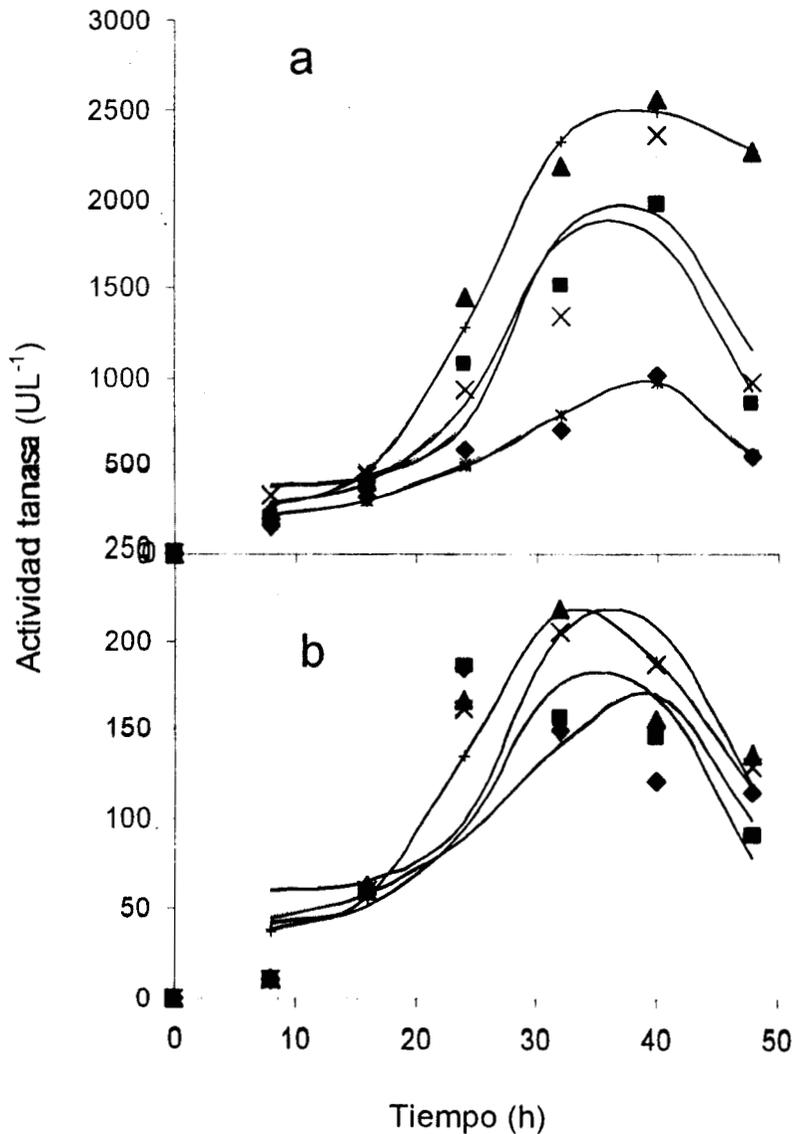


Figura 3. Producción de la tanasa extracelular (a) e intracelular (b) por *A. niger* Aa-20 en CML usando concentraciones iniciales de ácido tánico de 12.5 (◆), 25.0 (■), 50.0 (▲) y 100.0 (x) gL⁻¹. Las líneas son los valores obtenidos con el modelo de Luedeking y Piret.

El efecto del incremento en los niveles de la concentración inicial de ácido tánico sobre los valores máximos de actividad intracelular no fue tan pronunciado como el observado en la actividad extracelular. La relación de actividad tanasa extra/intracelular varió de 8 a 16 y los valores máximos de actividad extracelular fueron alcanzados después de lograr la máxima expresión de la actividad intracelular, lo cual está claramente relacionado a un modelo secuencial de síntesis y excreción de esta enzima. Lekha y Lonsane (1997), reportaron que la concentración inicial de ácido tánico afectó los niveles de la enzima y, dependiendo del microorganismo y la cantidad de tanasa producida, los tiempos de cultivo varían entre 1 y 10 días. En el presente trabajo, la actividad tanasa máxima se alcanzó con 50 gL⁻¹ después de 40 h de cultivo.

Las cinéticas de actividad tanasa extra e intracelular producida en CMS se presenta en la Figura 4. El perfil de producción obtenido en CMS fue claramente diferente al obtenido en CML, dado que no se obtuvieron valores máximos definidos en ninguno de los dos casos (extra e intracelularmente, Figura 4a y 4b).

Las actividades máximas de la tanasa se detectaron al final de cada fermentación y éstas fueron al menos 2.5 veces mayores que las obtenidas en CML. Los valores máximos de actividad tanto extra como intracelular fueron obtenidos por CMS con la más alta concentración de ácido tánico (100 gL⁻¹). Los perfiles de actividad tanasa extracelular fueron similares para las concentraciones iniciales de ácido tánico de 12.5 a 50 gL⁻¹, pero, la actividad tanasa intracelular se incrementó considerablemente cuando se emplearon concentraciones de 50 a 100 gL⁻¹ de ácido tánico.

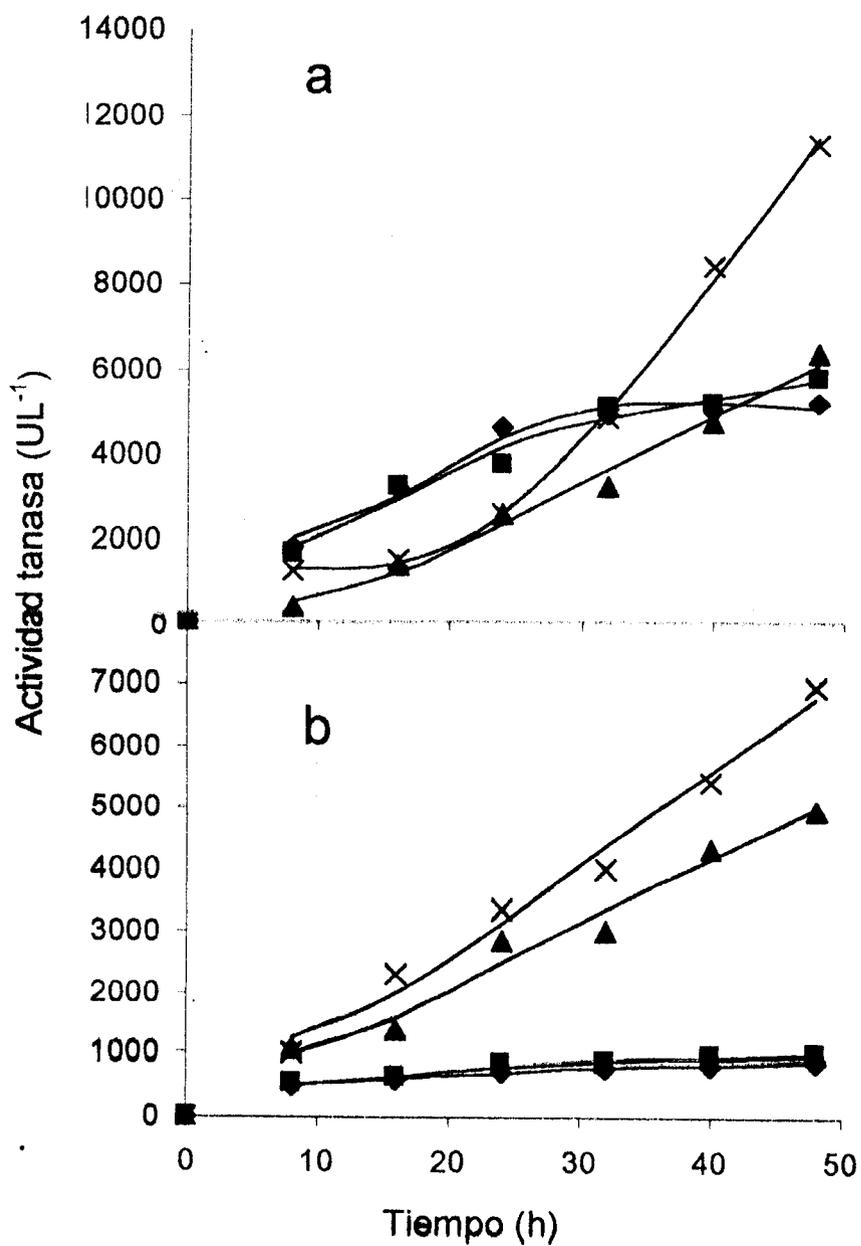


Figura 4. Producción de tanasa extracelular (a) e intracelular (b) de *A. niger* Aa-20 en CMS con diferentes concentraciones de ácido tánico: 12.5 (◆), 25.0 (■), 50.0 (▲) y 100.0 (X) gL⁻¹. Las líneas son los valores obtenidos con el modelo de Luedeking y Piret.

A bajas concentraciones iniciales de ácido tánico (inferiores a 50 gL^{-1}), la relación de actividad extra/intracelular fue de alrededor de 6, mientras que a concentraciones iniciales mayores a 50 gL^{-1} de ácido tánico dicha relación fue de alrededor de 1 – 1.5. Aunque la actividad tanasa extracelular fue mayor que la actividad intracelular para las cuatro concentraciones de ácido tánico evaluadas, se observó que la excreción de la enzima en CMS se ve favorecida a bajas concentraciones de ácido tánico. En CML se demostró lo contrario, es decir la relación de actividad tanasa extra/intracelular se obtuvo con una concentración inicial de ácido tánico de 50 gL^{-1} . Además, en los experimentos de CMS, la actividad e la tanasa no decreció al final del cultivo, como ocurrió en CML.

Tanto la actividad tanasa extracelular como la intracelular del CML (Figura 3) y del CMS (Figura 4) siguieron el modelo de Luedeking y Piret (1959) con valores negativos de la constante k para el CML y positivos para el CMS (Figura 5). En CML, los valores negativos de k , que indican el grado de asociación del producto al crecimiento microbiano, fueron asociados a las tasas de destrucción de la tanasa en el medio de cultivo, mientras que el incremento en la actividad tanasa en función del concentración inicial de ácido tánico en CMS, coincidió con los valores positivos de la constante k , obtenida al graficar k vs S_0 (Figura 5).

Es importante mencionar que el análisis cinético que involucra el uso del modelo de Luedeking y Piret (1959) nos permite clasificar el comportamiento de los sistemas evaluados para producir la enzima tanasa en función del grado de proporcionalidad o asociación del producto al crecimiento, pero además, al conocer el valor de la constante k es posible predecir estados de producción o destrucción de la enzima en el sistema, es decir, si los valores de k son menores a cero, el sistema tendrá una curva de fermentación convexa, indicando una tasa específica secundaria de descomposición de la enzima que

puede relacionar la tasa de producción asociada al crecimiento vegetativo (q_p). Este factor será responsable de la presencia de valores máximos a lo largo del tiempo de fermentación. Por otro lado, dicho procedimiento es capaz de demostrar lo contrario, es decir, si una tasa secundaria de producción ($k > 0$), la curva será convexa pero sin valores máximos definidos.

Desde el punto de vista de la productividad un valor positivo de k ayuda a identificar las condiciones de fermentación en las cuales la actividad de la enzima excretada será estable en el caldo de cultivo, lo que tal vez será un factor significativo para una mejor productividad enzimática.

Las diferencias encontradas en los perfiles de producción de la tanasa en CMS y CML pueden ser atribuidas, en parte, a la presencia de actividades proteolíticas en CML (datos presentados en la sección 8.3). Al respecto, Bradoo y col., (1997) reportaron dicho decremento de la actividad tanasa fúngica al final del proceso de CML que ellos evaluaron. Hadi y col., (1994) también observaron tal decremento, y asumieron que este comportamiento era provocado por una limitación de sustrato, por la presencia de sustancias tóxicas en el medio de cultivo o por los bajos valores de pH al final del cultivo. Sin embargo, esta última observación puede rechazarse si se consideran los estudios de estabilidad llevados a cabo por Beverini y Metche (1990) sobre la actividad tanasa de *A. niger*, la cual fue estable a valores de pH entre 3.5 y 5.5. En el presente caso, el pH más bajo del medio de cultivo fue de 3.9. Así, el decremento en la actividad tanasa en el sistema de CML (Figura 3) puede relacionarse a la presencia de proteasas, ya que esto se presenta en las etapas finales del cultivo donde se presenta una limitación de sustrato tal como lo sugirieron Hadi y col., (1994). Esto también concuerda con el hecho de que la actividad tanasa intracelular decrece en tiempos previos a la disminución de la actividad extracelular.

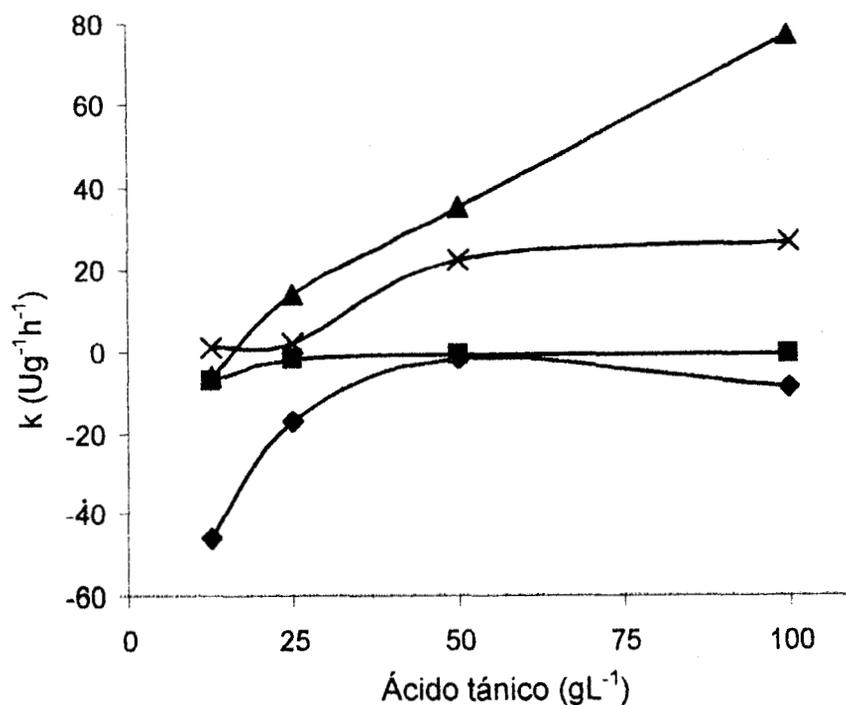


Figura 5. Valores de la constante k de la tanasa extracelular e intracelular producida por *A. niger* Aa-20 en CML Y CMS a diferentes concentraciones iniciales de ácido tánico. Actividad extra (◆) e intracelular (■) en CML y actividad extra (▲) e intracelular (X) en CMS.

La productividad máxima de tanasa, P_{max} , estimada por unidad de medio de cultivo ($U \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$), fue significativamente mas alta en CMS que en CML (Tabla 5). Es importante señalar que el valor de referencia de productividad ($P_R = q_P X_{max}$) mostró un comportamiento similar a P_{max} , aunque los valores entre ambas productividades fueron diferentes en un orden de magnitud, debido principalmente a los ajustes que se hacen en el calculo del rendimiento Y_{EX} , a través de la ecuación de Luedeking y Piret, que se ve fuertemente influenciado por los valores de k . La similitud en el comportamiento entre ambos valores (P_R y P_{max}) apoya el hecho de tener una productividad intrínseca de tanasa mayor en CMS. Dicho nivel de productividad no puede ser atribuido únicamente al hecho de que la tanasa es más

estable, sino porque está es producida a una velocidad específica mayor, q_p , con mayores rendimientos, $Y_{E/X}$, en el CMS (Tabla 6), aunque los niveles de biomasa máximos, X_{max} , fueron similares en ambos tipos de cultivo (Tabla 5). En CMS la productividad de tanasa máxima, P_{max} , o P_R , fueron de 2.7 a 6 veces mayores que las obtenidas por CML. Tales diferencias se incrementaron con el aumento de la concentración inicial de ácido tánico (Tabla 6).

Tabla 5. Valores de Productividad de tanasa máxima observados y calculados a diferentes concentraciones iniciales de ácido tánico.

S_0 (gL^{-1})	$P_R=q_p X_{max}$		P_{max} (observada)	
	U $h^{-1}L^{-1}$		CML	CMS
12.5	491	1751	28	127
25	934	1959	52	141
50	1234	2424	68	235
100	607	4107	63	381
Promedio	816.35	2560.20	52.75	221.00
Desv. Est.	335.55	1069.09	17.80	116.95
P	< 0.05		< 0.05	

Los resultados obtenidos para el rendimiento $Y_{E/X}$ en ambos sistemas de cultivo concuerdan con los reportados por Romero-Gómez y col., (2000), quienes indicaron que ciertas cepas fúngicas presentan mejor adaptación sobre el CMS tal como lo habían indicado Shankaranand y col. (1992) y Antier y col., (1993).

Al comparar los resultados obtenidos en CMS y CML, es claro que el uso de altas concentraciones de ácido tánico resultó en una mayor eficiencia de conversión de sustrato a producto, alcanzando una

productividad superior (al menos 3.7 veces) de tanasa en CMS. Esto también puede asociarse a una mayor velocidad de consumo de ácido tánico. Tal comportamiento indica que el CMS es un proceso mucho más productivo para la actividad tanasa, en comparación con el CML. Además, en CMS, la capacidad de degradación de ácido tánico por *A. niger* Aa-20 fue muy alta y más rápida para todas las concentraciones iniciales de ácido tánico evaluadas (por encima de 70%) y los valores de q_s fueron hasta 5 veces mayores en CMS que en CML. Sin embargo, en CML, la degradación total de ácido tánico fue mayor a 90% para concentraciones iniciales menores a 50 gL⁻¹ y de alrededor de 50% para concentraciones superiores (100 gL⁻¹). Esto sugiere que el sistema de CMS puede representar un medio para la remoción de compuestos polifenólicos (tales como los taninos), de las aguas residuales contaminadas con dichas moléculas.

Tabla 6. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos como valores máximos durante el crecimiento de *A. niger* Aa-20 en CML y CMS con ácido tánico como única fuente de carbono.

Sistema	Ácido tánico (gL ⁻¹)	q_s' (*)	q_p' (**)	Y_{EX} (Ug ⁻¹)	Consumo de sustrato (%)
CML	12.5	0.37	100	739	92
	25.0	0.68	110	507	94
	50.0	0.59	60	250	93
	100.0	0.52	50	320	54
CMS	12.5	0.94	460	1599	100
	25.0	1.81	490	1665	100
	50.0	2.44	550	2475	100
	100.0	2.93	730	3382	73

Nota:

Las unidades son: Productividad de tanasa $P = \text{IUL} \cdot \text{h}^{-1}$, velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) = $\text{gSg} \cdot \text{h}^{-1}$. Además, (*) velocidad específica de consumo de sustrato; $q_s' = \mu Y_{XS}^{-1} \text{gSg} \cdot \text{h}^{-1}$ y (**) velocidad específica de formación de producto (q_p) = $\mu Y_{EX} \text{Ug} \cdot \text{h}^{-1}$.

Cabe señalar que los altos niveles de ácido tánico empleados, involucran un suplemento significativo de productos que pueden participar directamente en el control de la expresión de tal enzima, dichos compuestos son la glucosa y el ácido gálico. La glucosa está involucrada en el fenómeno de represión catabólica y el ácido gálico, ha sido relacionado al mecanismo de represión por producto final. Bajpai y Patil (1997), reportaron que el ácido gálico no está involucrado en el mecanismo de regulación de la tanasa, mientras que Bradoo y col., (1997) publicaron que dicho compuesto actúa como un represor por producto final tanto en condiciones inducidas como constitutivamente. Sin embargo, los roles exactos que juegan tanto la glucosa como el ácido gálico son aún desconocidos.

8.1.2 Efecto de la concentración de glucosa

Lekha y Lonsane (1997) reportaron que la tanasa producida por *A. niger* PKL104 no fue afectada por la presencia de fuentes de carbono de fácil asimilación. Por su parte, Fumihiko y Kiyoshi (1975) reportaron que es posible el uso de fuentes de carbono adicionales, tipo glucosa (1%) y sacarosa (3%) con ácido tánico para la producción de tanasa por *A. oryzae*. En este trabajo, la producción de la enzima por *A. niger* Aa-20 se estudió en CML y CMS con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (6.25, 12.5, 25, 50 y 200 gL⁻¹) en presencia de una concentración inicial fija de ácido tánico, $S_0 = 25$ gL⁻¹.

Las cinéticas de crecimiento de *A. niger* Aa-20 en CML y CMS se presentan en las figuras 6a y 6b, donde se observa que el crecimiento inicial fue similar en ambos cultivos, siendo dependiente de la concentración de glucosa adicionada. A diferencia de los experimentos en los que se empleó únicamente ácido tánico, los niveles máximos de biomasa fueron muy similares en cada uno de los sistemas de fermentación, aunque la biomasa aparente estimada por el contenido de proteína (en CMS), disminuyó después de 20 h, pero cabe aclarar que esto de ninguna manera implica que el

crecimiento haya cesado, sino que durante la etapa de esporulación se presenta un proceso de translocación de la proteína intracelular del citoplasma a la espora, tal como lo reportaron Córdova y col (1996), de tal forma que, bajo las condiciones de ensayo en la cuantificación de la biomasa en CMS, no es posible extraer la proteína de las esporas. Por lo tanto, los valores estimados de X con la ecuación logística (línea continua) solo se presentan en las fases lag y de crecimiento exponencial.

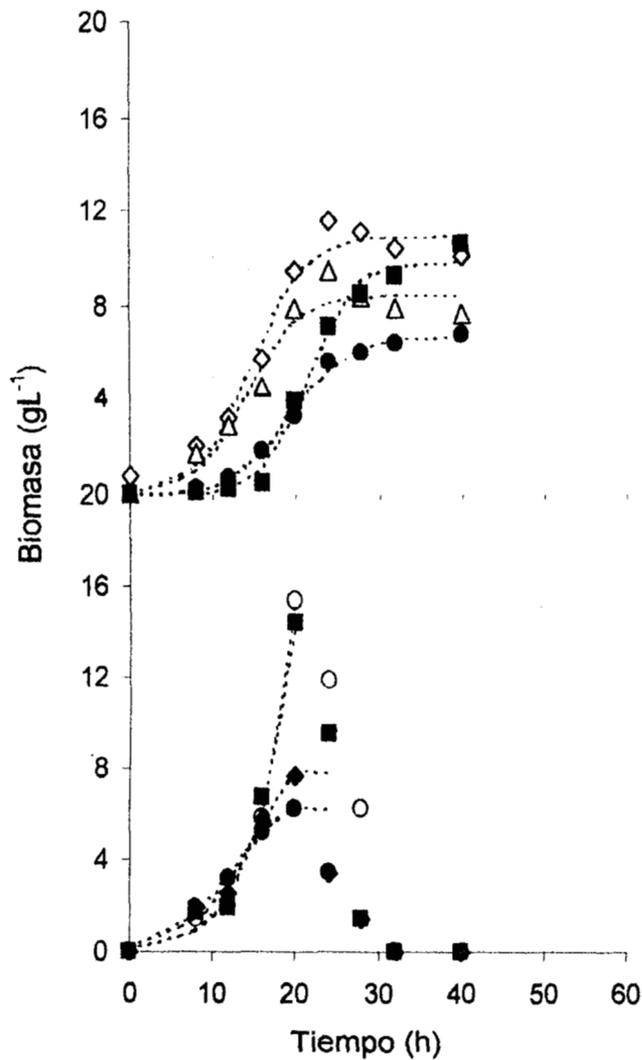


Figura 6. Cinética de crecimiento de *A. niger* Aa-20 en CML (a) y CMS (b) con ácido tánico y concentraciones de glucosa de: 6.25 (◆), 12.5 (◇), 25 (△), 50 (■) y 200 gL⁻¹ (○). La línea continua son valores estimados con la ecuación logística.

En la Tabla 7 se presentan los valores de X_{\max} y μ en CML y CMS usando una concentración fija de ácido tánico (25 gL^{-1}) y diferentes niveles iniciales de glucosa. En CML la adición de glucosa y el incremento en su concentración afectaron positivamente los valores de X_{\max} y μ en comparación con los valores obtenidos sin glucosa para la misma concentración inicial de ácido tánico (Tabla 4). Esto se explica porque la glucosa es una fuente de carbono de más fácil asimilación que el ácido tánico.

Tabla 7. Valores de la biomasa máxima (X_{\max}) y de la tasa específica de crecimiento (μ) en el cultivo de *A. niger* Aa-20 usando diferentes concentraciones de glucosa y 25 gL^{-1} de ácido tánico en CML y CMS.

Go (gL^{-1})	CML		CMS	
	X_{\max} (gL^{-1})	μ (h^{-1})	X_{\max} (gL^{-1})	μ (h^{-1})
6.25	5.7	0.31	6.2	0.14
12.5	11.6	0.30	7.7	0.15
25.0	9.5	0.30	ND	ND
50.0	7.1	0.45	14.4	0.24
200.0	ND	ND	15.3	0.24

ND: no determinada.

En CMS, el valor de X_{\max} se incrementó para todas las concentraciones iniciales de glucosa evaluadas con respecto al valor obtenido sin glucosa (4.1 gL^{-1}) como se indica en la Tabla 4. Además, con la adición de glucosa, el crecimiento máximo se alcanzó 12 horas antes que en los experimentos sin glucosa (alrededor de las 20 horas). Estos resultados no concuerdan con los reportados por Favela-Torres y col., (1996) y Romero-Gómez y col., (2000) quienes mencionan que en CMS la máxima acumulación de biomasa se alcanza entre las 40 y 60 horas para niveles de azúcar ente 50 y 100 gL^{-1} . Sin embargo, esto puede ser explicado por las diferencias en el modelo experimental, ya que en este

estudio se emplearon reactores tubulares empacados con espuma de poliuretano impregnada de medio de cultivo, aireados y una cepa adaptada a ácido tánico, capaz de degradar hasta 200 gL⁻¹ de dicha fuente de carbono (Ramírez, 2000). Por otro lado, la adición de glucosa a bajas concentraciones (6.25 y 12.5 gL⁻¹) afectó negativamente el valor de μ (hasta 2 veces) y no hubo cambios importantes en el valor de este parámetro, cuando se emplearon concentraciones de 50 y 200 gL⁻¹. Cabe hacer notar que los resultados en CMS son cuestionables por los problemas para evaluar la biomasa por el contenido de proteína, sin embargo, éstos concuerdan con los reportados por Romero-Gómez y col., (2000), quienes demostraron que *A. niger* en CMS, produce una mayor cantidad de biomasa que en CML, probablemente debido a una mejor adaptación, tal como lo reportó Antier y col., 1993.

Las cinéticas de producción de la tanasa extra e intracelular en CML se presentan en las figuras 7a y 7b respectivamente. El perfil de producción de las actividades extra e intracelulares con pequeñas cantidades de glucosa ($G_0 = 6.25 \text{ gL}^{-1}$) fue similar al perfil observado sin glucosa (Figuras 3a y 3b), esto es, los valores máximos de actividad disminuyen con incrementos en la actividad de G_0 , pero de forma inversa a la relación de actividad máxima intra/extracelular, dado que ahora el nivel de actividad intracelular fue cercano a 2.5 veces el valor de la actividad extracelular.

El valor máximo de la actividad extracelular con $G_0 = 100 \text{ gL}^{-1}$ fue menor a 100 UL⁻¹. En CMS, la adición de glucosa permitió identificar valores máximos tanto de la actividad extra (Figura 8a) como intracelular (Figura 8b), sin embargo, la actividad tanasa extracelular alcanzada con un nivel de $G_0 = 100 \text{ gL}^{-1}$, fue más bajo de 1,500 UL⁻¹, sugiriendo una resistencia considerable a la represión catabólica (Ramesh y Lonsane, 1991). En adición, estos resultados concuerdan con la idea de que el sistema de CMS es más atractivo que el sistema de CML de acuerdo al fenómeno de represión catabólica, y en

materia, dicho sistema resulta ser más productivo en una amplia variedad de mezclas de sustratos (Romero-Gómez y col., 2000).

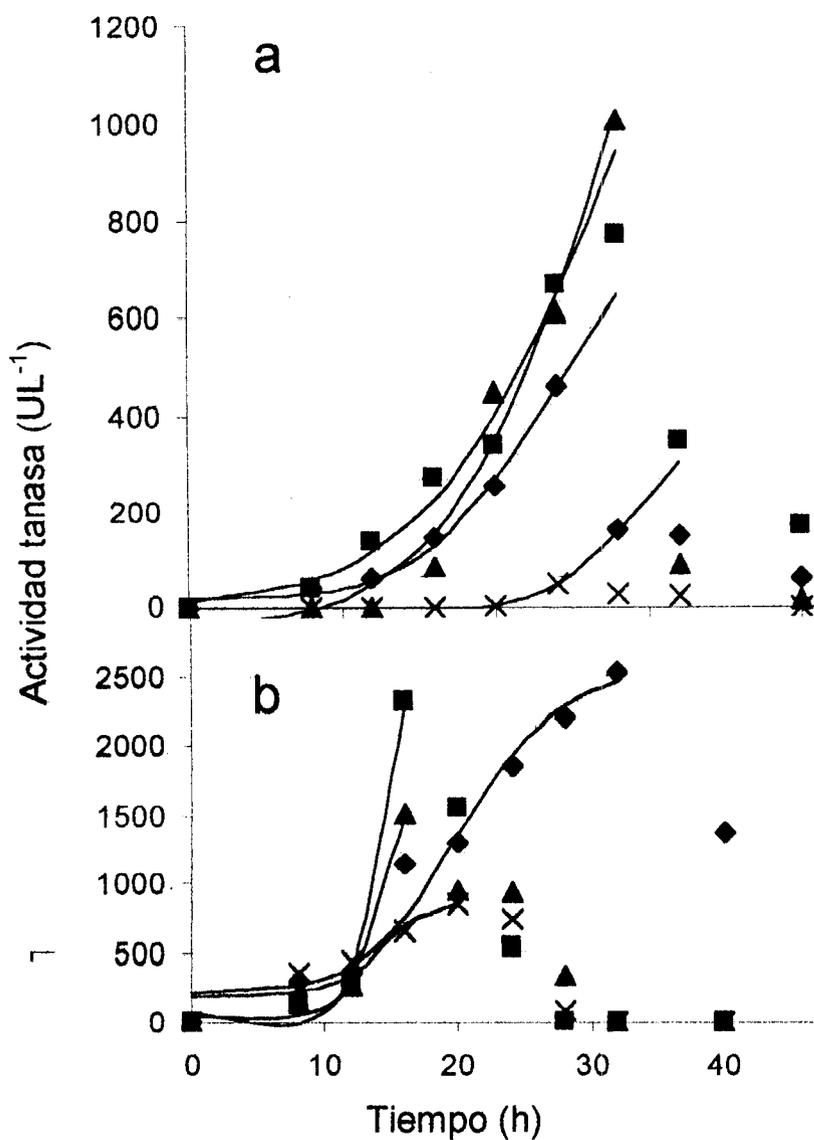


Figura 7. Producción de tanasa extracelular (a) e intracelular (b) por *A. niger* Aa-20 en CML con 25 gL⁻¹ de ácido tánico y concentraciones de glucosa de 6.25 (◆), 12.5 (■), 25 (▲) y 50 (X) gL⁻¹. Las líneas son los valores obtenidos con el modelo de Luedeking y Piret.

En CMS con ácido tánico como única fuente de carbono, la producción de tanasa no decreció al final del cultivo. Sin embargo, cuando se añadió glucosa al medio, la producción de tanasa disminuyó. En este caso, estos resultados pueden ser explicados parcialmente por el hecho de que el medio sufrió cambios importantes en su relación carbono/nitrógeno al incrementar la concentración inicial de glucosa. En este sistema de cultivo, los títulos de actividad enzimática fueron mayores al compararlos con los obtenidos en CML.

En CMS, resulta difícil explicar los ajustes entre los valores experimentales y los valores estimados con la ecuación de Luedeking y Piret, sobre todo a altas concentraciones iniciales de glucosa. Además, se deben de tener en cuenta los perfiles de crecimiento que se obtienen a través de una medición indirecta de la biomasa, tal como es el caso de la evaluación del contenido de proteína y que afectan la estimación de la tanasa. Por esta razón, y con el fin de tener criterios de comparación, la producción de la tanasa extra e intracelular en CML y CMS (Figuras 7 y 8) solo se estimó en tiempos de cultivo menores a los experimentalmente evaluados.

Es importante establecer que los diversos estudios en los cuales los títulos de actividad enzimática alcanzado en CMS y CML han sido comparados, se reportan resultados similares (Solís-Pereira y col., 1993; Lekha y Lonsane, 1994; George y col., 1997; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Romero-Gómez y col., 2000). En todos los casos, los títulos de actividad enzimática fueron mayores en CMS que en CML. Como ya se mencionó en el capítulo 3, algunas teorías han sido propuestas para explicar este comportamiento, sin embargo en la actualidad, solamente dos han sido experimentalmente presentadas. En dichos trabajos se demuestran cambios en la composición de ácidos grasos en la membrana celular (Maldonado y Strasser de Saad, 1998) y la relación existente entre la biomasa

producida y los títulos de actividad alcanzados (Romero-Gómez y col., 2000), sin embargo, es necesario llevar a cabo investigaciones que permitan explicar a detalle tal comportamiento.

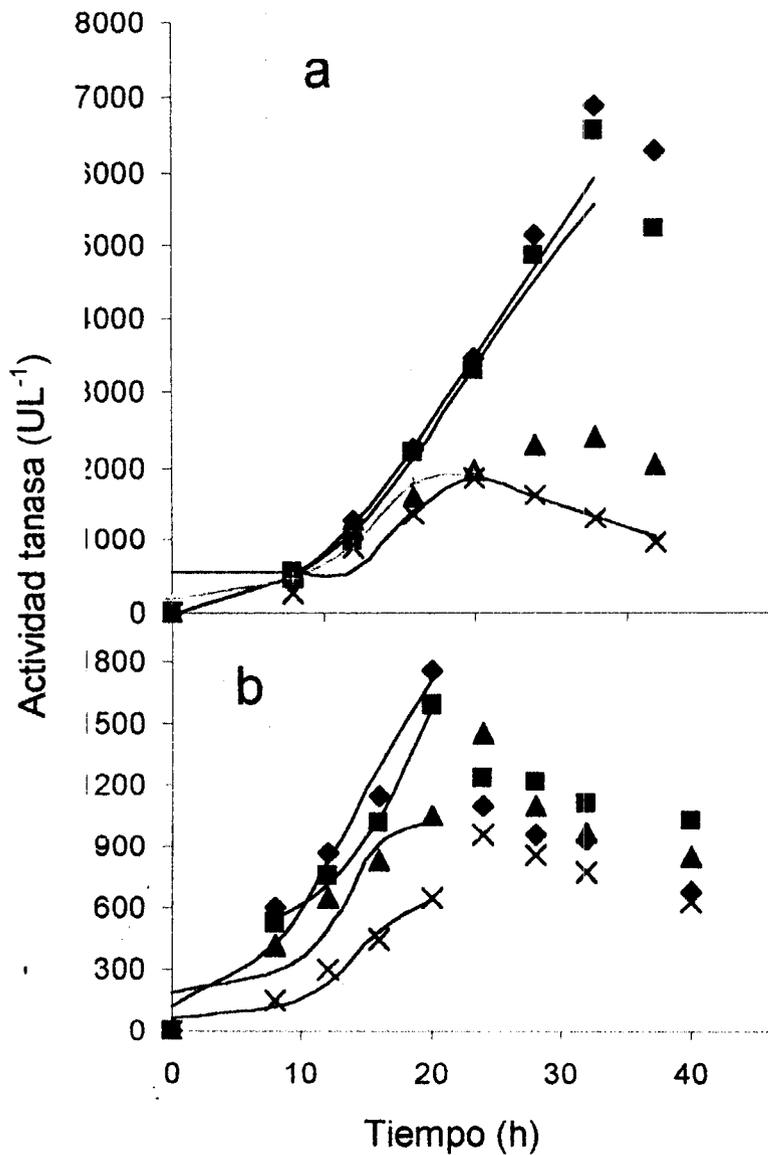


Figura 8. Producción de tanasa extracelular (a) e intracelular (b) por *A. niger* Aa20 en CMS con 25 gL⁻¹ de ácido tánico y concentraciones de glucosa de 6.25 (◆), 12.5 (■), 50.0 (▲) y 200.0 (X) gL⁻¹. Las líneas son los valores obtenidos con el modelo de Luedeking y Piret.

En CML, los valores de P_R y P_{max} se incrementaron con el aumento en los niveles iniciales de glucosa de 6.25 a 12.5 gL⁻¹, sin embargo niveles más altos redujeron el valor de ambas productividades (Tabla 8). Es importante señalar que tanto en CML como en CMS los valores de P_R y P_{max} mostraron una relación de forma similar al encontrado en los experimentos con ácido tánico (Tabla 5). Cuando se añadió glucosa a diferentes concentraciones al CMS, los valores de P_R y P_{max} fueron de 0.3 a 1.3 y de 1.5 a 3.7 veces mayores que en CML, respectivamente. Incluso con el nivel más alto de glucosa (200 gL⁻¹ "condiciones de represión de la tanasa") el valor de la productividad (P_{max}), fue mayor (108 Uh⁻¹L⁻¹) que la obtenida bajo las mejores condiciones de producción evaluada en CML con ácido tánico (68 Uh⁻¹L⁻¹) y ligeramente menor que en CML con ácido tánico y glucosa a 12.5 gL⁻¹ (161 Uh⁻¹L⁻¹). Además, si se toman en cuenta los niveles de X_{max} alcanzados y se comparan los valores de μ en ambos sistemas de cultivo (Tabla 7), resulta claro que las diferencias en las productividades máximas en CMS están fuertemente influenciadas por los valores de $Y_{E/X}$ (Tabla 8). Dicha observación complementa de forma clara que en este estudio las diferencias en los títulos de actividad enzimática se deben a que *A. niger* Aa-20 produce más enzima por unidad de biomasa, en comparación con lo reportado por Romero-Gómez y col., (2000).

Los valores de q_s aumentaron en comparación con aquellos obtenidos sin glucosa, y tomando en cuenta que ésta es una molécula es más fácilmente asimilada por el microorganismo que el ácido tánico, es evidente que el porcentaje de absorción de ácido tánico disminuyera de 67% a 3% al incrementar la concentración inicial de glucosa.

En forma general, en CMS la adición de glucosa provocó una disminución significativa en los valores de los parámetros cinéticos con respecto a aquellos obtenidos sin glucosa. Además, la capacidad de

degradación de ácido tánico fue seriamente afectada. Los resultados de los experimentos con glucosa y ácido tánico muestran que la velocidad de consumo de sustrato (q_s) fue de 3 a 5 veces mas alta en CMS que en CML. La concentración de ácido tánico requerida para inhibir el crecimiento fúngico fue mucho más elevada en CMS que la requerida en CML. Esto podría atribuirse a diferencias en la difusión de nutrientes presentes en el medio, lo que provocaría cambios en los mecanismos de regulación de la biosíntesis de la enzima. Al comparar los parámetros cinéticos obtenidos tanto en CMS como en CML, el primero de ellos resulta ser un proceso mucho más atractivo para la producción de la tanasa, teniendo como condición la ausencia de glucosa del medio de cultivo. En CML, la adición de glucosa por encima de 25 gL^{-1} resulta en una fuerte condición de represión catabólica.

Tabla 8. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos como los valores máximos durante el Crecimiento de *A. niger* Aa-20 en CML y CMS con glucosa en presencia de ácido tánico.

Sistema	Glucosa (gL^{-1})	$P_R = q_p X_{\text{max}}$	P_{max}	q_s' (*)	q_p' (**)	$Y_{E/X}$ (Ug^{-1})	Consumo de ácido tánico (%)
CML	6.25	650	83	0.95	160	374	67
	12.5	1851	161	0.48	80	532	62
	25.0	518	99	0.86	90	180	46
	50.0	463	42	1.63	120	144	3
CMS	6.25	664	280	0.55	130	797	61
	12.5	711	277	0.43	70	617	46
	50.0	610	156	0.39	30	177	27
	200.0	543	108	0.41	20	150	0

Nota:

Las unidades son: Productividad de tanasa $P = \text{IUL}^{-1}\text{h}^{-1}$, velocidad específica de consumo de sustrato (q_s)= $\text{gSgx}^{-1}\text{h}^{-1}$. Además, (*) velocidad específica de consumo de sustrato; $q_s' = \mu Y_{X/S}^{-1} \text{ gSgx}^{-1}\text{h}^{-1}$ y (**) velocidad específica de formación de producto (q_p)= $\mu Y_{E/X} \text{ Ug}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Por otro lado, la evaluación de la velocidad específica de formación de producto (q_p), aunado al valor de biomasa máxima (X_{max}) ayuda a distinguir entre una productividad basada únicamente en el hecho de la capacidad de la cepa para producir el metabolito de interés (altos valores de q_p) o simplemente porque la biomasa es producida en grandes cantidades (altos valores de X_{max}). Aparentemente, en este estudio, la síntesis y excreción de la tanasa en CMS son procesos más favorecidos que en el CML, ambos aspectos son importantes, porque en ese sistema se generó una menor cantidad de biomasa en comparación con el CML cuando se empleó únicamente ácido tánico, lo que implica que dicha biomasa es mucho más productiva. Sin embargo, cuando se utilizó glucosa se obtuvieron resultados similares a los reportados recientemente por Romero-Gómez y col., (2000), quienes han mostrado que tres cepas de *A. niger* crecidas sobre espuma de poliuretano produjeron mayores niveles de invertasa porque crecieron a niveles mayores que los obtenidos en CML y no porque el q_p haya sido mucho más alto en CMS que en CML.

Lo anterior implica que hay razones para asumir que las diferencias entre CMS y CML pueden deberse a varios factores, entre los que podemos mencionar, por ejemplo, los resultados presentados por Romero-Gómez y col., (2000) están fuertemente influenciados por las condiciones de ensayo, es decir, ellos emplearon una densidad de espuma de poliuretano diez veces menor, que la usada en este trabajo, y esto representa un arreglo estérico micelar diferente, además también es lógico pensar que variarán las tasas de difusión de los gases (Auria y col., 1993). En adición, ellos emplearon un reactor de lecho no aireado, lo que representa también una causa para exhibir un comportamiento fisiológico muy diferente.

Adicionalmente, resulta interesante hacer notar que los valores de productividad obtenidos en ambos sistemas de cultivo, están fuertemente influenciados por la geometría de crecimiento de *A.niger* Aa-20. en forma de "pellets" en CML y de micelio "enredado" sobre el soporte en CMS, tal como lo reportó Romero-Gómez (2001). Laukevics y col., (1985) reportaron que el mezclado en CML impide la formación de gradientes de sustrato, lo que ocasiona un crecimiento en forma de "pellets", donde se presentan bajas concentraciones de oxígeno en el interior, incluso llegan a ser zonas anóxicas donde se reducen los rendimientos de los productos de interés (Pirt, 1972). Sobre el CMS, Laukevics y col., (1985) reportaron que los hongos filamentosos crecen en forma de micelio difuso sobre el soporte, sobre el cual el microorganismo tiende a llenar los espacios libres ocupados por la fase gaseosa, limitando así la difusión del oxígeno. Sin embargo, bajo las condiciones evaluadas en el presente estudio, esto no sucedió, ya que los tiempos de cultivo fueron muy cortos, por lo tanto, la limitación la limitación por oxígeno en el CML puede explicar parcialmente las diferencias en los títulos de actividad tanasa alcanzados en comparación con aquellos obtenidos en CMS.

En torno a la producción de la enzima tanasa, los resultados aquí presentados ayudan a aclarar porqué ésta ha sido un proceso difícil de desarrollar en sistemas de CML (Ganga y col., 1978, Lekha y Lonsane, 1994 y 1997; Pourrat y col., 1985). Dichos trabajos consideran como factor crítico en la producción de dicha enzima, la naturaleza intracelular de la tanasa. Ahora bien, considerando el hecho de que la tanasa es una enzima fúngica conocida desde hace más de un siglo y que existe un considerable número de patentes para su aplicación en la industria de alimentos, los resultados aquí obtenidos, demostraron picos máximos de actividad bien definidos en CML, hecho que no fue observado en CMS., lo que lleva a considerar que más que la naturaleza intracelular de la enzima, la presencia de proteasas en CML es un factor crítico para obtener extractos estables de la enzima.

8.2 PATRONES DE PRODUCCIÓN DE LA TANASA EN CML Y CMS

Dado que no existe al momento alguna demostración experimental que evidencie las causas por las que en CMS se obtienen títulos de actividad enzimática mayores que en CML, resulta de mucho interés una descripción precisa del fenómeno antes de tratar de explicar las posibles causas. En este sentido, se planteó el establecimiento de los patrones de producción de la tanasa usando como molécula inductora al ácido tánico y como molécula represora a la glucosa. Además se compararon los rendimientos de tanasa/biomasa y se evaluó el rol del ácido gálico como inductor de la actividad tanasa. Esta sección del trabajo ha sido aceptada en la revista *Process Biochemistry* (Apéndice I).

La Figura 9 presenta los valores de la relación de inducción enzimática ($R_{I/R}$) obtenidos con ácido tánico (como fuente de inductor y única fuente de carbono) a diferentes concentraciones iniciales en CML y en CMS. *A. niger* Aa-20 produjo diferentes títulos de actividad enzimática tanasa tanto de forma extracelular (símbolos vacíos) como de forma intracelular (símbolos llenos). Claramente, los valores de $R_{I/R}$ fueron mucho menores en CML (cuadros) que en CMS (círculos), pero en ambos casos, la curva de $R_{I/R}$ fue convexa con respecto a S_0 , mostrando un valor máximo de 4 en CML y un valor asintótico aproximado a 17 en CMS. Los valores de $R_{I/R}$ de la tanasa extracelular fueron proporcionales a los valores de la tanasa intracelular tanto en CML como en CMS. Bajpai y Patil (1997) reportaron una relación de inducción de 26.7 en la enzima tanasa de *A. fischerii* cuando emplearon como inductor al galotanino en CML.

Es importante mencionar que los valores de $R_{I/R}$ se obtuvieron en un tiempo de 20 horas y cuando el microorganismo se encontraba en la etapa de crecimiento exponencial. Además se considero que aquellos valores superiores al nivel basal de la enzima (línea punteada) correspondían a valores de

actividad inducida. El patrón de producción de la enzima obtenido en CML, se encuentra en parte fuertemente influenciado por el efecto inhibitorio que provocó el ácido tánico sobre el crecimiento de *A. niger* Aa-20 y además, puede asumirse que la presencia de proteasas no es un factor crítico en la obtención de dichos patrones de producción, por el tiempo bajo el cual se calculó la $R_{I/R}$.

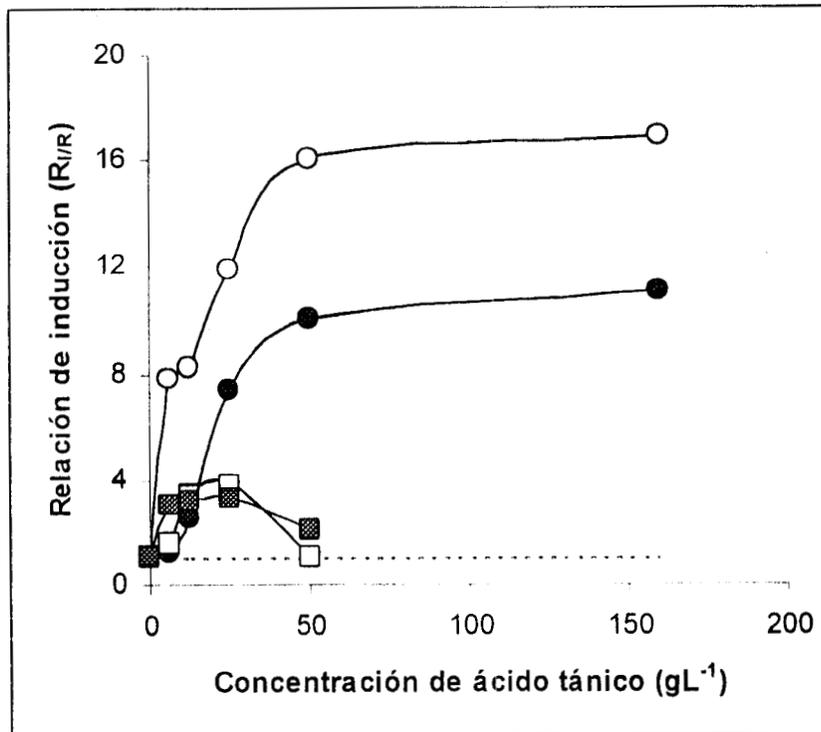


Figura 9. Patrones de inducción de la tanasa. Actividad intracelular (●) y extracelular (○) producida en CMS. Actividad intracelular (■) y extracelular (□) producida en CML. La línea punteada representa el nivel basal de la actividad tanasa.

Los resultados obtenidos en la Figura 9 concuerdan con algunos parámetros cinéticos reportados en las tablas 4, 5 y 6, particularmente con una clara correlación con los valores de las productividades, con el rendimiento enzimático ($Y_{E/X}$) y con la tasa de crecimiento específico (μ), aunque es importante remarcar que los valores máximos de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$) fueron mayores en CML que en CMS.

Los experimentos de represión de la tanasa (Figura 10) se llevaron a cabo usando una concentración inicial de 25 gL^{-1} de ácido tánico como inductor y diferentes concentraciones de glucosa como un potencial represor catabólico. El valor de la concentración de ácido tánico se seleccionó en función de que a este nivel, los valores de $R_{I/R}$ fueron más altos que la unidad tanto en CML como en CMS. Además, a esta concentración de ácido tánico se tienen los pocos reportes de producción de tanasa en CMS (Lekha y Lonsane, 1994; Chatterjee y col., 1996)

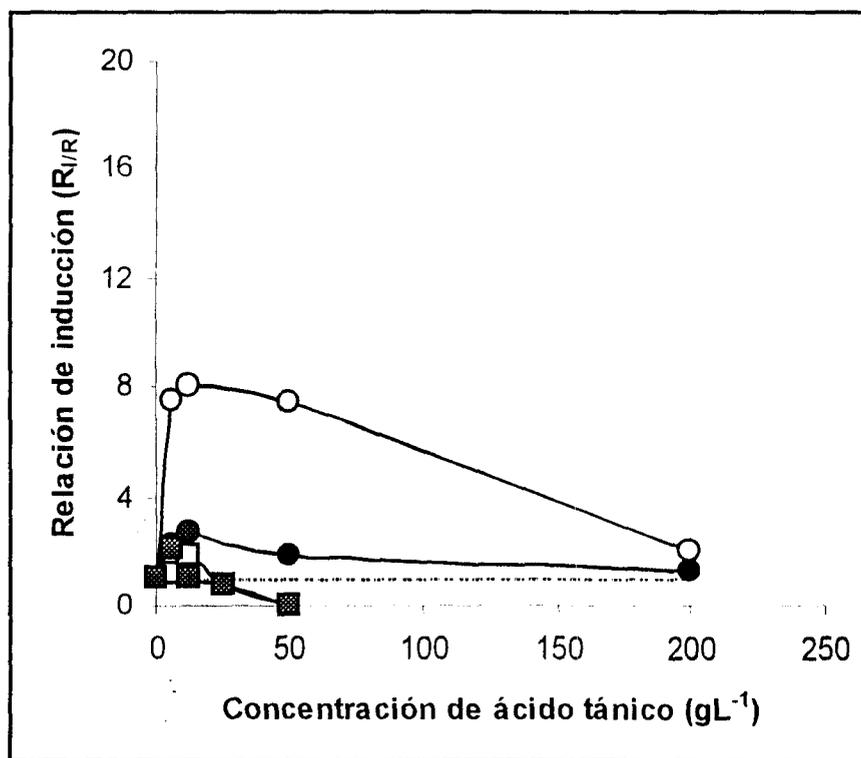


Figura 10. Efecto de la concentración de glucosa sobre la relación de inducción de la tanasa. Actividad tanasa intracelular (●) y extracelular (O) producida en CMS. Actividad tanasa intracelular (■) y extracelular (□) producida en CML. La línea punteada representa la actividad tanasa basal.

La figura 10 muestra que la adición de pequeñas cantidad de glucosa (12.5 gL^{-1}) incrementaron la producción de tanasa en CMS sin que mostraran el mismo efecto en CML. Los niveles más altos de

glucosa llevaron a un claro patrón de represión en CML mientras que en CMS el valor de R_{VR} se vio claramente afectado aunque no se llegó a obtener un patrón de represión total.

Los resultados obtenidos para el rendimiento Y_{EX} (Tablas 6 y 8) se correlacionan y apoyan claramente los patrones obtenidos para el valor de R_{VR} bajo condiciones de inducción (ácido tánico) y represión (ácido tánico y glucosa) para la producción de la tanasa (Figuras 9 y 10). Tomando en cuenta que en la mayoría de los estudios de comparación de títulos de actividad enzimática en CML y CMS previamente citados, se han empleado diferentes concentraciones de glucosa, resulta importante mencionar que el presente estudio demuestra que aunque se desconocen las causas de valores Y_{EX} mayores en CMS, éstos están relacionados con una menor sensibilidad a la represión catabólica, como se demostró en la Figura 10, dado que este fenómeno es realmente minimizado, ya que *A. niger* Aa-20 puede producir tanasa con altos niveles de glucosa ($G_0 > 50 \text{ gL}^{-1}$), en presencia de un nivel moderado de inductor ($S_0 = 25 \text{ gL}^{-1}$).

La figura 11 presenta de forma gráfica el cálculo del coeficiente de rendimiento Y_{EX} , considerando los resultados obtenidos para la tanasa extracelular de *A. niger* Aa-20 producida en CML y CMS. Cuando se empleó una concentración inicial de ácido tánico de 50 gL^{-1} se produjo la tanasa en ambos sistemas de cultivo, siendo el valor de Y_{EX} 7 veces más alto en CMS que en CML (Figura 11a). Esta diferencia se incrementa hasta 52 veces cuando en el medio se utilizaron concentraciones iniciales de glucosa de 50 gL^{-1} y de ácido tánico de 25 gL^{-1} (Figura 12b); dichas condiciones no favorecieron la producción de la tanasa en CML.

En general, los resultados obtenidos en este estudio confirman la idea de que el CMS favorece la obtención de títulos enzimáticos mayores, porque minimiza el fenómeno de represión catabólica (Ramesh y Lonsane, 1991; Solis-Pereira y col., 1993) y concuerda con otros estudios comparativos de los títulos enzimáticos alcanzados en ambos sistemas de producción (Lekha y Lonsane, 1994; Acuña-Argüelles y col., 1995; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Zeida y col., 1998).

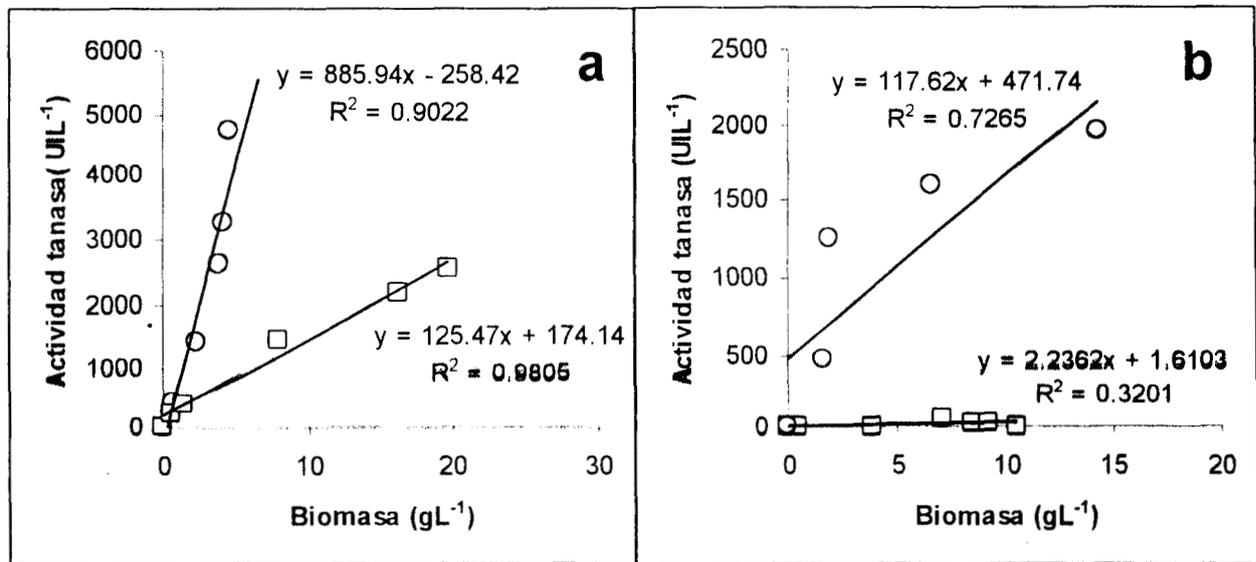


Figura 11. Relación entre la biomasa y la actividad tanasa para calcular los coeficientes de rendimiento Y_{EX} en CML (□) y CMS (○), usando ácido tánico a 50 g/L⁻¹ (a) y glucosa a 50 g/L⁻¹ y ácido tánico a 25 g/L⁻¹ (b).

En el caso particular de la tanasa, se ha reportado que ésta no se sujeta a represión catabólica en presencia de sacarosa o glucosa (Lekha y Lonsane, 1997). Los resultados obtenidos en este estudio muestran claramente que la tanasa es regulada por la presencia de glucosa pero de una forma diferente de acuerdo al sistema de cultivo. Recientemente Bradoo y col., (1997) reportaron que en CML la tanasa es constitutiva cuando se produce tanto en sustratos simples como en complejos, pero la actividad aumenta al doble en presencia de ácido tánico como única fuente de carbono.

Lekha y Lonsane (1997) cuestionaron el rol del ácido tánico en la producción de la tanasa, ya que éste posee un tamaño molecular muy grande y es altamente reactivo. Sin embargo, el ácido tánico y el pentagaloil glucosa han sido reportados como los mejores inductores de la actividad tanasa (Bajpai y Patil, 1997; Zeida y col., 1998). En adición, Nishira y Mugibayashi (1953) reportaron que la tanasa se produjo tanto con el ácido tánico como con el ácido gálico.

Considerando que la tanasa es una enzima esterasa y que el ácido gálico no posee enlaces tipo éster, en nuestro estudio se consideró importante evaluar el rol del ácido gálico en la producción de la tanasa. Los resultados obtenidos demostraron que con el empleo del ácido gálico como única fuente de carbono no se produce la actividad tanasa (Figura 12). De forma contraria, con este compuesto la actividad tanasa producida en CML fue significativamente menor que la obtenida con el empleo de glucosa como única fuente de carbono.

Esta observación sugiere un mecanismo de regulación por producto final. Lekha y Lonsane (1997) en su estudio de revisión sobre la tanasa sugirieron que la enzima sigue un mecanismo de inducción similar al reportado para la celulasa. Sin embargo, ellos no discutieron el mecanismo de represión de la tanasa.

Los resultados obtenidos concuerdan con las observaciones de Bradoo y col., (1997) en relación a que la tanasa no se induce con ácido gálico como se muestra en la figura 12. Ambos reportes muestran que la actividad tanasa es mayor cuando se emplean altas concentraciones de ácido tánico. De ninguna forma, la literatura presente soporta la constitutividad o inducibilidad de la tanasa por ácido tánico, lo cual permanece aún confuso y es necesario dirigir más esfuerzos de investigación para elucidarlo.

Finalmente, es importante establecer que éste es el primer reporte que incluye una descripción detallada de los patrones de producción de la tanasa fúngica en CML y CMS en términos de coeficientes cinéticos, tales como las relaciones de inducción y rendimientos enzima/biomasa.

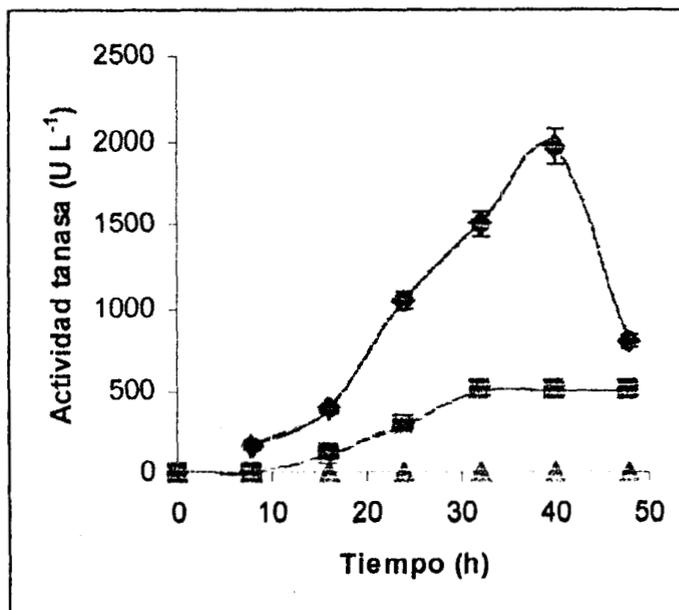


Figura 12. Efecto de la fuente de carbono en la producción de tanasa de *A. niger* Aa-20 en CML.

30 gL⁻¹ de glucosa (■), 25 gL⁻¹ de ácido gálico (▲) y 25 gL⁻¹ de ácido tánico (◆).

Además, las diferencias en los títulos de actividad pueden deberse a diferentes sensibilidades del microorganismo a la represión por glucosa en cada uno de los sistemas de cultivo

8.3 INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Teniendo presente los patrones de producción de tanasa en CML utilizando ácido tánico como fuente de carbono, en los cuales después de alcanzar la máxima actividad enzimática, ésta desciende significativamente, mientras que en CMS este tipo de patrones no se presenta, se decidió estudiar la presencia de actividades proteolíticas en los extractos obtenidos de ambos sistemas de producción.

Es importante considerar que, generalmente, la mayoría de los estudios de producción de proteasas involucra el uso de sustratos proteínicos con el objetivo de inducir tales actividades enzimáticas (Ikasari y Mitchell, 1994; Tunga y col., 1998). En el presente caso, se estudió la producción colateral de proteasas en un sistema diseñado para la producción de tanasa en CML y CMS. En este último se usó como soporte PUF y el ácido tánico como inductor de la actividad tanasa ambos sistemas.

La actividad proteolítica producida por *A. niger* Aa-20 en CML fue inversamente relacionada a la concentración inicial de ácido tánico (Figura 13a), mientras que en CMS, la producción de proteasas no se vio afectada (Figura 13b). La actividad proteasa fue al menos 6 veces mayor en CML que en CMS, usando el mismo medio de cultivo. Los resultados presentados en la Figura 13a muestran que la actividad proteasa final más baja en CML se obtuvo cuando se utilizó la concentración más alta de

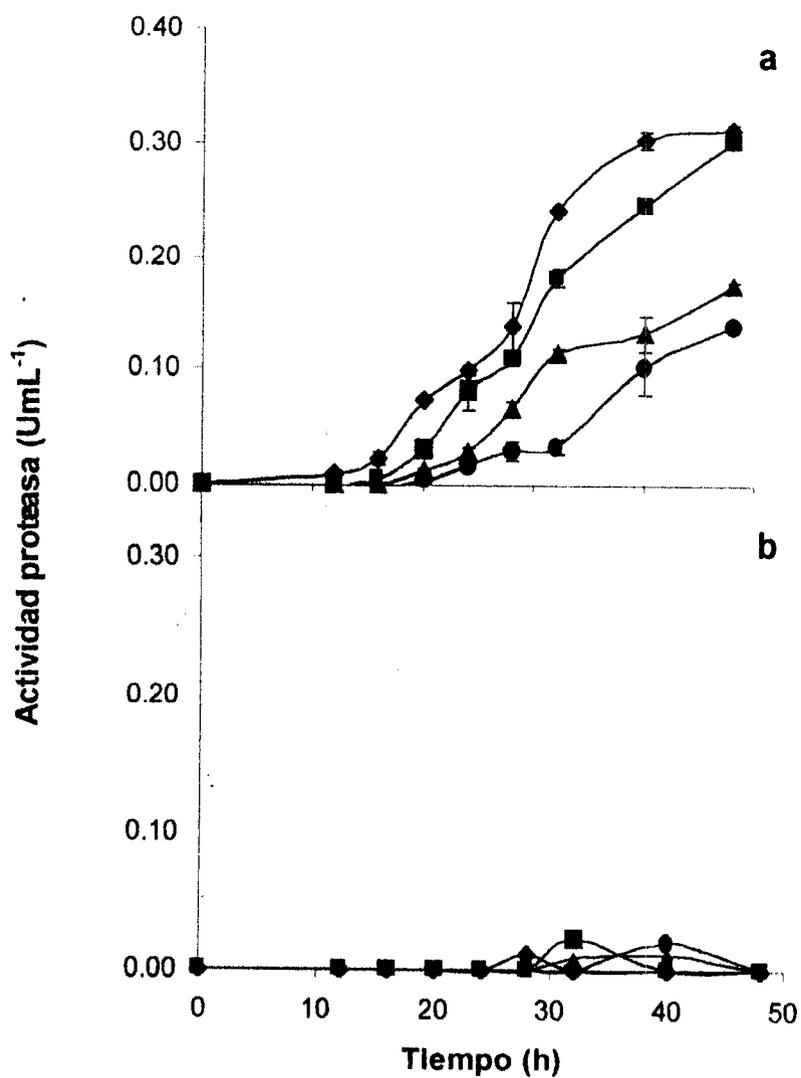


Figura 13. Producción de proteasa por *Aspergillus niger* Aa-20 en CML (a) y CMS (b) a concentraciones iniciales de ácido tánico de 12.5 (◆), 25 (■), 50 (▲) y 100 (●) g/L

ácido tánico, mientras que en CMS, el cambio en la concentración inicial de ácido tánico no afectó los niveles de la actividad proteasa.

Este hecho nos llevó a pensar que en CMS la ausencia de la actividad proteolítica podía ser el resultado de la relación C/N utilizada, por lo que se llevó a cabo una serie de experimentos en los cuales la C/N fue de 11.1 hasta 4.5 por incremento en la concentración de la fuente de nitrógeno. El cambio en la relación C/N tuvo un efecto significativo sobre la expresión de la actividad proteolítica (Tabla 9). Una baja actividad proteolítica a altas concentraciones de ácido tánico puede relacionarse con el acomplejamiento de la proteasa extracelular por el tanino presente, del cual se sabe que es un agente precipitante de proteínas. Aún así la actividad proteolítica estuvo presente en todos los extractos obtenidos en CML a las diferentes concentraciones de ácido tánico evaluadas.

Como se mencionó en secciones anteriores, siempre ha llamado la atención el hecho de obtener títulos de actividad más altos en CMS que los obtenidos en CML (Ramesh y Lonsane, 1991; Solis-Pereira y col., 1993; Lekha y Lonsane, 1994; George y col., 1997; Maldonado y Strasser de Saad, 1998). Este comportamiento se ha atribuido a diferentes causas, tales como diferentes actividades de agua y a la composición de membrana celular, entre otras ya descritas. Sin embargo, la actividad proteolítica más alta en CML está directamente relacionada con la más baja actividad tanasa observada.

Tabla 9. Resultados de la actividad proteasa y tanasa producidas por *Aspergillus niger* Aa-20 en CMS a diferentes relaciones C/N.

Relación C/N	Tiempo (h)	Actividad tanasa (U mL ⁻¹)	Actividad proteasa (U mL ⁻¹)
4.5	48	4.9 ± 0.3	0
11.1	48	3.5 ± 0.1	0.24 ± 0.01

Para demostrar el efecto de la actividad proteasa sobre la producción de actividades enzimáticas no proteolíticas, se llevaron a cabo una serie de experimentos en CML usando una mezcla de inhibidores de la actividad proteasa y una concentración inicial de ácido tánico de 12.5 gL⁻¹ (bajo esta condición se había obtenido la más alta actividad proteolítica en CML). La adición de inhibidores, marcada por una flecha, redujo considerablemente la actividad proteasa (Figura 14a). Pero sin inhibidores de proteasa, la actividad fue 8 veces mayor que con su presencia. Adicionalmente, para comprobar que la actividad proteolítica producida en CML fue la responsable de los decrementos en los títulos de actividad tanasa producida, dicha actividad se evaluó en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas. Sin inhibidor, la actividad tanasa disminuyó después de las 40 h de cultivo (Figura 14b), en contraste, en presencia del inhibidor la actividad tanasa se mantuvo constante hasta por 50 h de cultivo.

Es importante mencionar que la adición del inhibidor no afectó la producción de biomasa (Figura 15). además, bajo las condiciones de ensayo no se presentó la esporulación del microorganismo en ninguno de los dos sistemas de cultivo.

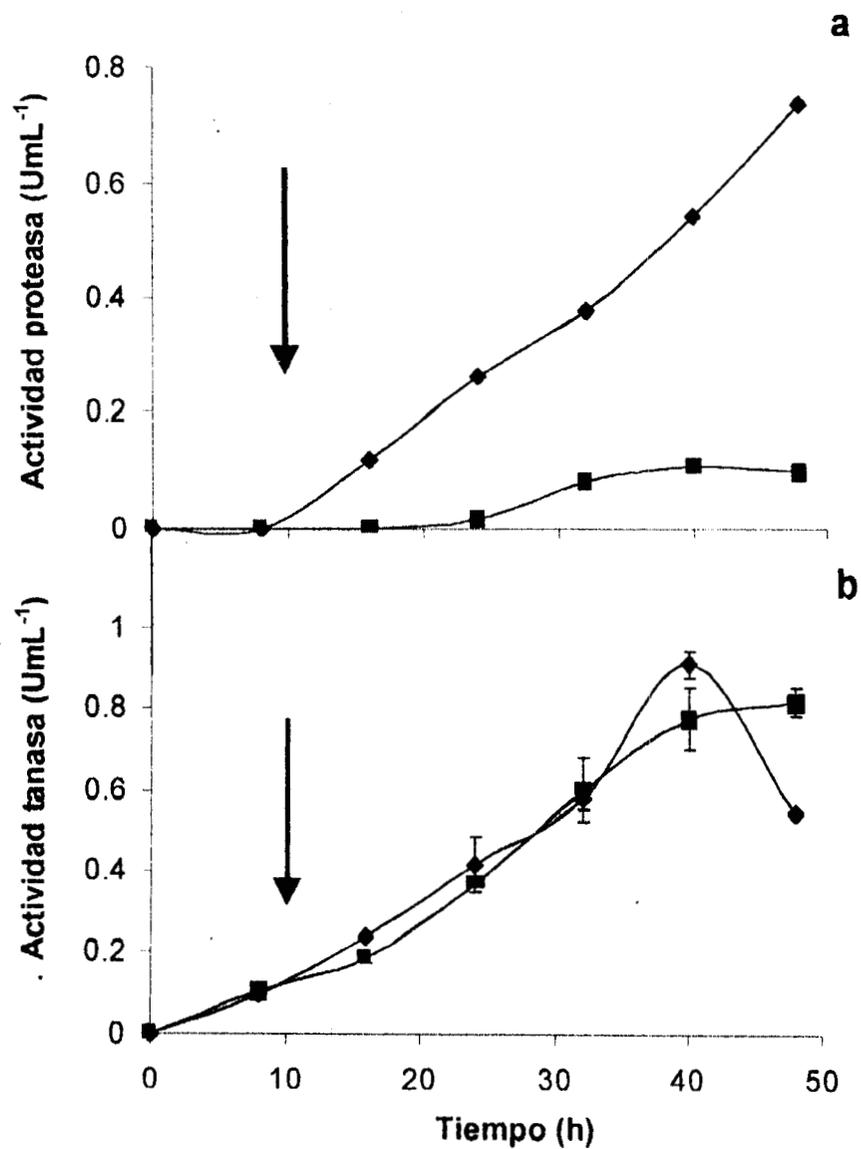


Figura 14. Efecto de la adición de un inhibidor de proteasa sobre la actividad proteasa (a) y tanasa (b) de *A. niger* Aa-20. Con (■) y sin (●) inhibidor. La flecha indica el tiempo al cual se adicionó el inhibidor de proteasa al cultivo.

Este es el primer reporte relacionado con la producción contaminante de proteasas en diferentes sistemas de producción (CML y CMS). Esto resulta ser una característica ventajosa del CMS, ya que minimiza actividades proteolíticas indeseadas durante la producción de enzimas inducibles tales como la tanasa. La presencia de proteasas reducen los títulos finales de actividad de las enzimas de interés así como las posibilidades de su comercialización. Por este motivo, se invierten millones de dólares en tratar de eliminar las actividades proteolíticas de los extractos obtenidos. Por ejemplo, se han logrado obtener cepas mutantes que no producen proteasas o se emplean inhibidores de las mismas.

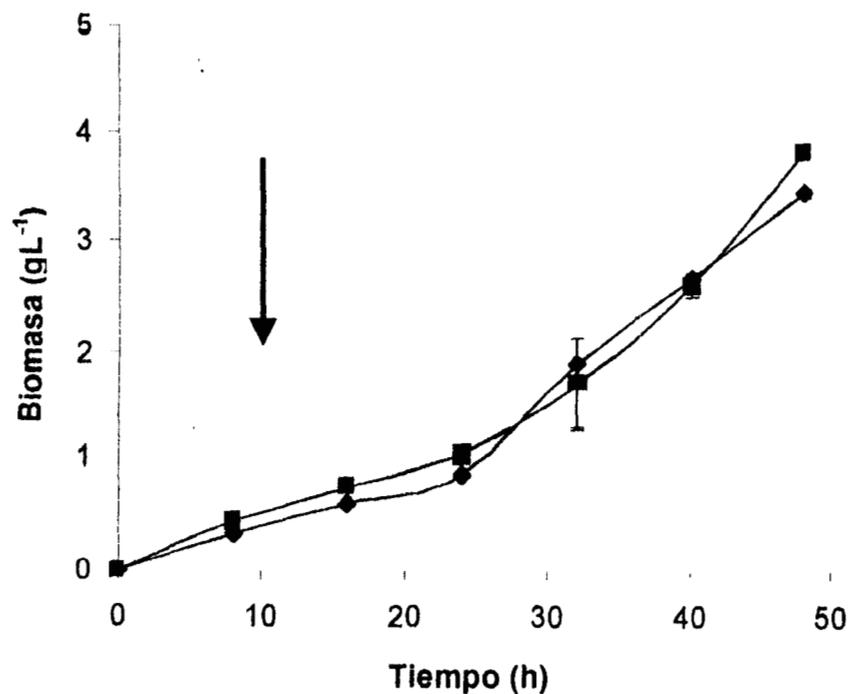


Figura 15. Efecto de la adición de un inhibidor de proteasas sobre la producción de biomasa de *A. niger* Aa-20 en CML. Con (■) y sin (◆) inhibidor. La flecha indica el tiempo al cual se adicionó el inhibidor de proteasa al cultivo.

La producción industrial de enzimas representa más de 600 millones de dólares en ventas, y la mayoría de ellas se produce por CML (Layman, 1990). Muchas empresas gastan grandes cantidades de dinero en tratar de obtener cepas que no produzcan actividades proteolíticas contaminantes en los extractos. Con los resultados obtenidos se demuestra que el uso del CMS podría representar una alternativa muy atractiva de producir enzimas de interés sin la interferencia de la proteólisis indeseada.

8.4 DISCUSIÓN GENERAL

Esta bien documentado que la producción de la mayoría de las enzimas extracelulares que se producen por bacterias, levaduras y hongos filamentosos en CML es seriamente afectada por los fenómenos de represión catabólica y por producto final (Bull, 1972); lo que implica problemas serios en su producción industrial, principalmente del tipo económico (Lekha y Lonsane, 1997). Sin embargo, desde 1991 Ramesh y Lonsane, reportaron que este problema no se presentaba, si las mismas enzimas eran producidas por CMS. Desde ese tiempo a la fecha, muchos investigadores demostraron que estos resultados eran consistentes para diferentes enzimas bacterianas y fúngicas (amilasas, pectinasas, proteasas, tanasas, e invertasas), las cuales fueron producidas en CMS tanto en soportes naturales como inertes (Solís-Pereira y col., 1993; Lekha y Lonsane, 1994; Acuña-Argüelles y col., 1995; George y col., 1997; Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Taragano y Pilosof, 1999; Nandakumar y col., 1999; Romero-Gómez y col., 2000). Sin embargo, se desconocían las causas de tal comportamiento, las cuales, hasta muy recientemente están siendo conocidas.

En 1998, Maldonado y Strasser de Saad, reportaron el primer trabajo que demostró diferencias estructurales en la membrana celular de *A. niger* cultivado en ambos sistemas de producción, específicamente en los tipos y niveles de ácidos grasos. Por su parte, Romero-Gómez y col., (2000) explicaron las diferencias como asociadas a coeficientes cinéticos tales como, la tasa específica de crecimiento, μ , y el nivel máximo de la biomasa (X_{max}). A diferencia de dicho reporte, este trabajo demuestra en términos de la fisiología microbiana, que el rendimiento $Y_{E/X}$ y la relación $R_{I/R}$ son los factores dominantes que explican una mayor productividad de las enzimas excretadas por cultivos microbianos CMS

Los resultados demuestran que los patrones de producción de la tanasa en CMS y CML son diferentes, con respecto a los niveles de tanasa inducida, a su asociación con el crecimiento y a la presencia o ausencia de un proceso destructivo en el medio.

A diferencia de Romero-Gómez y col. (2000), se demostró que la productividad de la tanasa es mayor en medio sólido que en líquido, debido principalmente porque la biomasa produce más enzima (Y_{EX}) y no porque se produce más biomasa (coeficientes μ y X_{max}).

Varios autores demostraron que la productividad en CMS es aumentada por la adición de glucosa, en presencia de un material inductor (Solís-Pereira y col., 1993; Acuña-Argüelles y col., 1995, Maldonado y Strasser de Saad, 1998; Tarangano y Pilosof, 1999). Sin embargo, en este estudio, la adición de glucosa en presencia de ácido tánico en CMS no provocó cambios tan importantes en los valores de la productividad, tal como sucedió en el CML.

Este es el primer reporte que demuestra diferencias en la tasa secundaria de destrucción de la enzima (k) cuando ésta se produce en presencia única del inductor en CML, las cuales se asociaron claramente a la presencia concomitante de proteasas en el medio de cultivo, de forma contraria a lo que sucede en CMS, donde los valores de k fueron asociados al incremento de la actividad tanasa en función de la concentración del sustrato.

Sin embargo, los resultados hasta ahora obtenidos son aún insuficientes para explicar de forma clara y contundente las causas que originan las diferencias en los sistemas de CML y CMS. Las cuales

aparentemente pueden estar ligadas a los fenómenos de difusión de los nutrientes y oxígeno en ambos sistemas de cultivo. Experimentos preliminares sobre estos procesos difusionales, hacen pensar que el CMS es menos sensible a la represión catabólica, principalmente por la ausencia de agitación, de tal forma que los niveles de glucosa en la vecindad de las zonas catalíticas (celulas) tiende a formar gradientes de concentración, influenciado principalmente porque la velocidad de consumo de los mismos es mayor que la de su difusión sobre el soporte. Por el contrario, en CML, la agitación evita la formación de gradientes y por lo tanto, el microorganismo se encuentra permanentemente en contacto con altos niveles de glucosa, basando su crecimiento básicamente en este sustrato y no sobre el inductor, lo cual hipotéticamente sucede en CMS. Sin embargo, estas incógnitas quedan por resolverse en trabajos futuros.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *17 Tapalapa*

Capítulo 9
Conclusiones

CONCLUSIONES

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

Los patrones de producción de la tanasa en CMS y CML son diferentes en condiciones de inducción y de represión. Dichos patrones están fuertemente influenciados por su asociación con el crecimiento y a la presencia (CML) o ausencia (CMS) de un proceso proteolítico en el medio.

El análisis de los parámetros cinéticos de producción de la tanasa en CMS y CML demostró que el factor dominante que explica la elevada productividad de la tanasa en CMS en comparación con el CML, fue el rendimiento de la enzima por unidad de biomasa ($Y_{E/X}$).

La diferencia de productividad en ambos sistemas de cultivo esta fuertemente influenciada por la presencia de proteasas en CML y la ausencia de éstas actividades en CMS. Sin embargo, al cambiar las condiciones del cultivo sólido, se detectó la presencia de dichas actividades enzimáticas.

Los cultivos de *Aspergillus niger* Aa-20 estudiados, si presentaron el fenómeno de represión catabólica por la adición de glucosa, pero el CML fue mucho más sensible que el CMS, sin embargo, en éste último, los niveles de glucosa utilizados fueron 4 veces más altos que en CML. Los patrones de inducción y represión se asociaron claramente a los valores del rendimiento $Y_{E/X}$ en ambos sistemas de cultivo.

Este es el primer reporte que demuestra diferencias en la tasa secundaria de destrucción de la enzima (k) cuando ésta se produce en presencia única del inductor en CML, las cuales se asociaron claramente a la presencia concomitante de proteasas en el medio de cultivo, de forma contraria a lo que sucede en CMS, donde los valores de k fueron asociados al incremento de la actividad tanasa en función de la concentración del sustrato.

En CML, el ácido gálico provocó la obtención de bajos títulos de actividad tanasa, incluso menores a la actividad basal, lo que sugiere que actúa como un represor por producto final.

Finalmente, se concluye que los resultados obtenidos demuestran diferencias fisiológicas importantes en los dos sistemas de cultivo evaluados y, a diferencia de lo reportado en la literatura, no se encontraron diferencias significativas en los valores de X_{max} y μ , pero sí las hubo en los valores de $Y_{E/X}$. Los resultados del máximo nivel teórico de $Y_{E/X}X_{max}$, y de la máxima productividad de referencia $\mu Y_{E/X}X_{max}$, o de los niveles medidos de E_{max} y P_{max} , fueron favorables para el CMS.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Estadística

Capítulo 10
Recomendaciones

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos reflejan diferencias fisiológicas importantes, las cuales pueden ser provocadas por diferentes causas, entre las que se consideran la densidad de empaque en el CMS y, el tipo de sustrato. En el primero de los casos, la densidad de empaque tiene una fuerte influencia sobre la difusión de oxígeno y de los nutrientes, mientras que el sustrato y las concentraciones a las que se evalúa pueden ser tóxicas para el microorganismo. Esto hace necesario un estudio que relacione las velocidades de consumo y de difusión del sustrato como posible explicación a las condiciones generadas en CMS que llevan a una ausencia aparente de la represión catabólica de la síntesis de enzimas inducibles. Este estudio descriptivo de tal fenómeno, abrirá nuevas líneas de investigación, por lo que se sugiere evaluar la influencia de la densidad de empaque del soporte en CMS y se determinen los valores de la constante de difusión del sustrato en el soporte.

Es importante mencionar que los estudios que se lleven a cabo sobre el mismo tema, deberán de emplear modelos de enzimas inducibles sencillos (por ejemplo: invertasa inducida por sacarosa o celulasa por celobiosa), esto con el fin de reducir al máximo los efectos tóxicos o inhibitorios de compuestos complejos sobre el crecimiento microbiano, como ocurrió con el empleo de ácido tánico.

Además, es importante abordar el tema cubriendo otros aspectos tales como el efecto que tiene la actividad de agua sobre la aparente ausencia de represión catabólica. Un estudio a nivel de mecanismo de regulación también evidenciará nuevos hallazgos que llevan al entendimiento completo de la capacidad que tiene el CMS para minimizar el fenómeno de represión catabólica.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *1970-2010*

Capítulo 11
Referencias Bibliográficas

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acuña-Argüelles M., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G. y Favela-Torres E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* by submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 808-814.
2. Adachi O. Watanabe M. y Yamada H. 1968. Studies on fungal tannase Part. II. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 1079-1085.
3. Agger T. y Nielsen J. 2000. Genetically structured modeling of protein production in filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.* **66**, 164-170.
4. Aguilar G. y Huitrón C. 1986. Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 541-545.
5. Allen K.E., McNally M., Lowendorf H.S., Slayman C.W. y Free S.J. 1989. Deoxiglucosa-resistant mutants of *Neurospora crassa*: isolation, mapping and biochemical characterization. *J. Bacteriol.* **1**, 53-58.
6. Antier P., Minjares A., Roussos S., Raimbault M. y Viniegra-González G. 1993a. Pectinase-hiperproducing mutants fo *Aspergillus niger* C28 B35 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 254-260.
7. Antier P., Minjares A., Roussos S. y Viniegra-González S. 1993b. New approach selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation. *Biotechnol. Adv.* **2**, 53-58.
8. Anwar M.N., Suto M. y Tomita F. 1996. Isolation of mutants of *Penicillium purpurogenum* resistant to catabolite repression. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 684-687.
9. Aoki K., Shinke R. y Nishira H. 1976. Purification and some properties of yeast tannase. *Agr. Biol. Chem.* **40**, 79-85.
10. Arst H.N., Tollervey D., Dowzer C. y Kelly J. 1990. An inversion truncating the CREA gene of *Aspergillus nidulans* results in carbon catabolite derepression. *Mol. Microbiol.* **4**, 851-854.
11. Arst H.N. y Bailey C.R. 1977. The regulation of carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*. En J.E.Smith y J.A.Pateman (Eds). *Genetic and physiology of Aspergillus nidulans*. Academic Press, London, p131-146.
12. Auria R, M Morales, E Villegas and S Revah. 1993. Influence of mold growth on the pressure drop in aereated solid state fermenters. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 1007-1013.
13. Bailey C.R. y Arst H.N. 1975. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur.J.Biochem.* **51**, 573-577.

14. Bajpai B. y Patil S. 1996. Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 217-220
15. Bajpai B. y Patil S. 1997. Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperfecti*. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 612-614.
16. Barthomeuf C., Régerat F. y Pourrat H. 1994. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF8. *J.Ferment. Bioeng.* **3**, 320-323.
17. Baryshnikova, L.M. y Golovlev, E.L. 1997. Catabolite repression-inactivation of glucose transport systems and its role in regulation of the *Rhodococcus minimus* growth rate. *Mikrobiologiya.* **66**, 310-314.
18. Begovic S. y Duzic E. 1976. Tannase. Part I. *Veterinaria.* **25**, 421-428.
19. Begovic S. y Duzic E. 1977. Tannase. Part II. *Veterinaria.* **26**, 227-233.
20. Beverini M. 1987. PhD. Thesis. Institut National Polytechnique. Nancy, Francia.
21. Beverini M. y Metche M. 1990. Identification, purification and physicochemical regulation tannase from *Aspergillus oryzae*. *Sci. Aliments* **10**, 807-816.
22. Bradoo S., Gupta R. y Saxena R.K. 1996. Screening of extracellular tannase producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **42**, 325-329.
23. Bradoo S., Gupta R. y Saxena R.K. 1997. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochem.* **32**, 135-139.
24. Breunig, K.D., Bolotin, F.M., Bianchi, M.M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Kriger, J.J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H.Y., Wesolowski, L.M. y Zeeman, A.M. 2000. Regulation or primary carbon metabolism in *Kluveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 771-780.
25. Bull, A.T. 1972. Environmental factors influencing the synthesis and excretion of exocellular macromolecules. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **22**, 261-292.
26. Carlson M. 1987. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. *J. Bacteriol.* **11**, 4873-4877.
27. Celenza J.L. y Carlson M. 1986. A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein-kinase. *Science.* **233**, 1175-1180.
28. Chae S. y Yu T. 1983. Experimental manufacture of acorn wine by fungal tannase. *Hanguk Sipkum Kwahakoechi.* **15**, 326-332.

29. Chatterjee R. Dutta A., Banerjee R., y Bhattacharyya B. 1996. Production of tannase by solid state fermentation. *Bioprocess eng.* **14**, 159-162.
30. Coggon P., Graham N. y Sanderson G. 1975. Cold water-soluble tea. U.K. Pat. 2,610,533.
31. Coggon P., Graham H., Hoefler A. y Sanderson G. 1976. Tea leaves extractable in cold water. (Unilever NV) Ger.Pat. 2,610,533.
32. Coggon P., Graham H., Hoefler A. y Sanderson, G. 1979. Tea. U.K.Pat. 1,546,508.
33. Córdova J., Gutiérrez-Rojas M., Huerta S. Saucedo-Castañeda G. y Favela-Torres E. 1996. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnol. Tech.* **10**, 1-6.
34. Davis, L.L. y Baudoin, B.A.M. 1987. Effect of osmotic potential on synthesis and secretion of polygalacturonase and cellulase by *Geotrichum candidum*. *Can. J. Biotechnol.* **33**, 138-141.
35. Deschamps A., Otuk G. y Lebeault J. 1983. Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *J. Ferment. Technol.* **61**, 55-59.
36. Dhar y Bose, S. 1964. Purification and characterization of tannase from *Aspergillus niger*, *A. flavus* and *A. oryzae*. In: Lekha P.K. y Lonsane B.K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* **44**, 215-260.
37. Doi S., Shinmyo A., Enatsu T. y Terui T. 1973. Growth-associated production of tannase by a strain of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* **51**, 768-774.
38. Dosoretz C, Chih-Chen H, y Grethlein H 1990. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 395-400.
39. Dowzer S.D. y Kelly J.M. 1989. Cloning of CreaA gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr.Genet.* **15**, 457-459.
40. Dowzer S.D. y Kelly J.M. 1991. Analysis of the CreA gene a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Cell.Biol.* **2**, 5701-5709.
41. Draper, N.R. y Smith, H. 1966. *Applied regression analysis*. Ed. John Wiley & Sons, New York.
42. Drysdale M.R., Kolse S.E. y Kelly J.M. 1993. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, CreA. *Gene.* **130**, 241-245.

43. Du.Q. Li M. Cheng Q. You Zhang T., y Ito Y. 1994 Purification of (-)-epigallocatechin from enzymatic hydrolysate of its gallate using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatography*. **687**, 174-177.
44. Dykerhoff H. y Ambruster R. 1933. Tannase. *Z. Phys. Chem*: 219, 38-56.
45. Elorsa M. y Arst V. 1971. Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genetic*. **111**,185-193.
46. Entian K.D. 1986. Glucose repression: a complex regulatory system in yeast. *Microbiol. Sci*. **3**, 366-371.
47. Eraso P. y Gancedo J.M. 1984. Catabolite repression in yeasts is not associated with lows levels of cAMP. *Bull. Biochem*. **141**, 195-198.
48. Ertola, R., Yantorno, O. y Mignone, C. 1994. Microbiología Industrial. Ed. The General Secretariat of the Organizartion of American State. Washington, D.C.
49. Fang S.F. 1940 Fermentation for production of gailic acid. *Hwang Hai*. **1**, 5-8.
50. Favela-Torres, E., García-Rivero, M., Córdova-López, J., Roussos, S., Viniestra-González, G., Gutiérrez-Rojas, M., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P. Y Huerta-Ochoa, S. 1995. Kinetics of *Aspergillus niger* growth at high glucose concentrations in different types of the cultures. In: Advances in solid state fermentation. Ed. Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M y Viniestra-González, G. pp.49-58
51. Fernback A. 1901. Tannase. *C.R. Academ. Sci (Paris)*. **132**, 1214-1215.
52. Fumihiko Y. y Kiyoshi M. 1975. Tannase production by *Aspergillus*. *Jpn.Pat.* **72,25,786**.
53. Gancedo, J.M. 1992. Carbon catabolite represión in yeast. *Eur. J. Biochem*. **206**, 297-313.
54. Gancedo J.M. y Gancedo, C. 1986. Catabolite repression in mutants of yeast. *FEMS Microbiol. Rev*. **32**, 179-187.
55. Ganga P.S., Nandy S.C. y Santappa M. 1978. Effect of environmetal factors on the production of fungal tannase. *Leather Sci*. **23**, 203-209
56. García-Peña I. 1996. Producción, purificación y caracterización de tanasa producida por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, D F.
57. Gathon A., Cross Z. y Rozhanski M. 1989. Immobilization of tannase in reverse micelles for propilgallate production from tannic acid. *Enzyme Microb. Technol*. **11**, 604-609.
58. George E.C. y Sen S.N. 1960. *Bulletin of CLRI*. **6**, 279-280.

59. George S., Raju V., Subramanian V. y Jayaraman, K. 1997. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. *Bioprocess Eng.* **16**, 381-382.
60. Golden T. y Hatton T.A. 1987. *Separation Sci Technol* **22**, 831-841.
61. Goodwin T.W. y Mercer E.I. 1983. In *Introduction to plant biochemistry*. Pergamon Press. New York.
62. Gottschalk G. 1982. *Bacterial metabolism. Regulation of metabolism in bacteria*. Ed Mir, Moscow, Russia.
63. Grajek, W. y Gervais, P. 1987. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 658-662.
64. Grovenco S. y Vergegehern T. 1987. *Enzyme. Microb. Technol.* **22**, 470-473.
65. Guðafsson E.L. y Syberg, A.S. 1995. Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *J. Food Sci.* **60**, 149-152.
66. Hadi T.A., Banerjee R. y Bhattacharaya B.C. 1994. Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess eng.* **11**, 239-243.
67. Haworth R., Jones K. y Rogers H. 1958. Ion-exchange chromatography of *Aspergillus niger* extract. *Proc. Chem. Soc.* 8-9.
68. Iibuchi S., Monida Y. y Yamada K. 1967. Studies on tannin acylhydrolase of microorganisms Part III. Purification of enzyme y some properties of it. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 803-809.
69. Iibuchi S., Minoda Y. y Yamada K. 1972. Hydrolyzing pathway, substrate specificity y inhibition of tannin acyl hydrolase. *Agr. Biol. Chem.* **36**, 1553-1568.
70. Ikasari L. y Mitchell D.A. 1994. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* **10**, 320-324.
71. Ilmen M., Thrane C. y Pentilla M. 1996. The glucose repressor gene CRE1 of *Trichoderma reesei*-Isolation of a full length and truncated mutant form. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 451-460.
72. Johnston M. y Carlson, M. 1992. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces* 2. In: Broach, J., Pringle, J. and Jones, E. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. 2, 193-231
73. Kawakubo J., Nishira H., Aoki K. y Shinke R. 1991. Screening for gallic acid producing microorganisms y their culture conditions. *Agr. Biol. Chem.* **55**, 857-877.
74. Kita J. 1917. Purification of tannase from *Aspergillus oryzae*. *J. Chem. Ind. (Tokyo)*. **20**, 134-137.

75. Klein, J. 1998. Clinical implications of antibiotic resistance for management of acute otitis media. *Ped. Infec Dis J.* **17**, 1084-1089
76. Kono, T. y Asai, T. 1969. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 293.
77. Knudson L. 1913. Tannase. *J. Biol. Chem.* **14**, 159-207.
78. Lane R.W., Yamakoshi J., Kikuchi M., Mizusawa K., Henderson L. y Smith M. 1997. Safety evaluation of tannase enzyme preparation derived from *Aspergillus oryzae*. *Food Chem. Toxicol.* **35**, 207-212.
79. Laukevics, J.J., Apsite, A.F., Viesturs, H.E. y Tengerdy, R.P. 1985. Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnol Bioeng.* **27**, 1687-1691.
80. Layman P. 1990. Promising new markets emerging for commercial enzymes. *Chem Eng News* **68**, 17-18.
81. Lekha P.K. y Lonsane B.K. 1994. Comparative titers, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochem.* **29**, 497-503.
82. Lekha P.K. y Lonsane B.K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* **44**, 215-260.
83. Lekha P., Ramakrishna M. y Lonsane B. 1993. Strategies for isolation of potent culture capable of producing tannin acyl hydrolase in higher titres. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensmitt.* **15**, 5-10.
84. Livshits V.A. y Debabov V.G. 1988. *Modern methods of creation of microbiological strains of industrial interest*. Ed. Alta Escuela. Moscow, Russia, p33-38.
85. Luedeking, R. and Piret, E.L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. *J Biochem Microbiol Technol Eng.* **1**, 393-398.
86. Madhavakrishna W., Bose S. y Nayudamma Y. 1960. Estimation of tannase y certain oxidising enzymes in Indian vegetables tanstuffs. *Bull. Cent. Leath. Res. Inst.* **7**, 1-11.
87. Madhavakrishna W. y Bose S.M. 1961. Purification, crystallization and properties of tannase from divi-divi pods. *Bull. Cent. Leather Res. Inst. Madras.* **8**, 153-165.
88. Magazanick J. 1942. In series in biotechnology. *Modern methods of creation of microbiological strains of industrial interest*. Debabov y Livshits. De. Alta Escuela, Moscow, Russia.

89. Maldonado M.C., Strasser A., y Callieri D. 1989. Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonases and pectinesterases by *Aspergillus niger* sp. *Sciences des Aliments*. **9**, 101-110.
90. Maldonado M.C. y Strasser de Saad A.M. 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 34-38.
91. Marsh, A.J., Mitchell, D.A., Stuart, D.M. y Howes, T. 1998. Oxygen uptake during solid state fermentation in a routing drum bioreactor. *Biotechnol. Lett.* **20**, 45-47.
92. Mathieu M y Felenbok B. 1995. The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through a competition with the ALCR specific transactivator. *EMBO J.* **13**, 4022-4027.
93. Mikhlin D.M. y Gulkina G.L. 1933. Properties and specificity of tannase. *Izv. Tzen. Nauch-Issled. Ins. Kozhevennio Prom.* **1**, 8-11.
94. Minjares-Carranco A., Trejo-Aguilar B.A., Aguilar G. y Viniestra-González G. 1997. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 25-31.
95. Monod J., Jacob F. y Gros F. 1942. *In the structure and biosynthesis of macromolecules*. Biochem. Soc. Symp. 21. Cambridge University Press.
96. Mwesigye P. y Barford J.P. 1996. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **42**, 297-306.
97. Nandakumar, M.P., Thakur, M.S., Raghavarao, K.S.M.S. y Ghildyal, N.P. 1999. Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 380-384.
98. Nierenstein M. 1930. Experimental work on tea tannin. *Analyst*, **61**, 294-295.
99. Nishira H., y Joslyn M. A. 1968. Tannase. *Phytochemistry*. **7**, 2147-2156.
100. Nishira H. y Mugibayashi N. 1953. Tannin decomposing enzyme of molds. XI Formation of tannase by various molds on wheat bran medium. *Hyogo Noka Diagaku Kenkyu Hokoku Nogeikagaku Hen.* **4**, 113-116.
101. Okamura S. y Yuasa K. 1987. Manufacture of tannase with *Aspergillus*. (Kikkoman y Inabata) Jpn.Pat. 62,272,973.
102. Okamura S., Mizusawa K., Takei K., Imai Y. y Ito S. 1988. Fermentative manufacture of tannase. (Kikkoman y Inabata) Jpn.Pat. 63,304,981.

103. Osawa R. y Walsh T.P. 1993. Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1251-1252.
104. Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R. y Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sci.* **77**, 149-162.
105. Pánneman, H; Ruijter-George, J.G; Van-Den-Broeck, H.C; Visser, J. 1998. Cloning and biochemical characterisation of *Aspergillus niger* hexokinase. The enzyme is strongly inhibited by physiological concentrations of trehalose 6-phosphate. *Eur. J. Biochem.* **258**, 223-232.
106. Pérez E.A. 2000. Efecto del gen HXK2 de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la regulación en la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum* DOGR5. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
107. Pirt, J. 1975. Principles of microbial and cell cultivation. Academic Press. Blackwell Scientific Publications. London.
108. Pottevin H. 1901. Properties and inducibility of tannase. *C.R. Academ. Sci. (Paris)*. **131**, 1215-1217.
109. Pourrat H., Regeat F., Pourrat A. y Jean D. 1985. Production of gallic acid from tara tannin by a strain of *A. niger*. *J. Ferment. Technol.* **63**, 401-403.
110. Prieto, S., De la Cruz, B.J. y Scheffler, I.E. 2000. Glucose-regulated turnover of mRNA and the terminal influence of poly(A) tail length on half-life. *J. Biol. Chem.* **14**, 14155-14166.
111. Pyrun, Y.R., Jo, J.S., Park, J.W. y Shin, H.H. 1999. Effect of oxygen on invertase expression in continuous culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing the SUC2 gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 334-339.
112. Quintero, R. 1993. *Ingeniería bioquímica. Teoría y Aplicaciones*. Ed. Alhambra Mexicana, D.F
113. Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic J. Biotechnol.* **1**, 3.
114. Rajakumar G. y Nandy S. 1983. Isolation, purification and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 525-527.
115. Ramesh M.V. y Lonsane B.K. 1991. Ability of a solidstate fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 591-593.
116. Ramírez A. 2000. Purificación y caracterización de una tannasa de *Aspergillus Niger* Aa-20, producida por fermentación en medio sólido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México, D.F.

117. Ribereau-Gayon M. 1973. In Les tannins des végétaux (eds Metche, M and Girardin, M) Francia, 262-287.
118. Righelato, R.C. 1975. *The filamentous fungi*. Ed. Eduard Arnold, London.
119. Romero-Gómez, S.J., Augur, C. y Viniestra-González, G. 2000. Invertase production by *Aspergillus Niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* **22**, 1255-1258.
120. Ronne, H. 1995. Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* **11**, 12-17.
121. Sanderson G., Englewood N., Coggon P. y Orangeburg N. 1974. Green tea conversion using tannase y natural tea leaves. U.S. Pat. 3, 812, 266.
122. Saucedo-castañeda, G. y Gómez, J. 1989. The effect of glucose and ammonium sulfate on kinetic acidification by heterogeneous mixed culture. *Biotechnol. Lett.* **11**, 121-124.
123. Scrimgeour K.G. 1977. *Chemistry and control of enzyme reactions*. Academic Press, Inc. London.
124. Seiji D., Atsuhiko S., Tosió E. y Gyoza T. 1973. *Hakko Kogaku Zasshi.* **27**, 33-36.
125. Shankaranand V.S., Ramesh M.V. y Lonsane B.K. 1992. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochem.* **27**, 33-36.
126. Shroff R.A., Lockington R. y Kelly J. 1996. Analysis of mutations in the CREA gene involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Can. J. Microbiol.* **42**, 950-959.
127. Shroff R.A., O'Connor S.M., Hynes M.J., Lockington R.A. y Kelly J.M. 1997. Null alleles of CREA, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **22**, 28-38.
128. Sittig M. 1988. Trimethoprim. In Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia. New Jersey: Noyes Publication. 282-284.
129. Skene I. y Brooker J. 1995. Characterisation of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe.* **1**, 321-327.
130. Solís-Pereira S., Favela-Torres E., Viniestra-González G. y Gutiérrez-Rojas M. 1993. Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 36-41.
131. Sourlangas S. 1947. Enzymes in the pyrogallol tannins y the decomposition products yielded. *J. Int. Soc. Leath. Trades. Chemist.* **31**, 13-23.

132. Strauss J., Mach R., Zeilinger S., Hartler G., Stoffler G., Wolshek M. y Kubicek, C. 1995. The carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* **376**, 103-107.
133. Swain T. y Bate-Smith E.C. 1962. In Comparative biochemistry. Vol. 3A. pp-755-809. Academic Press. New York.
134. Takashima S., Nakamura A., Iikura H., Masaki H. y Uozumi T. 1996. Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from *Trichoderma reesei*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 173-176.
135. Takino Y. 1976. Enzymic solubilization of tea cream. (Coca-Cola) U.S.Pat. 3,959,497.
136. Taragano, V.M. y Pilosof, A. 1999. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 415-419.
137. Teighem, V. 1867. Sur la fermentation gallyque. *Compt.Rend. De l'Acad. Des Sci.* **65**, 1091-1094.
138. Thom C. y Raper K.B. 1945. In A manual of Aspergilli. Pp-214-241. Williams and Wilkins, Baltimore.
139. Thomas R.L. y Mutagh K. 1985. Characterization of tannase activity on tea extracts. *J. Food Sci.* **50**, 1126-1129.
140. Torres N.V., Riol-Cimas J.M., Wolshek M. y Kubicek C.P. 1996. Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 790-794.
141. Trumbly R.J. 1991. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **8**, 15-21
142. Tsai C. 1985. Enzymic treatment of black tea leaf. (Procter y Gamble) Eur.Pat. 135,222.
143. Tunga R., Banerjee R. y Bhattacharyya B.C. 1998. Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Eng.* **19**, 187-190.
144. Vandamme E., Jerome M., Vermiera A. y Maria M. 1989. Process for preparation of tannase intended for the production of gallic acid with *Aspergillus*. Eur.Pat. 339,011.

145. Vaulard-Mey, G. y Fevre, M. 2000. Mutation of a putative AMPK phosphorylation site abolishes the repressor activity but not nuclear targeting of the fungal glucose regulator CRE1. *Curr. Genet.* **37**, 328-332.
146. Viniestra-González G. 1995. Solid-state fermentation: definitions, characteristics, limitations and monitoring. In: *Advances in solid state fermentation.* (eds) Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. and Viniestra-González, G. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
147. Viniestra-González G. 1997. Strategies for the selection of molds strains geared to produce enzymes on solid substrates. In E.Galindo & O.T.Ramírez (Eds), *Advances in Bioprocess Engineering. II*, 123-135. Kluwer Academic Publishers. Printed in The Netherlands.
148. Wayman F.M. y Matthey M. 2000. Simple diffusion is the primary mechanism for glucose uptake during the production phase of the *Aspergillus niger* citric acid process. *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 451-456.
149. Weetal H.H. 1985. Enzymatic gallic acid esterification. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 124-127.
150. Yamada K., Adachi O., Watanabe M. y Ogata K. 1967. Tannase (tannin acyl hydrolase) a typical serine esterase. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 257-258.
151. Yamada K. libuchi S. y Minoda Y. 1968. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. I. Isolation and identification of producing molds and studies on the conditions of cultivation. *Agr. Biol. Chem.* **45**, 233-240.
152. Ye, L., Kruekeberg, A.L., Barden, J.A. y Van-Dam, K. 1999. Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *J. Bacteriol.* **15**, 4673-4675.
153. Yokoyama S. Ogawa A., y Obayashi A. 1988. *Enzyme Microb Technol* **10**: 52-55.
154. Zeida M, Weiser M., Yoshida T., Sugio T. y Nagasawa T. 1998. Purification and characterization of gallic acid esterase from *Pantoea agglomerans* T71. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4743-4747.
155. Zhu Y, Smith J., Knol W. y Bol J. 1994. A novel solid state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnol. Lett.* **16**, 643-648.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Unidad Alameda*

Apéndices

APÉNDICE I

Durante el desarrollo del presente trabajo de investigación se publicaron y se divulgaron en reuniones científicas las siguientes secciones:

Publicaciones en revistas indexadas:

- 1) Aguilar, C.N. 1998. Represión catabólica de la síntesis de enzimas microbianas en cultivos líquido y sólido. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **40**, 158-165.
- 2) Aguilar, C.N., Augur, C., Viniegra-González, G. and Favela-Torres, E. 1999. A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. *Brazilian Archives in Biology and Technology*. **42**, 355-361.
- 3) Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E. and Viniegra-González, G. 2000. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *In press*.
- 4) Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E. and Viniegra-González, G. 2000. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid state fermentations: influence of glucose and tannic acid. *Enviado*.

Publicaciones en capítulos de libro:

Aguilar, C.N., Augur, C., Viniegra-González, G. and Favela-Torres, E. 2000. Influence of carbon source on tannase production by *Aspergillus niger* Aa-20 in solid state culture. In: **Coffee Biotechnology and Quality**; Sera, T., Socol, C.R., Pandey, A. and Roussos, S. (eds). Kluwer Academic Publishers (Dordrecht) . pp: 461-469.

Comunicaciones a congresos:

- 1) Aguilar, C.N., Augur, C., Viniegra, G. and Favela-Torres, E. 1999. Production of fungal tannase in a model system by solid state fermentation. *III International Seminar on Biotechnology in the coffee Agroindustry*. Londrina, Paraná, BRASIL. Poster.
- 2) Aguilar, C.N., Augur, C., Viniegra-González, G. y Favela-Torres, E. 1999. Efecto de los ácidos gálico y tánico en la producción de tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20. *VIII Congreso Nacional y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería*. Bahias de Huatulco, Oaxaca, MÉXICO. Oral.
- 3) Aguilar, C.N., Augur, C., Viniegra-González, G. y Favela-Torres, E. 1999. Producción de una tanasa fúngica por cultivos en medios líquido y sólido. *VIII Congreso Nacional y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería*. Bahias de Huatulco, Oaxaca, MÉXICO. Poster.
- 4) Favela-Torres, E., Acuña, M.E., Aguilar, C.N., Augur, C., Gutiérrez, M., Solís, S. and Viniegra, G. 1999. Enzyme production studies on solid state fermentation. *Third Conference on Recent Advances in Fermentation Technology (RAFT III'99)*. Sarasota, Florida, U.S.A. Conference.
- 5) Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E. and Viniegra-González, G. 2000. Effect of sucrose concentration on apical growth of *Aspergillus niger* Aa-20 in solid state fermentation. *International Simposium on Biotechnology and Bioengineering UPIBi-2000*. México, D.F. Poster.

Represión Catabólica de la Síntesis de Enzimas Microbianas en Cultivos Líquido y Sólido

CRISTÓBAL NOÉ AGUILAR

Dirección permanente: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Saltillo. A. P. 252. C. P. 25 000 Saltillo, Coahuila, México. Correo caguilar@alpha1.sal.uadec.mx

Dirección actual: Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Av. Michoacán y la Purísima s/n col. Vicentina, Iztapalapa. C.P. 09340 México, D. F.

Correo electrónico: cnoe@xanum.uam.mx

ABSTRACT. Recent studies on high levels of inducible enzymes production such as α -amylase, pectinase, and tanase by certain microorganisms during Solid State Culture (SSC) have called strongly the attention. Apparently, this is due to apparent absence of catabolic repression, still when high levels of glucose are added, while that in the Liquid State Culture (LSC) to low concentrations of glucose, a marked repression of the synthesis of such enzymes is showed. Several theories have been proposed to explain this phenomenon, but still, no one has demonstrated which are the causes of its manifestation. In this work, main aspects of induction and catabolic repression of enzymes are reviewed, and possible causes of the apparent absence of catabolic repression of enzymes in SSC are presented.

RESUMEN. Los altos niveles de producción de enzimas inducibles tales como la α -amilasa, pectinasa y tanasa por ciertos microorganismos durante los procesos de Cultivo en Medio Sólido (CMS) han llamado la atención en los últimos años; al parecer, esto se debe a que en tales condiciones no se ejerce la represión catabólica, aún cuando los niveles de glucosa adicionados son considerablemente altos; mientras que en el Cultivo en Medio Líquido (CML) con bajas concentraciones de glucosa, existe una marcada represión de la síntesis de dichas enzimas. Diversas teorías han sido propuestas para explicar dicho fenómeno, pero hasta ahora, ninguna ha demostrado cuales son las causas por las cuales se presenta. En este trabajo se revisan los aspectos generales de la inducción y represión catabólica de enzimas y se presentan las posibles causas de la ausencia aparente de la represión catabólica enzimática en el CMS.

INTRODUCTION

La represión catabólica por definición representa la interrupción de la expresión de genes que codifican la síntesis de enzimas inducibles. La biosíntesis de enzimas microbianas involucra serios problemas, principalmente económicos, cuando la producción de éstas, se realiza por procesos de cultivo en medio líquido (CML) con fines comerciales.¹⁴ Para evitar este complejo mecanismo regulatorio, se han propuestos nuevos modelos de producción de enzimas microbianas, tales como, cultivos continuos o por lote alimentado, así como la obtención de cepas mutantes resistentes a represión catabólica. Algunos de estos modelos son imprácticos o difíciles de ejecutar.³⁴

En los últimos años, diversos autores han mostrado que el proceso de cultivo en medio sólido (CMS), minimiza la presencia de este fenómeno; tal como lo demuestran los resultados sobre la producción de α -amilasa,^{33,34} endo y exopoligalacturonasa,³⁷ tanasa²⁵ y proteasa.²⁰

En este trabajo se presentan aspectos generales sobre los fenómenos de inducción enzimática y represión catabólica; se hace énfasis en los principales hallazgos sobre la capacidad del proceso de CMS para minimizar la represión

catabólica; se discuten las principales causas que inciden en este fenómeno y finalmente se sugieren algunas áreas futuras de investigación que permitan entender detalladamente la existencia de estos patrones de producción, cuando se comparan el CMS y el CML.

ASPECTOS GENERALES

El crecimiento bacteriano en medios con dos fuentes de carbono presenta un comportamiento denominado como diauxia o de dos fases;²² éste se manifiesta, ya que el microorganismo utiliza primero al sustrato de más fácil asimilación (que incluye el transporte y el metabolismo del compuesto) o con el cual se requiera el mínimo consumo de energía para introducirlo y metabolizarlo. Cuando éste se acaba, consumirá la otra fuente de carbono para la que requiera un gasto energético mayor.

En el metabolismo bacteriano, este fenómeno conocido como represión catabólica, se presenta por la inhibición del transporte activo provocado por la alta concentración de uno de los azúcares que ingresan por el sistema fosfotransferasa. Este proceso regulatorio consiste básicamente en la

A Comparison of Methods to Determine Tannin Acyl Hydrolase Activity

Cristóbal Aguilar¹, Christopher Augur^{2*}, Gustavo Viniegra-González¹ and Ernesto Favela¹

¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Izapalapa, México, D.F. 09340; ²Institut de Recherche pour le Développement, IRD-Mexique, Cicerón 609, Los Morales, México, D.F. 11530, Mexico

ABSTRACT

Six methods to determine the activity of tannase produced by *Aspergillus niger* Aa-20 on polyurethane foam by solid state fermentation, which included two titrimetric techniques, three spectrophotometric methods and one HPLC assay were tested and compared. All methods assayed enabled the measurement of extracellular tannase activity. However, only five were useful to evaluate intracellular tannase activity. Studies on the effect of pH on tannase extraction demonstrated that tannase activity was considerably under-estimated when its extraction was carried out at pH values below 5.5 and above 6.0. Results showed that the HPLC technique and the modified Bajpai and Patil methods presented several advantages in comparison to the other methods tested.

Key words: Tannin acyl hydrolase, assay, polyurethane foam, solid state fermentation, tannase

INTRODUCTION

Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) or tannase is an enzyme which hydrolyses the ester and depside bonds of hydrolysable tannins and gallic acid esters (Lekha and Losane, 1997). It breaks down tannic acid, releasing gallic acid and glucose (Haworth *et al.*, 1958). Tannase is produced by fungi, mainly by species of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma* (Iibuchi *et al.*, 1967; Rajakumar and Nandy, 1983; Kawakubo *et al.*, 1991; Lekha and Lonsane, 1994; Garca-Peña, 1996; Bajpai and Patil, 1996), but also by bacteria (Deschamp *et al.*, 1983) and yeast (Aoki *et al.*, 1976). Tannase activity has also been detected in the fruit of several plants (Sourlangas, 1947; Madhavakrishna *et al.*, 1960).

The major commercial applications of tannase are in the manufacture of instant tea or acorn wine and the production of gallic acid (Coggon *et al.*, 1975; Chae and Yu, 1983; Pourrat *et al.*, 1985). The latter is a key intermediate required for the synthesis of an antifolic antibacterial

drug, trimethoprim, used in the pharmaceutical industry (Sittig, 1988). Gallic acid is also a substrate for the chemical or enzymatic synthesis of propyl gallate in the food industry. In addition, tannase is used as a clarifying agent in wine, fruit juices and coffee-flavoured soft drinks (Lekha *et al.*, 1993).

Several titrimetric (Nishira, 1961; Haslam and Stangroom, 1966; Yamada *et al.*, 1967), photometric (Chen, 1969), colorimetric (Haslam and Tanner, 1970), UV-spectrophotometric (Iibuchi *et al.*, 1967; Aoki *et al.*, 1976; Rajakumar and Nandy, 1983; Sanderson *et al.*, 1974; Bajpai and Patil, 1996) and chromatographic (Jean *et al.*, 1981; Beverini and Metche, 1990) methods to quantify enzyme-released gallic acid have been proposed. Some methods are non specific or present problems in determining an endpoint accurately. In addition, conditions of enzymatic reaction are different. Some others are long and tedious, requiring an extended reaction time. Often, non readily available substrates are used. In the spectrophotometric method described by Sanderson *et al.* (1974), tannase activity was not expressed in standard international units.

* Author for correspondence.

Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures

Cristóbal Noé Aguilar ^a, Christopher Augur ^b, Ernesto Favela-Torres ^a,
Gustavo Viniegra-González ^{a,*}

^a Biotechnology Department, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Deleg. Iztapalapa, Col. Vicentina, Av. Michouacán y La Purísima,
s/n PO Box 55 353 09340, Iztapalapa, Mexico

^b Institut de Recherche pour le Développement, IRD-México, France

Received 10 June 2000; accepted 3 October 2000

535

Abstract

Induction and repression patterns of tannase production by *Aspergillus niger* Aa-20 in solid-state (SSC) and submerged culture (SmC) were established. Tannic acid and glucose were used as carbon sources. Induction and repression ratios were obtained with different concentrations of tannic acid and glucose, respectively. Tolerance to high concentrations of tannic acid by *A. niger* Aa-20 was lower in SmC than in SSC. In SSC an increase in tannic acid enhanced the expression of tannase activity. The addition of glucose ($> 20 \text{ g l}^{-1}$) resulted in strong catabolite repression in SmC system. The tannase biomass yield in SSC was at least 2 times higher than in SmC. The results presented demonstrate the capacity of SSC to minimize catabolite repression. The role of gallic acid in tannase regulation was also studied. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Tannase; Solid-state culture; Submerged culture; Induction; Catabolite repression

1. Introduction

Tannase or tannin acyl hydrolase (EC, 3.1.1.20) catalyses the breakdown of hydrolysable tannins or gallic acid esters. This enzyme is used in the industrial processing of fruit juices and coffee-flavoured soft drinks as a clarifying agent, but the major commercial applications of the tannase are in the manufacture of instant tea and in the production of gallic acid [12]. Production of tannase has been reported both by submerged culture (SmC) [1,6,8,9,13] and solid-state culture (SSC) [6,13] techniques.

Differences in enzymic activity titres have been obtained when an enzyme is produced in SSC and SmC. Higher enzyme activities have been reached using the SSC system. Enzymes such as α -amylase [2], pectinases, [3–5] tannin acyl hydrolase [6] and proteases [7] have been considered in these comparative studies. In many of the cases, high sugar concentrations have been re-

lated to high enzyme production in SSC, whereas in SmC, enzyme production was repressed [1,5]. Several hypothesis have been proposed to explain this behaviour. Ramesh and Lonsane [1] suggested that the SSC system minimizes the catabolite repression phenomenon; Maldonado and Strasser de Saad [4] showed that these differences were related to changes in some fatty acids in membranes of the fungal cells. Except for this last report, none of the studies mentioned show experimentally that glucose represses enzyme synthesis by catabolite repression mechanism in SmC system and that SSC minimizes this regulatory mechanism. A precise description of the phenomenon is necessary before proposing explanations concerning possible causes.

Some studies concerning optimum production and regulatory aspects of tannase by moulds have been carried out in SmC systems by Bradoo et al. [8] and Bajpai and Patil [9]. Tannases are induced by tannic acid or by some of its derivatives [8] but the regulatory mechanism of its production remains uncertain. In the present study, tannase was used as a model system to view experimentally the differences in enzyme regulation mechanism in both culture systems.

* Corresponding author. Tel.: + 52-58046355; fax: + 52-58046355.
E-mail address: vini@xanum.uam.mx (G. Viniegra-González).

Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid state fermentations: Influence of glucose and tannic acid

Cristóbal Noé Aguilar^{1,2}, Christopher Augur³, Ernesto Favela-Torres^{2*} and Gustavo Viniegra-González²

¹*Food Research Dept. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coah., México*

²*Biotechnology Dept. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F.*

³*Institut de Recherche pour le Développement, IRII-France*

Running head: Influence of substrate concentration on fungal tannase production...

* Author for correspondence. E. Favela-Torres. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Col. Vicentina, Deleg. Iztapalapa, 09340, México, D.F. Tel: +5804-4999, Fax: +5804-6555, E-mail: favela@xanum.uam.mx

Summary

Tannase production by *Aspergillus niger* Aa-20 was studied in submerged (SmF) and solid-state (SSF) fermentation systems with different tannic acid and glucose concentrations. Tannase activity was at least 2.5 times higher in SSF than in SmF. Addition of high tannic acid concentrations increased total tannase activity in SSF, while in SmF it was decreased. In SmF, total tannase activity increased from 0.57 to 1.03 IU when the initial glucose concentration increased from 6.25 to 25 g/L, but a strong catabolite repression of tannase synthesis was observed in SmF when an initial glucose concentration of 50 g/L was used. In SSF, maximal values of total tannase activity decreased from 7.79 to 2.51 IU when the initial glucose concentration was increased from 6.25 to 200 g/L. Some kinetic parameters such as specific substrate uptake and specific product formation rates, product yield and substrate uptake percent were evaluated. Tannase titers produced by *A. niger* Aa-20 are fermentation system-dependent, favouring SSF over SmF.

Keywords: tannase, glucose, tannic acid, submerged and solid-state fermentations.

INFLUENCE OF CARBON SOURCE ON TANNASE PRODUCTION BY
ASPERGILLUS NIGER AA-20 IN SOLID STATE CULTURE

C. N. Aguilar^{1,2}, C. Augur^{2,3}, G. Viniegra-González², E. Favela-Torres²

¹Food Research Dept. Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo. P.O. Box 252, 25 000. Coah., México; ²Biotechnology Dept. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. P.O. Box 55-535, 09340. México, D.F.; ³Institut de Recherche pour le Développement. IRD-México. Cicerón 609. Les Morales. 11530, México, D.F.

Running title: Tannase production in SSC

1. Introduction

At present, coffee pulp is one of the most abundant agro-industrial wastes and pollutants generated by the coffee industry. The utilization of coffee pulp as animal feed has been investigated for several years (De Roza *et al.*, 1985), but its chemical composition is a great limiting factor due to the presence of anti-physiological factors such as caffeine, polyphenolic compounds and tannins (Hakil *et al.*, 1998), which include tannic acid in high concentrations (3-4%). Tannins are water-soluble phenolic compounds with molecular weights ranging from 500 to 3000 Da. These are present in several plants acting structurally as pigments and protecting from microbial attacks (Lekha and Lonsane, 1997).

Coffee pulp has been suggested useful for the production of value-added products such as enzymes. It contains high amounts of soluble sugars (Delgado, 1999). The removal of tannins from coffee pulp could be carried out in three ways, with chemical means, by microbes, or by the direct use of tannin-hydrolysing enzymes. The first option is not recommended due to the use of toxic salts or solvents, which involves high costs. Microbial or enzymatic tannin removal presents several advantages on process costs and controls. Several tannase-producing micro-organisms have been reported, which mainly



**III Seminário Internacional sobre
Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira
III International Seminar on
Biotechnology in the Coffee Agroindustry**

24 - 28 de maio May 24 - 28, 1999

PROGRAMA E RESUMOS



PRODUCTION OF FUNGAL TANNASE IN A MODEL SYSTEM BY SOLID STATE FERMENTATION

Cristóbal Aguilar¹, Christopher Augur², Gustavo Viniegra¹ & Ernesto Favela¹

¹Biotechnology Dept. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.

²Institut de Recherche pour le Développement, IRD-México.

Coffee pulp is considered the most abundant waste and pollutant material produced by the coffee industry. Its utilization as animal feed is limited by presence of antiphysiological factors, such as polyphenolic compounds, among which, tannic acid is present in high concentrations (3-4%). Thus, the use of tannase-producing fungal strains to degrade tannins might be an alternative in order to use coffee pulp as animal feed; in addition, tannase production from this material by solid state fermentation (SSF) might be an attractive possibility. The production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 was evaluated. Several concentrations of tannic acid (12.5, 25, 50 and 100 g/L) were tested in a model system. Column reactors were packed with polyurethane foam impregnated with liquid medium and inoculated with spores. Tannase production was carrying out for 48 h. Tannic acid uptake was measured by the phenol-sulphuric method and extracellular and intracellular tannase activities were assayed by HPLC-chromatography. Tannase activity increased with increasing concentration of tannic acid. Maximum extracellular and intracellular tannase activities (11.35 and 6.95 U/mL respectively) were recorded with 100 g/L of tannic acid. The substrate uptake was 100% at concentrations of 12.5, 25 and 50 g/L, while 74.4% was consumed in the presence of 100 g/L of tannic acid after 48 h of culture. These results suggest that high concentrations of tannins can be removed by SSF and tannase production can be reached in high titers. Future work will evaluate the effect of tannase on the levels of tannins of coffee pulp.

Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería

Huatulco, Oaxaca, México
Septiembre de 1999

La SMBB otorga el presente

Diploma a:

*Cristobal Noé Aguilar, Christopher Augur, Gustavo Finiegra
González y Ernesto Favela Torres*

por haber participado
en los congresos con el trabajo:

EFFECTO DE LOS ACIDOS GALICO Y TANICO EN LA PRODUCCION DE
TANASAS DE *Aspergillus niger* Aa-20



Dr. Enrique Galindo
Presidente



Dra. Mayra de la Torre
Presidenta del Comité Organizador



Sociedad Mexicana
de Biotecnología y
Bioingeniería A.C.

EFFECTO DE LOS ACIDOS GALICO Y TANICO EN LA PRODUCCION DE TANASA DE *Aspergillus niger* Aa-20

Cristóbal Noé Aguilar, Christopher Augur*, Gustavo Viniegra González y Ernesto Favela Torres
Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina, Deleg. Iztapalapa, México, D.F. 09340 MEXICO
Fax: +5723-6355, email: cnoe@xanum.uam.mx

*Institute de Recherche pour le Développement (IRD-Mexique), FRANCIA

Palabras clave: tanasa, ácido tánico, ácido gálico

Introducción. La enzima tanasa (EC 3.1.1.11) cataliza la hidrólisis de los enlaces éster de los taninos hidrolizables y es producida por bacterias, levaduras y hongos. La tanasa es una enzima poco estudiada pero utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica (1). Los aspectos relacionados con su mecanismo de regulación han sido pobremente estudiados y los reportes existentes son muy escasos (2). Generalmente, se ha reportado que el ácido gálico puede reducir la síntesis de la tanasa, pero esto resulta cuestionable por la misma naturaleza estérica de la enzima. Adicionalmente, se ha sugerido que esta enzima es constitutiva (3).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de la tanasa usando la cepa de *Aspergillus niger* Aa-20 y como agentes inductores el ácido tánico y el ácido gálico.

Metodología. La cepa de *A. niger* Aa-20 (colección UAM-) se cultivó en matraces Erlenmeyer de 250mL con el medio reportado por Lekha y Lonsane (1), usando NH_4SO_4 como la fuente de nitrógeno. Para determinar el papel inductor del ácido gálico y ácido tánico (como únicas fuentes de carbono y energía) se llevaron a cabo cinéticas de producción (48h) de la enzima, utilizando concentraciones molares iguales. Un testigo adicional incluyó el uso de glucosa como única fuente de carbono.

Resultados y discusión. La Tabla 1 presenta las actividades máximas obtenidas con los diferentes sustratos usados.

Tabla 1. Actividad tanasa máxima (U/ml) de *A. niger* Aa-20

Forma de expresión	Glucosa	Acido tánico	Acido gálico
Extracelular	0.52 ± 0.002	1.97 ± 0.003	N.D.
Intracelular	0.52 ± 0.001	0.19 ± 0.004	0.014 ± 0.001

N.D. no detectada por la sensibilidad del método

El uso de glucosa permitió conocer los valores de actividad basal de la enzima, la cual fue expresada tanto en forma intracelular como extracelular y son generalmente considerados como niveles constitutivos de la enzima (3). En el cultivo con ácido gálico se vio la incapacidad de éste para inducir la actividad tanasa; además, la presencia de esta molécula generó una decremento en la expresión basal de la actividad enzimática, lo que permite establecer que el ácido gálico es un regulador negativo de la actividad tanasa producida por *A. niger* Aa-20. Mientras tanto los resultados obtenidos en los cultivos donde se empleó el ácido tánico como inductor demostraron que éste favorece la expresión

de la actividad tanasa. Estos resultados concuerdan con los reportados por Bradoo y col. (3). En este cultivo, la máxima expresión tanto de la actividad extracelular como intracelular se alcanza a las 40 y 24h de fermentación, respectivamente (Figura 1). Estos resultados difieren de los reportados por Lekha y Lonsane (1), quienes reportan la máxima expresión de la actividad después de las 70 horas

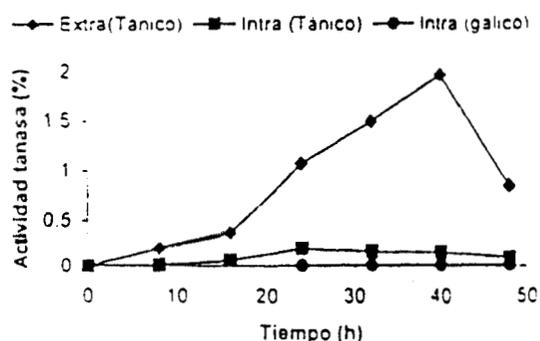


Figura 1. Cinética de producción de la tanasa de *A. niger* Aa-20

Para el cultivo con ácido gálico, la tanasa se expresó intracelularmente únicamente después de las 24 horas de fermentación a niveles por debajo de la actividad basal.

Conclusiones. La adición del ácido gálico afectó negativamente los niveles basales de la tanasa, mientras que el uso del ácido tánico estimuló la expresión de la actividad tanasa tanto intracelular como extracelular, concluyendo que la tanasa es una enzima inducida por ácido tánico o alguno de sus derivados excluyendo a los productos finales de su hidrólisis, el ácido gálico y la glucosa.

Agradecimientos. C.N. Aguilar agradece la beca otorgada por CONACYT. El trabajo se realizó dentro del acuerdo de cooperación entre CONACYT-México y el IRD-Francia.

Bibliografía.

- Lekha, P.K. y Lonsane, B.K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Proc. Biochem.* 29, 497-503.
- Lekha, P.K. y Lonsane, B.K. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* 44, 213-260.
- Bradoo, S., Gupta, R. y Saxena, R. (1997). Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tanase from *Aspergillus japonicus*. *Proc. Biochem.* 32, 135-139.

Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería

*Huatulco, Oaxaca, México
Septiembre de 1999*

La SMBB otorga el presente

Diploma a:

Cristóbal Noé Aguilar, Christopher Augur, Gustavo Viniegra
González y Ernesto Favela Torres

por haber participado
en los congresos con el trabajo:

PRODUCCION DE UNA TANASA FUNGICA POR CULTIVOS EN MEDIOS
LIQUIDO Y SOLIDO



Dr. Enrique Galindo
Presidente



Dra. Mayra de la Torre
Presidenta del Comité Organizador



**Sociedad Mexicana
de Biotecnología y
Bioingeniería A.C.**

PRODUCCION DE UNA TANASA FUNGICA POR CULTIVOS EN MEDIOS LIQUIDO Y SOLIDO

Cristóbal Noé Aguilar, Christopher Augur*, Gustavo Viniegra González y Ernesto Favela Torres
Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina, Deleg. Iztapalapa, México, D.F. 09340 MEXICO
Fax: +5723-6355, email: favela@xanum.uam.mx

*Institute de Recherche pour le Développement (IRD-Mexique), FRANCIA

Palabras clave: *tanasa, ácido tánico, cultivo en estado sólido*

Introducción. La enzima tanin acil hidrolasa (EC 3.1.1.11) tanasa, cataliza la hidrólisis de los enlaces éster de los taninos hidrolizables y se usa en la industria procesadora de vinos como agente clarificante, en la elaboración de té instantáneo y en la producción del ácido gálico (1). Su producción a nivel industrial es vía microbiológica empleando cultivos sumergidos (CSm). Una alternativa es la producción en cultivos en estado sólido (CES), sobre lo cual existen pocos reportes (2,3) en los que se indican reactivas ventajas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de la tanasa producida por *Aspergillus niger* Aa-20 en dos sistemas de producción diferentes, el CSm y el CES usando ácido tánico como inductor de la actividad tanasa.

Metodología. Para el CES, la cepa de *A. niger* Aa-20 (colección UAM-I) se cultivó en reactores tubulares equipados con espuma de poliuretano impregnada del medio de cultivo previamente inoculado con esporas del microorganismo. El CSm, se realizó en matraces Erlenmeyer de 250mL con 50mL del medio de cultivo portado por Lekha y Lonsane (2), el cual fue también usado en el CES. El medio contenía ácido tánico (50 g/L) como única fuente de carbono y energía. Las cinéticas de producción fueron seguidas durante 48h con muestreos en intervalos de 8h. Los experimentos fueron conducidos por triplicado.

Resultados y discusión. La Figura 1 presenta la cinética de producción de la enzima intracelular en el CES y CSm, alcanzándose títulos mayores para el CES.

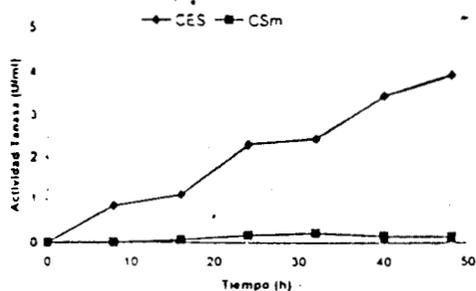


Figura 1. Producción de tanasa intracelular en CSm y CES

Estos resultados difieren de los de Lekha y Lonsane (2), quienes no encontraron actividad de tanasa extracelular en el CSm. Pero confirman la idea de mayor producción de la enzima por el CES.

La Figura 2, presenta la cinética de producción de la tanasa extracelular en CES y CSm, donde también los títulos de actividad fueron mayores para el CES.

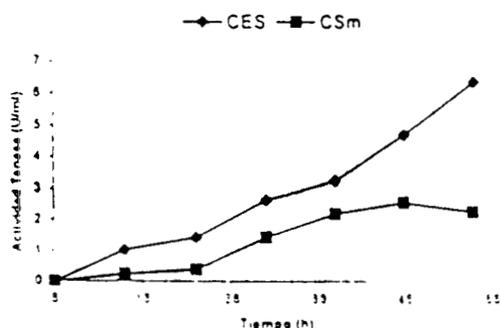


Figura 2. Producción de tanasa extracelular en CSm y CES

Las productividades fueron de 6,667 UE/Lh y 1,275 UE/Lh para el CES y el CSm, respectivamente. La enzima tanasa máxima expresada intracelularmente se produce 18 veces más en CES que en CSm, mientras que la actividad extracelular es 2.5 veces mayor en CES que en CSm.

Conclusiones. El CES evaluado permitió la obtención de altos títulos de actividad tanasa con mayor productividad que el CSm, lo que representa ventajas atractivas si se consideran aspectos económicos en su producción.

Agradecimientos. C.N. Aguilar agradece al CONACYT la beca doctoral. El trabajo forma parte del acuerdo de cooperación establecido entre CONACY-México y el IRD-Francia

Bibliografía.

- Lekha, P.K. y Lonsane, B.K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Proc. Biochem.* 29, 497-503.
- Lekha, P.K. y Lonsane, B.K. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* 44, 215-260.
- Chatterjee, R., Dutta, A., Banerjee, R. y Bhattacharyya. (1997). Production of tannase by solid-state fermentation. *Bioprocess eng.* 14, 159-162.

S7 Enzyme production studies on solid state Fermentation.
 E. Favela*, M.E. Acuña, C. Aguilar, Ch. Augur, M. Gutiérrez, S. Solis and G. Viniegra. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535, México, D.F.; e-mail: favela@xanum.uam.mx and (*) Institut de Recherche pour le Développement, IRD, Cicerón 609, Col. Los Morales, 11530, México, D.F. Pectinase production by solid state fermentation (SSF) studies have shown that extracellular enzyme production by *Aspergillus niger* was not affected by catabolic repression at carbon source or inducer concentrations as high as 100 g/L. Pectinase activity and productivity were up to 10 and 20 times higher than those obtained in submerged fermentation (SmF). This apparent lack of catabolic repression might be due to the very high rate of substrate uptake observed in SSF processes. Although differences in cell wall composition of cells growing in submerged and solid state fermentation have been demonstrated, differences in substrate diffusion in both types of cultures may also play a critical role in the differences in enzyme production and substrate uptake. Moreover, kinetic and physicochemical properties of the produced enzymes were also influenced by the type of culture used. Pectinases produced by SSF were more thermostable than those produced by SmF. Higher K_m values were obtained for the endo-pectinase and pectin-lyase produced by SSF.

S9 Enzyme production by solid substrate fermentation
 K. Filer, Alltech, Inc., Nicholasville, KY.
 Solid substrate fermentation (SSF) systems are being developed for the production of enzymes. Enzymes are used commercially in the animal feed industry to improve animal performance. Most enzymes are produced from microbial sources using either submerged liquid (SLC) or SSF techniques. Advantages of SSF over SLC have led to further developments in SSF systems. In many cases, the medium is simple, consisting of unrefined agricultural products such as wheat bran. The concentrated nature of the substrate means that smaller reactors can be used in SSF than SLC. The entire product can be dried, ground, and fed to the animal, resulting in less waste and less downstream processing. With certain enzymes, the limited downstream processing results in desirable side enzyme activities. Because of the complex nature of animal feed ingredients, side activities are extremely beneficial in the animal industry. A tray bioreactor fermentation system is being developed for the production of phytase. Laboratory production has demonstrated phytase expression at 1,000 phytase units/gram dry substrate with substantial side activities of other desirable enzymes. In addition to this tray fermentation system a pilot scale deep bed fermentation vessel is being investigated.

S11 Commercial mass production of entomogenous fungi - the rest of the story. S.T. Jaronski*, R. DeMaio, Mycotech Corporation, Butte MT. Entomopathogenic hyphomycetes such as *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, and *Metarhizium anisopliae* have been receiving increasing commercial attention in recent years. In the U.S. several products based on these fungi have been registered as mycoinsecticides. Achieving the technical feat of growing these fungi in liquid or on solid substrate fermentation is just the beginning of the commercialization path. Many issues central to the cost competitive and consistent mass production of a commercially viable product also need to be addressed. These issues are the "rest of the story." Beyond technical scale up concerns, which can be considerable, are all the variables that affect the consistency of a fungal product once routine production is initiated, e.g., genetic drift during production, maintaining production and recovery efficiencies, purity (biological and chemical) of the end product, physical characteristics, vis a vis its suitability for the chosen formulation process, and shelf life, esp. as affected by events during fermentation, recovery, formulation, packaging and distribution. We will address some of these critical aspects within the context of our experience in commercializing *Beauveria bassiana*.

S8 Solid-substrate fermentation with a white-rot fungus for mechanical pulping processes Masood Akhtar, Vice President (Research & Development), Biopulping International, Inc., P.O. Box 3463, Madison, WI-53705. The mechanical pulping process is electrical energy intensive and results in poor paper strength compared to the chemical pulping process. Chemical (kraft) pulp is sometimes added to mechanical pulp to impart paper strength, but it is more expensive than mechanical pulp. Biomechanical pulping, defined as the fungal pretreatment of wood chips prior to mechanical pulping, has the potential to ameliorate these problems. In an effort to commercialize biomechanical pulping technology, fifty tons of spruce wood chips (dry weight basis) were inoculated with the best biopulping fungus, in a continuous operation and stored in the form of an outdoor chip pile for two weeks. The pile was ventilated with conditioned air to maintain the optimum growth temperature (27-32°C) and moisture (50-60% on a wet weight basis) throughout the pile. The control and fungus-treated chips were refined through a thermomechanical pulp (TMP) line producing lightweight coated paper. The fungal pretreatment saved 33% electrical energy and improved paper strength properties significantly compared to the control. Since biofibers were stronger than the conventional TMP fibers, the amount of bleached softwood kraft pulp was reduced by at least 5% in the final product.

S10 The relative merits of submerged and solid production of fungi for biological control
 A.T. Gillespie*, Chr. Hansen A/S, Horsholm, Denmark.
 Fungi have great promise for biological control but this potential has not yet been realised, in part, due to problems in producing spores at a low cost and with an adequate shelf life. In general, solid production techniques have shown most promise for the nematode trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*, and for the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus*. Factors affecting spore yield and quality in solid production will be highlighted using examples from the named fungi. Emphasis will be laid on physical factors including light, moisture and temperature.

S12 Production of the Mycoestrogenic Compound Zearalenone by Solid Substrate Fermentation
 M.P. Wach*, L.A. MacDonald and G.D. Walker.
 The estrogenic substance, Zearalenone is among a group of compounds known as Resorcylic Acid Lactones. It is naturally produced by the fungus *Gibberella zeae* (*G. zeae*), also cited as *Fusarium graminearum*, and may appear as a contaminant on corn stored as animal feed. Commercially, Zearalenone is subjected to a chemical reduction to produce Zearanol, which is routinely used to stimulate growth in field grazed cattle. Approximately 25 million doses valued at about \$22 million are sold annually. Commercial production of Zearalenone is typically accomplished through a liquid fermentation process. Small-scale preparative fermentations are carried out in order to produce enough inoculum to seed the larger scale commercial batch. Productive strains of *G. zeae* are capable of producing 10g/L of high quality Zearalenone. We have developed an economical, solid substrate fermentation system, which utilizes proprietary technology to produce Zearalenone aseptically in discrete units. The effects of strain selection, maintenance, substrate and fermentation conditions will be discussed as they relate to the development of a commercially applicable system for the production of biopharmaceuticals.

EFFECT OF SUCROSE CONCENTRATION ON APICAL GROWTH OF *ASPERGILLUS NIGER* Aa-20 IN SOLID-STATE FERMENTATION

Cristóbal Noé Aguilar, Christopher Augur*, Ernesto Favela-Torres**, and Gustavo Viniestra-González**
Food Research Department, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coah., México
*Institut de Recherche pour le Developpement, CCRC, Univ. of Georgia, Athens, USA
**Department of Biotechnology, Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340, México, D.F.
Tel-Fax : 58.04.65.55, email: cn_aguilar@yahoo.com

Key words: apical growth, *Aspergillus niger* Aa-20, solid-state fermentation

Introduction. During Solid State Fermentation (SSF) fungal strains typically grow by an invasive growth process (1). At present, this capacity has been evaluated on agar media, only. In addition, reports about the effect of substrate concentration on fungal growth are very scarce, as it is very difficult to estimate biomass concentration. Moreover, the very nature of common supports does not permit the evaluation of the invasive capacity of the fungal strains. On complex supports, generally, specific growth rate has been associated with production rate of CO₂ (2).

In this context, in the present work an attempt was made to evaluate the effect of substrate concentration on growth rate of *Aspergillus niger* Aa-20 in SSF with a direct microscopy method for the analysis of apical growth.

Methodology. *Aspergillus niger* Aa-20 strain (IRD-UAMI collection) was used. Polyurethane foam powder was impregnated with liquid culture medium at several sucrose concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150 and 200 g/L). Tubular reactors of 20 g of capacity were used. A bed (1 cm) of the same material fermented with hyphal cells of *A. niger* Aa-20, was put in an inferior section of the reactors. Culture conditions were: 30°C, initial pH of 5.5, moisture content of 65% and an aeration rate of 20 ml./min. Apical growth (in mm) of the fungus was monitored in an Olympus stereoscope (10X) over a time range of 220 h. Four readings were taken per sampling time. All experiments were conducted in triplicates and mean values are reported below.

Results and discussion. During the first 24 h of culture, *A. niger* Aa-20 grew through the broken structure of the polyurethane foam. Then, the fungus formed cellular complex nets in the porous spaces of the support. Maximal growth values of *A. niger* Aa-20 increased with increments in the initial sucrose concentration. For all experiments, a typical growth profile was found, in which the exponential growth phase started at 12 h of culture and was present during the first 100 h, being faster at higher sucrose concentrations. After this time, the fungus grew slowly, showing the spore formation phase. This behavior could be explained by the fact that, the fungus took the surrounding substrate during its growth, resulting in concentration micro-gradients, which would be faster at higher substrate concentrations (3).

Figure 1 shows the effect of initial sucrose concentration on the growth rate of *A. niger* Aa-20 grown on polyurethane foam in a SSF process. Low initial sucrose concentrations in a range of 6.25 to 50 g/L, affected the apical growth rate of *A. niger* Aa-20 in SSF, which increased from 0.19 to 0.31 mm/h. At sucrose concentrations higher than 50 g/L, apical growth rate was very slow, in a range between 0.30 and 0.36 mm/h. However, these results were lower (1.8 times at least) than those reported by the same strain on agar (4).

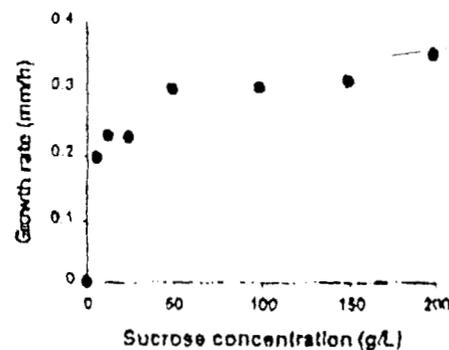


Figure 1. Effect of sucrose concentration on the apical growth rate of *Aspergillus niger* Aa-20 in SSF

Conclusions. Microscopic measure of apical growth of *A. niger* Aa-20 in SSF on polyurethane foam, showed that fungal growth rate is highly dependent on the substrate concentration at values below 50 g/L, whilst, at high values, the growth rate is slow. It was demonstrated that its invasive capacity of the fungus on solid support is seriously limited by substrate concentration.

Acknowledgements. This work was supported by CONACYT, IRD and UAMI.

References.

1. Trinci, J.P. (1969), *J. Gen. Microbiol.* 57, 11-24.
2. Saucedo-Castañeda, G. et al (2000), *Proc. Biochem.* 2 13-24.
3. Viniestra-González, G. (1997), In *Advances in Bioprocess Engineering II*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 123-135.
4. Gutiérrez-Sánchez, G. et al., (1999), VIII SMI Congress. Huatulco, México

APENDICE II

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos de la selección y caracterización del soporte usado en el CMS. Es importante recordar que las pruebas llevadas a cabo fueron la evaluación de la retención de agua y el porcentaje de humedad en el punto máximo de retención de agua. Las muestras de PUF se sumergieron en agua destilada durante 3 minutos, y posteriormente se removieron y colocaron en cajas de petri hasta que drenaran el exceso de líquido, para finalmente pesarse. Los resultados de la retención de agua se expresan en g de agua por g de PUF y la humedad en porcentaje. La siguiente tabla presenta los resultados obtenidos:

Retención de agua (RA) y porcentaje de humedad (%H) de las diferentes espumas de poliuretano evaluadas

PUF STD 17		PUF SF 30		PUF SF 40		PUF SF 20-24	
RA	%H	RA	%H	RA	%H	RA	%H
48.25 ± 5.0	97.9 ± 0.3	27.73 ± 0.4	96.51 ± 0.03	30.06 ± 0.7	96.78 ± 0.1	41.91 ± 1.7	97.7 ± 0.1

El PUF estándar 17 y el super firme 20-24 presentaron los valores mayores de retención de agua (48 y 42, respectivamente) y del porcentaje de humedad (97.9 y 97.7), respectivamente. Los resultados del análisis estadístico no mostraron diferencia significativa a un $\alpha = 0.05$ entre el PUF estándar 17 y el super firme 20-24, pero nos permitió eliminar a los PUF's super firme 30 y 40. Para seleccionar entre el STD 17 y el SF 20-24 se consideraron algunas características tales como el color, precio y disponibilidad. Las principales diferencias entre los dos PUF fueron que el STD 17 posee un colorante amarillo y el SF 20-24 es blanco, el STD 17 es menos disponible que el SF 20-24, por la demanda en la industrial local. Con este argumento se seleccionó el PUF SF 20-24.

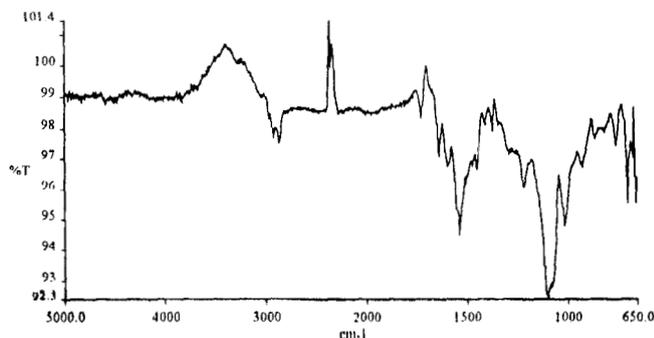
La caracterización del PUF SF 20-24 incluyeron los siguientes análisis:

caracterización química (CIQA, Perkin-Elmer México)

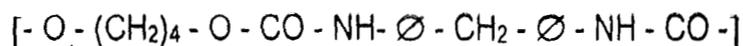
caracterización microscópica (CIQA)

Los resultados obtenidos demostraron que el PUF evaluado posee estabilizadores de luz ultravioleta, se degrada térmicamente a 300°C, posee retardantes de flama y trazas de reactantes y contiene bajos niveles de urea.

El análisis en espectroscopia de infrarrojo nos permitió obtener el siguiente espectro:

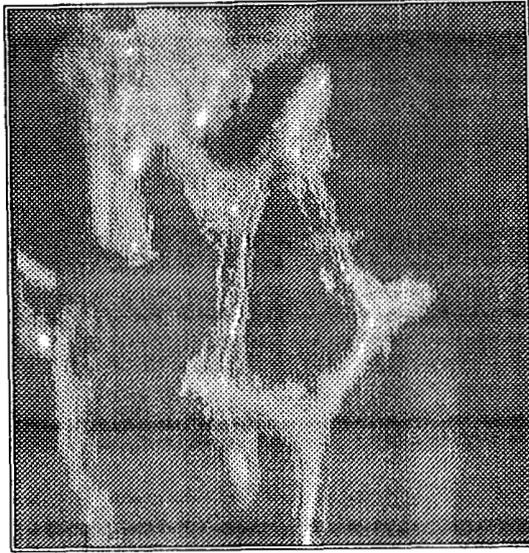


Con los resultados obtenidos del análisis químico se obtuvo la siguiente estructura del PUF SF20-24:



que corresponde al 1,4 butanodiol + metileno-bis(4-fenil-diisocianato).

El análisis microscópico del PUF se llevó a cabo en un microscopio Olympus UX60 adaptado a un analizador de imagen plus 3.2, con un lente 50 X, y nos reveló que la estructura de las trabeculas se rompe al ser pulverizado durante la etapa de pretratamiento para ser usado como soporte.



El PUF SF 20-24 posee celdas de 0.6 mm (poros), su pared mide 0.24 mm y posee una longitud por celda de 1.2 mm.

La prueba final de caracterización del PUF consistió en la determinación del punto crítico de humedad a diferentes concentraciones de sales minerales. Es decir, las muestras de PUF se impregaron con agua, con el medio de cultivo reportado por Lekha y Lonsane (1994) y con dicho medio concentrado cinco veces. Posteriormente las muestras se secaron en la termobalanza OAHUS a 5 watts de potencia ($\approx 128^{\circ}\text{C}$) y se graficó el contenido de agua (g agua/ g de solidos) vs tiempo (min). Con estos datos se calcularon las diferentes velocidades de secado, las cuales se graficaron contra el contenido de humedad y se obtuvieron los puntos críticos de humedad (PCH), es decir, el punto de cambio en la velocidad, provocado por la eliminación del agua libre y el agua parcialmente ligada.

Estos resultados nos permitieron usar el PUF como soporte en el CMS, ya que los valores obtenidos para el PCH nos indican que podemos modificar el porcentaje de humedad en los rangos necesarios para llevar a cabo el cultivo sólido (65 a 75 %), sin alterar la disponibilidad del agua contenida en el

soporte, por cambios en el PCH.

Los resultados fueron los siguientes:

Muestra	PCH (%)	Aw
PUF + agua	33 - 39	0.998
PUF + medio	45 - 55	0.995
PUF + medio concentrado	55 - 60	0.977