

**EFFECTO DEL  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  Y  $Fe^{2+}$  SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE  
AMILOGLUCOSIDASA GENERADA POR *ASPERGILLUS NIGER* EN  
FERMENTACIÓN SÓLIDA Y SUMERGIDA**

**POR: CARLOS EDUARDO DELGADO SIERRA.**

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA E INGENIERÍA DE  
PROTEÍNAS.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA  
COLOMBIA  
2006**

**EFFECTO DEL  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  Y  $Fe^{2+}$  SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE  
AMILOGLUCOSIDASA GENERADA POR *ASPERGILLUS NIGER* EN  
FERMENTACIÓN SÓLIDA Y SUMERGIDA**

**POR: CARLOS EDUARDO DELGADO SIERRA.**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE QUÍMICO.**

**DIRIGIDO POR: RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ  
PROFESOR ESCUELA DE QUÍMICA.  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA  
COLOMBIA  
2006**

*Nota de aceptación.*

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**FIRMA DE DIRECTOR**

---

**FIRMA DEL JURADO**

---

**FIRMA DEL JURADO**

## **DEDICATORIA**

**A mi madre, mi padre, y en general toda  
mi familia, a todos los profesores y  
amigos que estuvieron presentes en las  
buenas y malas de mi proceso de  
formación profesional**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por todo el apoyo recibido durante estos años de mi vida académica.

A los calificadores por acompañarme en el proceso de evaluación.

A todos y cada uno de los amigos reales que con todo lo que tuvieron a su alcance me colaboraron y apoyaron, de los cuales me llevo muy buenos recuerdos.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 MARCO DE ANTECEDENTES .....	3
2.2 HONGOS .....	4
2.2.1 <i>ASPERGILLUS NIGER</i> .....	5
2.3 ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS .....	6
2.3.1 LA GLUCOAMILASA (GA) .....	9
2.3.1.1 Estructura .....	9
2.3.1.2 Mecanismo de acción .....	11
2.4 SUSTRATO .....	12
2.5 MODALIDADES DE CULTIVO DE <i>A. NIGER</i> .....	12
2.6 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES .....	14
2.7 CINÉTICA DE CRECIMIENTO .....	16
3. OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivo General .....	18
3.2 Objetivos Específicos .....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
4.1 MATERIALES .....	19
4.1.1 REACTIVOS .....	19
4.1.2 SUSTRATO .....	19
4.1.3 ENZIMAS .....	19
4.2 MÉTODOS .....	19
4.2.1 METODOLOGÍA .....	19
4.2.2 PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO .....	19
4.2.3 SOLUCIÓN DE ESPORAS .....	20
4.2.4 MEDIO SÓLIDO .....	20
4.2.5 MEDIO LÍQUIDO .....	21
4.2.6 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE IONES EN LA PRODUCCIÓN DE GLUCOAMILASA .....	22
4.2.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	22
4.2.8 ANÁLISIS DE LA GLUCOSA .....	23
4.2.9 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES .....	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
5.1 PRODUCCIÓN DE GLUCOAMILASA POR FERMENTACION SÓLIDA .....	25
5.1.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA EL MEDIO SÓLIDO .....	25
5.1.2 PRODUCCIÓN DE GLUCOAMILASA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA .....	26
5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	27
5.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO .....	27
5.2.1.1 Medio sólido suplementado con $Mg^{+2}$ .....	28

5.2.1.1.1 Actividad volumétrica para el medio sólido suplementado con Mg <sup>+2</sup> .....	28
5.2.1.1.2 Actividad específica para el medio sólido suplementado con Mg <sup>+2</sup> .....	29
5.2.1.2 Medio sólido suplementado con Zn <sup>+2</sup> .....	30
5.2.1.2.1 Actividad volumétrica para el medio sólido suplementado con Zn <sup>+2</sup> .....	30
5.2.1.2.2 Actividad específica para el medio sólido suplementado con Zn <sup>+2</sup> .....	30
5.2.1.3 Medio sólido suplementado con Fe <sup>+2</sup> .....	31
5.2.1.3.1 Actividad volumétrica para el medio sólido suplementado con Fe <sup>+2</sup> .....	31
5.2.1.3.2 Actividad específica para el medio sólido suplementado con Fe <sup>+2</sup> .....	32
5.2.1.4 Medio sólido suplementado con Cu <sup>+2</sup> .....	33
5.2.1.4.1 Actividad volumétrica para el medio sólido suplementado con Cu <sup>+2</sup> .....	33
5.2.1.4.2 Actividad específica para el medio sólido suplementado con Cu <sup>+2</sup> .....	34
5.2.2 IONES Y CONCENTRACIÓN ÓPTIMA PARA EL MEDIO SÓLIDO....	34
5.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SUMERGIDO .....	35
5.2.3.1 Medio líquido suplementado con Fe <sup>+2</sup> .....	35
5.2.3.1.1 Actividad volumétrica para el medio líquido suplementado con Fe <sup>+2</sup> .....	35
5.2.3.1.2 Actividad específica para el medio líquido suplementado con Fe <sup>+2</sup> .....	36
5.2.3.2 Medio líquido suplementado con Cu <sup>+2</sup> .....	37
5.2.3.2.1 Actividad volumétrica para el medio líquido suplementado con Cu <sup>+2</sup> .....	37
5.2.3.2.2 Actividad específica para el medio líquido suplementado con Cu <sup>+2</sup> .....	38
5.2.3.3 Medio líquido suplementado con Zn <sup>+2</sup> .....	38
5.2.3.3.1 Actividad volumétrica para el medio líquido suplementado con Zn <sup>+2</sup> .....	38
5.2.3.3.2 Actividad específica para el medio líquido suplementado con Zn <sup>+2</sup> .....	39
5.2.3.4 Medio líquido suplementado con Mg <sup>+2</sup> .....	40
5.2.3.4.1 Actividad volumétrica para el medio líquido suplementado con Mg <sup>+2</sup> .....	40
5.2.3.4.2 Actividad específica para el medio líquido suplementado con Mg <sup>+2</sup> .....	41
5.2.4 IONES Y CONCENTRACIÓN ÓPTIMA PARA EL MEDIO LÍQUIDO .....	42
5.3 MEZCLA DE IONES EN EL FERMENTADOR .....	42

5.3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MEZCLA DE IONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	44
5.3.2 ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA EL MEDIO SÓLIDO SUPLEMENTADO CON LA MEZCLA DE IONES .....	44
5.3.3 ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA EL MEDIO LÍQUIDO SUPLEMENTADO CON LA MEZCLA DE IONES .....	45
5.4 IONES METÁLICOS COMO COFACTORES ENZIMÁTICOS.....	46
5.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HUMEDAD PARA EL MEDIO SÓLIDO .....	47
5.6 PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN EL FERMENTADOR LÍQUIDO .....	47
6. CONCLUSIONES .....	50
7. RECOMENDACIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
ANEXOS.....	58

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Árbol filogenético de <i>Aspergillus</i> (18), mostrando las 7 subfamilias de hongos productores de la glucoamilasa.....	5
<b>Esquema 2.</b> Colonia de <i>Aspegillus niger</i> .....	6
<b>Esquema 3.</b> Postulado estructural de la glucoamilasa de <i>Aspergillus niger</i> .....	10
<b>Esquema 4.</b> Dominio catalítico de la glucoamilasa.....	10
<b>Esquema 5.</b> Mecanismo de acción para la glucoamilasa.....	11

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cinética de producción de la amiloglucosidasa por <i>A.niger</i> en medio sólido.....	25
<b>Figura 2.</b> Cinética de producción de la amiloglucosidasa por <i>A.niger</i> en medio líquido.....	26
<b>Figura 3.</b> Cinética para la producción de biomasa en medio líquido.....	27
<b>Figura 4.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Mg^{+2}$ en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	28
<b>Figura 5.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Mg^{+2}$ en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	29
<b>Figura 6.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Zn^{+2}$ en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	30
<b>Figura 7.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Zn^{+2}$ en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	31
<b>Figura 8.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Fe^{+2}$ en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Fe^{+2}$ en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	32
<b>Figura 10.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Cu^{+2}$ en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	33
<b>Figura 11.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Cu^{+2}$ en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	34
<b>Figura 12.</b> Ion y concentración optima para el medio sólido.....	35
<b>Figura 13.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Fe^{+2}$ en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	36

<b>Figura 14.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Fe^{+2}$ en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	36
<b>Figura 15.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Cu^{+2}$ en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	37
<b>Figura 16.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Cu^{+2}$ en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	38
<b>Figura 17.</b> . Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Zn^{+2}$ en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	39
<b>Figura 18</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Zn^{+2}$ en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	39
<b>Figura 19.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Mg^{+2}$ en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	40
<b>Figura 20.</b> Efecto de la adición de diferentes cantidades de $Mg^{+2}$ en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de <i>A.niger</i> .....	41
<b>Figura 21.</b> Ion y concentración optima para el medio líquido.....	42
<b>Figura 22.</b> Actividad específica para el medio sólido suplementado con la mezcla de iones.....	44
<b>Figura 23.</b> Actividad específica para el medio líquido suplementado con la mezcla de iones.....	45
<b>Figura 24.</b> Porcentaje de humedad para el medio sólido.....	47

<b>Figura 25.</b> Promedio de la producción de biomasa en el fermentador líquido para cada ion.....	48
<b>Figura 26.</b> Curva de calibración para la determinación de glucosa utilizando el método del DNS .....	58
<b>Figura 27.</b> Curva de calibración para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford.....	59

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación científica del <i>Aspergillus niger</i> .....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de las enzimas según su función.....	8
<b>Tabla 3.</b> Ion, concentración y actividad enzimática para la fermentación en medio sólido.....	43
<b>Tabla 4.</b> Ion, concentración y actividad enzimática para la fermentación en medio líquido.....	43
<b>Tabla 5.</b> Combinación de iones.....	43
<b>Tabla 6.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con $Mg^{+2}$ .....	60
<b>Tabla 7.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con $Zn^{+2}$ .....	60
<b>Tabla 8.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con $Fe^{+2}$ .....	61
<b>Tabla 9.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con $Cu^{+2}$ .....	61
<b>Tabla 10.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con $Fe^{+2}$ .....	62
<b>Tabla 11.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con $Cu^{+2}$ .....	62
<b>Tabla 12.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con $Zn^{+2}$ .....	63

<b>Tabla 13.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con $Mg^{+2}$ .....	63
<b>Tabla 14.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con la mezcla de iones.....	64
<b>Tabla 15.</b> Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con la mezcla de iones.....	64
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de humedad para el medio sólido suplementado con $Mg^{+2}$ .....	65
<b>Tabla 17.</b> Porcentaje de humedad para el medio sólido suplementado con $Zn^{+2}$ .....	65
<b>Tabla 18.</b> Porcentaje de humedad para el medio sólido suplementado con $Fe^{+2}$ .....	66
<b>Tabla 19.</b> Porcentaje de humedad para el medio sólido suplementado con $Cu^{+2}$ .....	66
<b>Tabla 20.</b> Cantidad de biomasa seca producida en el cultivo líquido suplementado con $Mg^{+2}$ .....	67
<b>Tabla 21.</b> Cantidad de biomasa seca producida en el cultivo líquido suplementado con $Zn^{+2}$ .....	67
<b>Tabla 22.</b> Cantidad de biomasa seca producida en el cultivo líquido suplementado con $Cu^{+2}$ .....	68
<b>Tabla 23.</b> Cantidad de biomasa seca producida en el cultivo líquido suplementado con $Fe^{+2}$ .....	68

## TITULO

### **EFEECTO DEL $Zn^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Cu^{2+}$ Y $Fe^{2+}$ SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE AMILOGLUCOSIDASA GENERADA POR *ASPERGILLUS NIGER* EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y SUMERGIDA \***

Autor: Carlos Eduardo Delgado S. \*\*

Palabras claves:

*Aspergillus niger*, amiloglucosidasa, fermentación sólida, fermentación sumergida

En este proyecto se recopiló evidencia cualitativa como cuantitativa sobre el efecto de 4 iones metálicos ( $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+}$  y  $Cu^{+2}$ ) sobre la biosíntesis de la amiloglucosidasa generada por la especie *Aspergillus niger* utilizando fermentación sólida y sumergida.

La actividad del extracto enzimático fue determinada con el método del DNS a diferentes tiempos de reacción. La cantidad de proteína se cuantificó utilizando el método de BRADFORD. El porcentaje de humedad se determinó utilizando el peso del medio sólido húmedo y seco.

Las concentraciones óptimas para el medio sólido son:  $Mg^{+2}$  2 ppm,  $Cu^{+2}$  250 ppm,  $Zn^{+2}$  2 ppm y  $Fe^{+2}$  10 ppm. Para el medio líquido las condiciones óptimas son:  $Mg^{+2}$  250 ppm,  $Zn^{+2}$  2 ppm,  $Fe^{+2}$  250 ppm y  $Cu^{+2}$  10 ppm.

La adición de mezclas de iones en los fermentadores líquido y sólido desactivan la enzima producida haciendo que la actividad catalítica disminuya.

---

\*Proyecto de grado

\*\*Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Dr. Rodrigo Torres Saez.

## TITLE

**Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> Y Fe<sup>2+</sup> EFFECT OVER THE BIOSYNTHESIS OF AMILOGLUCOSIDASE GENERATED BY THE *ASPERGILLUS NIGER* IN SOLID AND SUBMERGED FERMENTATION.\***

Author: Carlos Eduardo Delgado S. \*\*

Keywords:

*Aspergillus niger*, amiloglucosidase, solid fermentation, submerged fermentation.

In this project qualitative and quantitative evidence of the four metallic ions was compiled (Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>) over the biosynthesis of the amiloglucosidase generated by the *Aspergillus niger* species using solid and submerged fermentation.

The enzymatic extract activity was determined with the DNS method in different reaction times. The quantity of protein was quantized using the BRADFORD method. The humidity percentage was determined using the solid, humid and dry environment weight.

The optimums concentrations to the solid environment are: Mg<sup>2+</sup> 2 ppm, Cu<sup>2+</sup> 250 ppm, Zn<sup>2+</sup> 2ppm y Fe<sup>2+</sup> 10 ppm. The optimums concentrations to the liquid environment are: Mg<sup>2+</sup> 250 ppm, Zn<sup>2+</sup> 2 ppm, Fe<sup>2+</sup> 250 ppm y Cu<sup>2+</sup> 10 ppm.

The addition of the mixing ions in the liquid and solid fermenters deactivate the enzyme produced, making the catalytic activity decrease.

---

\* Project of degree

\*\* Faculty of sciences. School of chemistry: Dr. Rodrigo Torres Saez.

## 1. INTRODUCCIÓN

El *Aspergillus* es un género que comprende más de 200 especies de hongos, de tipo filamentoso y que está compuesto de cadenas de células llamadas hifas. Fue catalogado por primera vez por el científico italiano P. Micheli en 1929 [Al-Mussallam, 1980]; reside habitualmente en sitios de compostaje y en el heno. En este estudio se trabajó con la especie *Aspergillus niger*, la cual es cultivada en general para ser utilizada en la producción de ácido glucónico, ácido cítrico y de enzimas como la glucoamilasa y galactosidasa [Pandey *et al.*, 2000].

La enzima glucoamilasa o [ $\alpha$ -(1,4)-D- glucan glucohidrolasa] fue descubierta en 1951 y es conocida a nivel industrial como amiloglicosidasa [Phillips, 1951]. Entre otras reacciones, esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1,4) de los azúcares [Pandey, 1995], propiedad que es utilizada generalmente en procesos de la industria alimenticia y textil [Selvakumar *et al.*, 1996].

A nivel estructural la glucoamilasa está constituida por tres dominios estructurales principales [Kramer, 1993]; un dominio catalítico donde se llevan a cabo las reacciones de glucólisis (utilizando los residuos aminocídicos del ácido glutámico 147 y 400), un dominio de unión al almidón y un puente aminolítico que une ambos dominios [John R, 2002]. La glucoamilasa presenta su máximo de actividad a una temperatura de 50°C y un pH de 4.3 - 4.5, donde casualmente son más estables los productos de glucólisis del almidón como la glucosa y otros malto-oligosacáridos [Gregg L.F, 2001].

En este trabajo se obtuvo la enzima cultivando el *Aspergillus niger* bajo dos modalidades de cultivo, fermentación en estado sólido y sumergida, cultivando el hongo bajo condiciones óptimas de temperatura y pH, y usando un medio de cultivo con fuentes de carbono, nitrógeno, agua y sales. Además, se adicionaron los iones  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  en diferentes concentraciones y relaciones de

adición al medio de cultivo, para evaluar su efecto en la biosíntesis de la enzima [Yusuka y Morita, 1996].

Se utilizaron los iones,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , ya que en estudios previos realizados con el microorganismo *Rhizopus* sp A-11 (Fujio y Morita, 1996) se utilizaron 14 iones metálicos diferentes, los cuales mostraron un efecto significativo sobre la producción de la glucoamilasa. En este caso, se espera un efecto similar sobre la especie de trabajo, *A niger*.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 MARCO DE ANTECEDENTES

Pandey, es quizás uno de los científicos más aventajados en lo que se refiere a pruebas de medios de cultivo con microorganismos (1994). En 1995 probó la fermentación en medio sólido usando como sustrato residuos de copra, alcanzando un 70% de la producción de glucoamilasa, en comparación con el salvado de trigo que es el mejor sustrato. Posteriormente en 1998 en colaboración con los científicos L. Ashakumary y P. Selvakumar realizaron una investigación sobre la biosíntesis de glucoamilasa utilizando fermentación en estado sólido con residuos de té como sustrato, logrando solo un 50% de la biosíntesis de la amiloglucosidasa en comparación con el sustrato salvado de trigo, pero la enzima producida resistía mejor la temperatura sin desnaturalizarse.

En 1996 paralelo al trabajo de Pandey, A. los científicos Yusuka Fujio y Horoshi Morita, trabajaron con el *Rhizopus* sp A-11, perteneciente al grupo de hongos que biosintetizan la glucoamilasa, verificando el resultado de la adición de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ , al medio de cultivo, en concentraciones de 0 a 500 ppm, concluyendo que la presencia de  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Ca}^{+2}$  en concentraciones de 0.7 y 125 ppm respectivamente, tenían un efecto positivo sobre el crecimiento del *Rhizopus* y la producción de la glucoamilasa.

En 1999 Pendersen, Beyer y Nielsen evaluaron la influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción por lotes de glucoamilasa, concluyendo que con el salvado de trigo como fuente de carbono, y el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, se pueden obtener buenos resultados en la producción de amiloglucosidasa.

Asimismo en el 2005, Anto, Trivedi y Patel trabajaron con el *Aspergillus niger* en medio sólido para producir la glucoamilasa, teniendo como variables la relación de

adición en peso de los sustratos: hojuelas de arroz, salvado de trigo y residuos de copra, obteniendo el máximo aumento en la producción de la amiloglucosidasa cuando se utilizaba el salvado de trigo. Otro aspecto importante en la producción de la glucoamilasa por *A. niger* es el pH del medio de fermentación, tema que fue analizado en profundidad por Gregg en el 2001, quien concluyó que el pH del medio debe estar entre 5 y 6.

Los científicos citados constituyen una parte de la comunidad que han trabajado con el género *Aspergillus*, con el objetivo de producir glucoamilasa, cada uno variando diferentes aspectos en los medios de fermentación.

## **2.2 HONGOS**

Los seres vivos son clasificados para su estudio en grupos grandes y básicos llamados reinos. Los hongos se clasificaron durante muchos años en el Reino de las Plantas. Sin embargo, los biólogos observaron que los hongos mostraban una relación cercana a los animales, pero también que son organismos diferentes, lo cual permitió clasificarlos en su propio Reino.

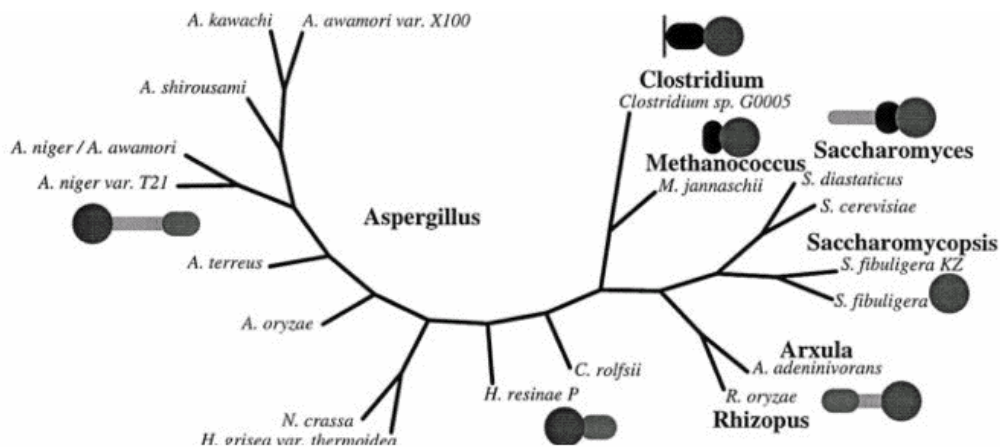
Los hongos se alimentan incorporando nutrientes a partir de material orgánico disponible. Los hongos no poseen estómagos, por lo que tienen que digerir su comida antes de que pueda pasar a través de la pared de la célula a la hifa. La hifa secreta ácidos y enzimas que biodegradan el material orgánico en compuestos de menor complejidad y fáciles de digerir [Whittaker, 1978].

La mayor parte de los hongos se reproducen por esporas, las cuales son diminutas partículas de protoplasma rodeada de pared celular. [Kozakiewicz, 1989].

### 2.2.1 ASPERGILLUS NIGER

Las *Aspergillus* se dividen en las especies señaladas en el esquema 1. [Coutinho, 1997]:

**Esquema 1.** Árbol filogenético de *Aspergillus* (18), mostrando las 7 subfamilias de hongos productores de la glucoamilasa<sup>1</sup>.



Su clasificación científica se muestra en la tabla 1:

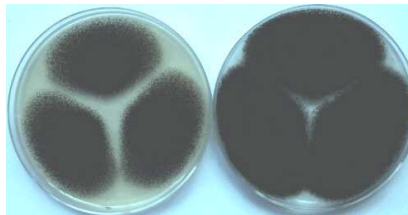
**Tabla 1.** Clasificación científica del *Aspergillus niger*. [<http://www.aspergillus.org.uk/>]

Dominio:	Eukaryota
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subfilo:	Pezizomycotina
Clase:	Eurotiomycetes
Orden:	Eurotiales
Familia:	Trichocomaceae
Género:	<i>Aspergillus</i>
Especie:	<i>Aspergillus Níger</i>

<sup>1</sup> Handbook of food enzymology, cap 58, p 731, 2002.

*A. niger* crece rápidamente sobre una gran variedad de sustratos naturales. Al inicio, se producen las colonias, que forman una base compacta de color blanca o amarilla, que con el tiempo de crecimiento, se convierten en una capa densa de color marrón oscuro [Frioni, 1999].

**Esquema 2.** Colonia de *Aspegillus niger*<sup>2</sup>.



El *Aspergillus niger* se a cultivado para obtener diversos productos biotecnológicos tales como: ácido cítrico, glucónico y enzimas como: glucoamilasa, galactosidasa y lipasas [Frioni, 1999].

### **2.3 ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS**

Desde hace cientos de años se han venido empleando enzimas en procesos de biotransformación tales como la fabricación de quesos, fabricación del pan, vino y cerveza, tal vez sin conocimiento de causa, pero fue en 1860 cuando Luis Pasteur descubrió que las enzimas estaban íntimamente ligadas con la estructura vital de las células de la levadura. Posteriormente, en 1876, Willian Kuhne propuso el nombre de enzima, término que deriva de las palabras griegas en (en) y zyme (levadura). Para 1897, Eduard Buchner probó que las enzimas podían ser

---

<sup>2</sup> <http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?languages/index.php~main>,  
abril 1998.

extraídas de las células de las levaduras y catalizar reacciones por sí mismas [O Brein, 1995]

A partir de este descubrimiento, se empezaron a utilizar diferentes sustratos para biosintetizar diferentes enzimas con múltiples aplicaciones que hicieron que su empleo se extendiera a diversas ramas de la industria, tales como detergentes, fabricación del papel, textil, tratamiento de cueros, farmacia, destilería, aceites y grasas, almidones y azúcares.

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, tienen la capacidad de acelerar ciertas reacciones químicas. Son proteínas complejas que producen un cambio químico específico sobre otras sustancias sin que exista un cambio sobre sí mismas. Las enzimas se pueden encontrar en todos los órganos del cuerpo; por ejemplo, están presentes en la boca (saliva), estómago (jugo gástrico) e intestinos (jugo pancreático, jugo intestinal y mucosa intestinal) y pueden convertir almidones, proteínas y azúcares en sustancias digeribles [O Brein, 1995] .

Las enzimas como proteínas, tienen estructuras tridimensionales complejas de cadenas polipeptídicas, las cuales dependen de los estados de oxidación de los grupos amino y carboxílicos; por consiguiente, la estabilidad estructural depende del pH. La temperatura es otro factor que influye sobre la estructura de la proteína, debido a que altas temperaturas pueden desnaturalizar su estructura principalmente por el rompimiento de enlaces de puente de hidrógeno que mantienen su estructura terciaria y cuaternaria. Un gran número de enzimas contienen constituyentes no peptídicos, como por ejemplo, cadenas con alto contenido de carbohidratos. Este tipo de enzimas no pueden funcionar por sí solas, y necesitan un constituyente no peptídico llamado *cofactor*, el cual puede ser un ión o una molécula [Sauer, 2000].

La enzimología o ciencia encargada del estudio de las enzimas siempre es un tema de actualidad en la biotecnología. En los últimos años, esta ciencia ha experimentado grandes avances al igual que sus aplicaciones en la industria

alimentaria, farmacéutica, de detergentes, panadería y papelera, entre otras. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan ventajas frente a los catalizadores no biológicos, [Norouzian, 2005].

Las enzimas son clasificadas según su función de la siguiente forma:

**Tabla 2.** Clasificación de las enzimas según su función. [IUPAC comisión de enzimas].

<b>Oxidoreductasas</b>	Reacciones de óxido-reducción.
<b>Tranferasas</b>	Transferencia de grupos funcionales de una sustancia a otra.
<b>Hidrolasas</b>	Hidrólisis de sustancias.
<b>Liasas</b>	Ruptura de moléculas por procesos distintos a los utilizados por la hidrolasa.
<b>Isomerasas</b>	Interconversión de isómeros.
<b>Ligasas</b>	Unión de compuestos.

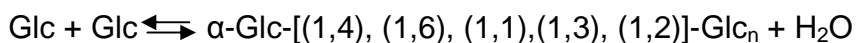
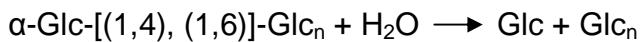
Los procesos biocatalíticos normalmente involucran el cultivo y uso de microorganismos y el uso de enzimas aisladas solubles o inmovilizadas en medios acuosos o inorgánicos que contienen compuestos orgánicos como sustrato.

La función principal de las enzimas de tipo hidrolasas es, entre otras, reducir el tamaño de grandes polímeros en cadenas más cortas. Estas enzimas actúan principalmente sobre enlaces de tipo éster, glucosídico, peptídico y enlaces de tipo C-N. Dentro de estas se destacan: proteasas, amilasas ( $\alpha$  y  $\beta$  amilasa, glucoamilasas, isoamilasas o pululanasa),  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa o galactasa, invertasa, enzimas pectinolíticas, celulasas, hemicelulosas y dextranasas.

### 2.3.1 LA GLUCOAMILASA (GA)

La Glucoamilasa es una enzima que posee 3 dominios estructurales, es una de las enzimas de tipo hidrolasa con mayor aplicación a nivel de laboratorio e industrial, y comercialmente es conocida como amiloglicosidasa. Estas enzimas tienen su máximo de aplicación en el campo de la alimentación, donde son utilizadas en la producción de jarabes de glucosa.

La glucoamilasa promueve la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1,4),  $\alpha$ -(1,6),  $\alpha$ -(1,3) y  $\alpha$ -(1,2) glucosídicos. En presencia de altas concentraciones de almidón la **GA** cataliza las siguientes reacciones:



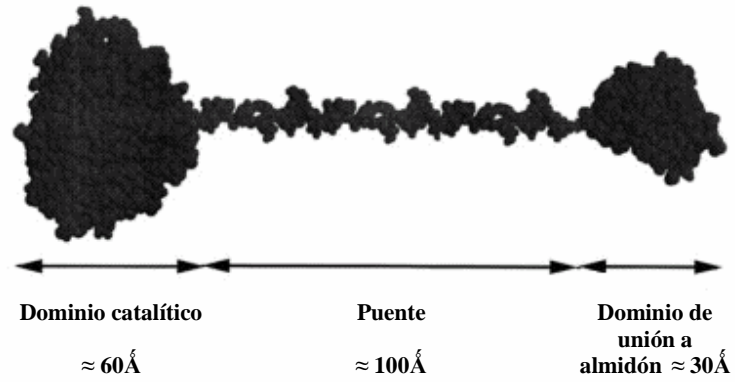
Estos procesos de hidrólisis son llevados a cabo en un rango de temperatura entre 50-60 °C y a un pH de 4.3-4.5 donde la enzima presenta su mayor actividad catalítica [Jhon R, 2002].

#### 2.3.1.1 Estructura

La estructura de la enzima glucoamilasa está constituida por tres subestructuras principales [Coutinho, 1997]:

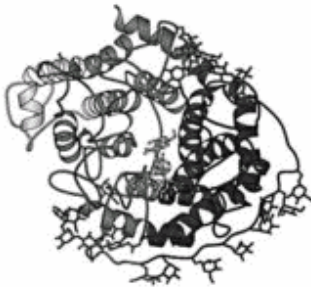
1. Dominio catalítico (CD)
2. Puente de unión
3. Dominio de almidón ligado (SBD)

**Esquema 3.** Postulado estructural de la GA de *Aspergillus niger*<sup>3</sup>.



### **Dominio catalítico (CD)**

**Esquema 4.** Dominio catalítico de la glucoamilasa<sup>4</sup>.



Degrada los oligosacáridos uniéndose a sus terminaciones no reducidas, produciendo glucosa [Norouzian, 2005].

### **Puente de union**

Es el encargado de establecer un puente enlazante entre el dominio catalítico y el dominio de unión al almidón.

<sup>3</sup> Handbook of food enzymology, cap 58, p 729, 2002.

<sup>4</sup> Handbook of food enzymology, cap 58, p 730 2002.

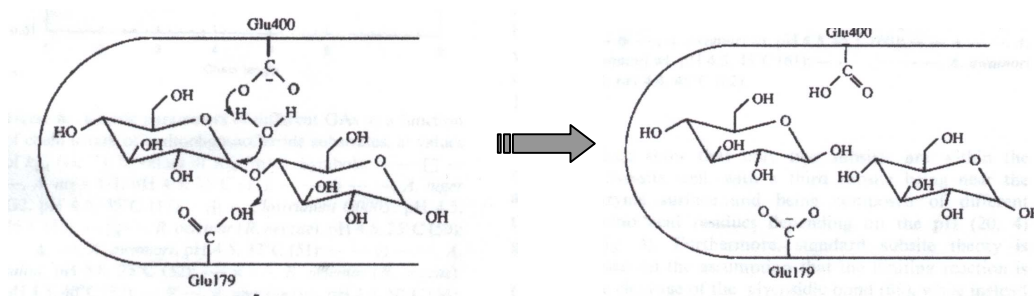
### **Dominio de unión al almidón (SBD)**

Es el encargado de unir la enzima al almidón puro y a la pared celular. Está constituido de 8 hebras  $\beta$ , organizados en 2 hojas  $\beta$  formando una estructura de  $\beta$  cilindro enrollado [Cornett, 2003].

#### **2.3.1.2 Mecanismo de acción**

La hidrólisis se produce por un mecanismo de desplazamiento donde intervienen los residuos Glu179 y Glu400 en sus estados ácido y básico, respectivamente. El residuo Glu179 dona un protón al oxígeno que pertenece al enlace glucosídico. Luego, el residuo Glu400 extrae un protón del agua del medio. El  $\text{OH}^-$  liberado ataca al carbono 1 del azúcar liberando dos nuevos sacáridos. Al mismo tiempo, se presenta una inversión en la configuración de los residuos del ácido glucónico, así, el que presentaba características básicas ahora tiene características ácidas y viceversa [McCarter, 1994].

**Esquema 5.** Mecanismo de acción para la glucoamilasa<sup>5</sup>.



<sup>5</sup>Handbook of food enzymology, cap 58, p 732, 2002.

## **2.4 SUSTRATO**

El almidón es el principal polisacárido de reserva de la mayoría de los vegetales, y la principal fuente de calorías de la mayoría de la humanidad.

Lo que se llama almidón no es realmente un polisacárido, sino la mezcla de dos, la amilosa y la amilopectina. Ambos están formados por unidades de glucosa, en el caso de la amilosa, es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -D-(1,4), que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades. En el caso de la amilopectina, ésta contiene ramificaciones que le dan una forma molecular parecida a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa, constituyendo alrededor del 75% de los almidones más comunes [Buendía, 2001].

## **2.5 MODALIDADES DE CULTIVO DE *A. NIGER*.**

Los cultivos de hongos adoptan un modelo de crecimiento diferente cuando son cultivados en sustratos líquidos ó sólidos.

Bajo fermentación sumergida, ellos son expuestos a fuerzas hidrodinámicas, mientras que el crecimiento en estado sólido es restringido a la superficie de la matriz [Papagianni, 1999].

### **Fermentación en medio sólido**

La definición más general y reciente para la fermentación en medio sólido propone que, "es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles". Esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles en agua [Viniestra, 1997].

### **Fermentación sumergida**

La fermentación en medio líquido emplea grandes cantidades de agua que puede operarse en forma estéril con gran facilidad. Como requisito indispensable los nutrientes utilizados en este medio deben ser solubles, para que puedan ser incorporados por los microorganismos a su metabolismo [Papagianni et al, 2001].

Los principales parámetros que intervienen en la eficiencia de la fermentación en medio sólido y líquido son: la temperatura, y pH del medio, la concentración de los nutrientes y la aireación.

Algunas ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido comparada con el cultivo sumergido se nombran a continuación;

#### **Ventajas:**

- Los medios de cultivo son simples y generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

#### **Desventajas:**

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.
- Los procesos de transferencia de masa son limitados por la difusión.

- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos [Doelle, 1992].

## 2.6 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular. Los microorganismos heterotróficos como el *A.niger* necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular.

Los requerimientos de otros macronutrientes como P y S son suministrados en forma de iones  $HPO_4^{2-}$  y  $SO_4^{2-}$ . Los requerimientos de K y Mg son también esenciales.

Con respecto a los micronutrientes se distinguen 2 categorías:

a. los que son frecuentemente esenciales en el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn. b. Los que son raramente esenciales como B, Na, AL, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I. En general los requerimientos de trazas de elementos son conocidos cualitativamente [Merchuk, 1994].

Aunque en ocasiones es difícil demostrar el requerimiento de un micronutriente por parte de un organismo, ya que generalmente éste se encuentra presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Es importante tener en cuenta también que los requerimientos de estos compuestos pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a "stress", como por ejemplo, un aumento de la temperatura por encima del valor óptimo [Feroza et al., 1998].

Aparte de su presencia en el medio de cultivo, los nutrientes deben estar disponibles para ser usados por la célula.

Cuando se habla de iones metálicos es importante tener en cuenta que su concentración es modificada por quelación, ya que constituyentes del medio y productos del metabolismo actúan como agentes complejantes o precipitantes, como es el caso de los aminoácidos, hidroxiácidos, hidróxidos y los iones  $\text{PO}_4^{2-}$ .

En general se puede decir que todo material insoluble en el medio de cultivo va a tener una determinada capacidad de unión a elementos metálicos disminuyendo su concentración efectiva [Merchuk, 1994].

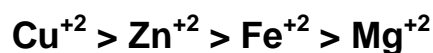
La dinámica de formación del complejo está determinada por la constante de equilibrio de formación del complejo metal-ligando;  $K_f$ , y por la velocidad a la cual el equilibrio es alcanzado.

La constante de equilibrio para la formación del complejo del ion metálico (M) con el ligando (L) se expresa de la siguiente forma:

$$K = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}] [\text{L}]}$$

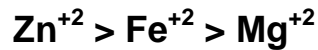
El valor de K es prácticamente independiente de la naturaleza del ligando, ya que depende particularmente del ion metálico.

Los iones utilizados durante este estudio presentan valores decrecientes de la constante de equilibrio tal como se muestra a continuación:



Lo que indica que el ion  $\text{Cu}^{+2}$  estará en mayor proporción en el medio formando un ion complejo.

Por otro lado, la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio también tiene una serie de orden decreciente de velocidades de acuerdo al ion como se ve a continuación:



De la serie se puede deducir por ejemplo que el ion  $\text{Mg}^{+2}$  estará generalmente libre pero si está complejado se hará disponible muy lentamente [Merchuk, 1994].

## 2.7 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

El crecimiento de un hongo puede iniciarse a partir de una espora o de una fracción viable de hifa. Dicho crecimiento se da en forma polarizada o apical, porque la elongación de la superficie se da en un punto y no en toda la célula. Esta característica ocasiona que las células de los hongos (exceptuando las levaduras) tengan una estructura cilíndrica, denominada hifa, delimitada por una pared que se extienden de manera ramificada para formar un sistema hifal conocido como micelio.

El crecimiento sólo se da en la parte apical de la hifa, la cual tiene la capacidad de elongarse alejándose del centro de la colonia. El ápice penetra nuevos territorios y establece nuevas fronteras [Trinci, 1969 y 1971]. Debido a esto, y según el tamaño y edad de la colonia, un hongo puede presentar de manera simultánea una zona de crecimiento, una zona de poco o nulo crecimiento e inclusive, una zona de autólisis.

El crecimiento de un hongo depende del medio de cultivo. Si es líquido y se encuentra en reposo, el crecimiento se da sobre la superficie, pero si el medio es permanentemente agitado, pueden crecer en todo el volumen. Según las condiciones, el hongo puede o no formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pelotitas”.

En medio líquido agitado, los hongos suelen presentar un desarrollo típico, similar al presentado por otros organismos, y que consta de las siguientes fases: latencia, exponencial, declinación, estacionaria y muerte.

Fase de latencia. Empieza inmediatamente después de que el hongo ha sido inoculado en un medio apropiado para su crecimiento. Es una etapa de adaptación en la que no hay crecimiento aparente, solo síntesis de los componentes celulares necesarios para iniciar la elongación celular.

Fase exponencial. Comienza cuando un hongo crece en medio líquido, después de que se ha adaptado al medio de cultivo y está en capacidad de aprovechar al máximo las condiciones que éste le ofrece. Durante esta etapa el hongo alcanzará la tasa de crecimiento máxima permitida por el substrato.

La fase de declinación. Tiene lugar cuando la acumulación de los desechos del metabolismo del hongo alcanzan niveles que inhiben el crecimiento, o cuando alguno de los nutrientes escasea o se termina. Generalmente en estas condiciones la tasa de crecimiento empieza a disminuir de manera paulatina. La importancia de esta disminución depende de la relevancia de los factores o nutrientes agotados.

La fase estacionaria es el punto en el cual el crecimiento cesa, aunque todavía prevalece un metabolismo celular de mantenimiento. Durante esta etapa aún hay consumo de glucosa y otros nutrientes. El hongo en esta fase es aún capaz de reiniciar crecimiento si es resembrado en un medio propicio, aunque tendrá un período de latencia más o menos largo según las condiciones. Durante la fase estacionaria empiezan a aparecer diversos tipos de enzimas autolíticas que conducen a la muerte del hongo [Merchuk, 1994].

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  sobre la biosíntesis de amiloglucosidasa generada por *Aspergillus niger* en fermentación sólida y sumergida.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ➔ Determinar la actividad volumétrica (U/ml) y específica (U/mg de proteína) de la glucoamilasa producida cuando al medio de cultivo sólido se le adicionan soluciones de  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Mg^{+2}$  en seis concentraciones diferentes.
- ➔ Determinar la actividad volumétrica (U/ml) y específica (U/mg de proteína) de la glucoamilasa producida cuando al medio de cultivo líquido se le adicionan soluciones de  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  en seis concentraciones diferentes.
- ➔ Determinar la actividad específica de la glucoamilasa al variar la relación de los iones metálicos en porciones de 1:1 para las combinaciones de  $Cu^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  que presenten mayor actividad por separado en medio líquido y sólido.
- ➔ Identificar la relación existente entre la humedad del medio sólido y la actividad específica de la enzima producida en éste.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 MATERIALES**

#### **4.1.1 REACTIVOS**

Todos los reactivos para elaborar las soluciones y los sustratos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico y proporcionados por Merck y Sigma Chemical Co.

#### **4.1.2 SUSTRATO**

Se utilizó almidón de papa soluble de Sigma-Aldrich Chem. Co, (St. Louis, USA)

#### **4.1.3 ENZIMAS**

Se utilizó la amiloglucosidasa proporcionada por *Novozymes A/S* como estándar.

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 METODOLOGÍA**

Se realizaron fermentaciones bajo dos modalidades de cultivo: medio líquido y sólido, en las condiciones óptimas para un rápido y eficaz crecimiento del *Aspergillus niger*.

#### **4.2.2 PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO**

En 20 tubos de ensayo con tapa se colocaron 3mL de solución de agar papa dextrosa Merck para microbiología al 3.5% p/v [Feroza et al., 1998]. Posteriormente, se esterilizó en un autoclave por 15 minutos a una presión de 15 psi y 120°C [Asghar et al., 2000]. Con un asa metálica se hizo un barrido sobre la superficie del agar solidificado de una porción de la cepa madre de *Aspergillus niger* [Marín y Salazar, 2003] para inocular los tubos esterilizados. Los tubos se taparon ligeramente para no obstruir el paso total del oxígeno. El proceso anterior se realizó en una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de los tubos inoculados.

Los tubos fueron dejados a temperatura ambiente por 6 días. Tras la verificación visual del crecimiento de los hongos, se almacenaron los tubos a 4°C para ser utilizados en la elaboración de la solución de esporas.

#### **4.2.3 SOLUCIÓN DE ESPORAS**

A cada tubo del precultivo se le adicionó 2mL de una solución buffer de acetato de sodio 0.1M y pH 4.5 previamente esterilizado. Con un asa metálica las esporas se removieron con suavidad y fueron puestas en solución. La solución de esporas se preparó minutos antes de ser puesta sobre el medio de cultivo, con el fin de evitar posibles contaminaciones [Anto, 2005].

#### **4.2.4 MEDIO SÓLIDO**

En el medio sólido se utilizó un medio que contenía: 20g de salvado de trigo, 2g de almidón de papa soluble, 20mL de agua desionizada, 10mL de sulfato de amonio 7.3g/L, 10mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5g/L y 10mL de NaCl 01g/L mas 10mL de solución que contenía uno de los siguientes iones metálicos  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , en concentraciones de 2, 5, 10, 15, 50 y 250 ppm. El medio de cultivo respectivo se colocó en frascos de 500mL que estaban cubiertos con un tapón de algodón y gasa que permitía el paso del aire filtrado.

La esterilización del medio se llevó a cabo en un autoclave por 20 minutos a una presión de 15 psi y 120°C. Posteriormente, se realizó la siembra en una cabina de flujo laminar inoculando 2 mL de la solución de esporas sobre el medio. Los medios sembrados fueron puestos en incubación a 30°C sobre un baño termostataado, durante 7 días [Anto, 2005].

#### **Extracción de la glucoamilasa**

Tras el periodo de incubación, el producto obtenido se mezcló para obtener una pasta homogénea entre el medio y los hongos cultivados. Dos gramos de la pasta homogénea se colocaron en un tubo de ensayo, al cual se le adicionaron 20mL de buffer de acetato de sodio 0.1M y pH 4.5. La mezcla resultante fue puesta en

agitación por una hora a 4°C. La solución resultante se centrifugó por 7 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido se almacenó en tubos plásticos que fueron congelados, para ser utilizados posteriormente en la determinación de la actividad enzimática y las proteínas totales.

#### **Determinación del porcentaje de humedad en el medio sólido**

Dos gramos de la pasta homogénea fueron puestos sobre una caja petri, y se introdujeron en un horno a 90°C por 36 horas. Se pesó el material seco para determinar el porcentaje de humedad en la muestra.

#### **4.2.5 MEDIO LÍQUIDO**

El medio líquido estaba compuesto por: 2g de almidón soluble de papa, 0.042g de cloruro de calcio, 0.2g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8g de sulfato de amonio, 0.2g de cloruro de potasio y 3g de salvado de trigo, todos disueltos en 150mL de agua desionizada más 10mL de una solución que contenía uno de los siguientes iones metálicos  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , en concentraciones de 2, 5, 10, 15, 50 y 250 ppm [Yusuka y Morita,1996]. La solución fue puesta en un frasco de 500mL y esterilizada en un autoclave por 15 minutos a 120°C y 15 psi. A continuación, se adicionaron 4mL de la solución de esporas al medio de cultivo y se dejó a temperatura ambiente por 5 días, el pH se ajustó a 6.

#### **Extracción del medio líquido**

La biomasa producida sobre la superficie del líquido fue removida y puesta en un erlenmeyer de 100ml con agitación magnética a 4°C por 10 minutos con 20ml del caldo de cultivo, se centrifugó la solución por 5 minutos a 1000 rpm, el sobrenadante fue almacenado en tubos plásticos y congelado para su posterior análisis de actividad y determinación de proteínas.

#### **4.2.6 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE IONES EN LA PRODUCCIÓN DE GLUCOAMILASA**

Después de conocer los valores óptimos de la concentración de cada ion, que producían los mejores resultados de la actividad específica de la amiloglucosidasa en medio líquido y sólido, se probó el efecto de las siguientes combinaciones de iones en el fermentador sólido y líquido, añadiendo 10mL de cada solución.

$\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ .

Los extractos enzimáticos se obtuvieron siguiendo el procedimiento utilizado en para el medio líquido y sólido.

#### **4.2.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Se utilizó el método del DNS para determinar azúcares reductores. Este reactivo está compuesto de los siguientes reactivos: ácido dinitrosalicílico, que actúa como oxidante; sal de Rochelle (tartrato sódico-potásico) que impide la disolución de oxígeno en el reactivo y hidróxido de sodio que genera el pH requerido para que se de la reacción redox.

Se inició por estandarizar la actividad de una glucoamilasa patrón a cuatro tiempos de reacción, 2, 4, 6 y 10 minutos.

La solución patrón de amiloglucosidasa producida por *A. oryzae* tenía una concentración de 0.4g/L.

En un tubo de ensayo se adicionó 1mL de almidón de papa soluble al 1%(p/v). El tubo fue introducido en un termoreactor TR650 marca MERCK precalentado a 50°C. Se esperaron 3 minutos para que el tubo y la solución alcanzara el equilibrio térmico, 10µL de la solución patrón de glucoamilasa se adicionaron al almidón, tras 2 minutos de reacción, se adicionó 1mL de DNS. El tubo de ensayo fue puesto por 5 minutos en un baño de agua que estaba en ebullición y pasado este tiempo el tubo se colocó en un baño de hielo por otros 5 minutos, y se adicionaron 10mL de agua destilada. La operación anterior se repitió para 4, 6, y 10 minutos.

Para realizar la medición de la absorbancia se comenzó por ajustar el blanco con una solución que contenía 1mL de almidón soluble de papa al 1%, 10 µL de buffer

acetato de sodio 0.1M y pH 4.5 y 1mL de DNS, la mezcla fue calentada por 5 minutos en un baño de agua en ebullición, seguido se pasó por un baño de hielo y se le adicionaron 10mL de agua destilada.

Posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro marca spectronic 20 Genesis [Miller, 1959].

Para determinar la actividad de las soluciones enzimáticas extraídas se siguió el mismo procedimiento.

La actividad se expresó en  $U = \mu\text{mol de glucosa/min}$  [Pendersen, 2000].

#### **4.2.8 ANALISIS DE LA GLUCOSA**

Se realizaron soluciones patrón de glucosa de 0, 0.3, 0.5, 0.8, 1.2, 1.5, 2, y 2.5 mg/mL.

Se tomó 1 mL de cada solución en un tubo de ensayo, se adicionó 1mL de DNS, la mezcla fue puesta en un baño de agua a ebullición por 5 minutos, la reacción fue detenida al pasar el tubo por un baño de hielo un periodo de 5 minutos, se le adicionaron 10 mL de agua destilada, se agitó la mezcla y se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro marca spectronic 20 Genesis, ajustando la longitud de onda a 540nm [Miller, 1959].

Con los valores de absorbancia obtenidos se elaboró una grafica de absorbancia vs. tiempo que sirvió como curva de calibración

#### **4.2.9 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES**

Se siguió el método de *BRADFORD*, método colorimétrico de gran sensibilidad.

Para realizar la curva de calibración se tomaron patrones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1mg/mL de albúmina.

En un tubo de ensayo se tomaron 25 $\mu$ L de la solución de albúmina, se adicionaron 2.5mL de Bradford, pasados 3 minutos de reacción se midió la absorbancia con un espectrofotómetro marca spectronic 20 Genesis ajustando la longitud de onda a 595nm.

Con los datos obtenidos se realizó una curva de absorbancia Vs mg/mL de proteína, que sirvió para determinar la cantidad de proteína en las soluciones enzimáticas extraídas de los medios líquido y sólido [Bradford, 1976].

Para determinar las proteínas totales de las soluciones enzimáticas se siguió el mismo procedimiento pero se tomaron 100  $\mu$ L de solución enzimática.

El reactivo de análisis se preparó diluyendo 100mg de colorante azul brillante de Coomassie G250 en 50mL de etanol (95% de pureza). A esta disolución se le añadieron 100mL de ácido fosfórico (85% w/v). La solución resultante se diluyó hasta un volumen final de 1L con disolución buffer de acetato de sodio 0.05M (pH=6,0)

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

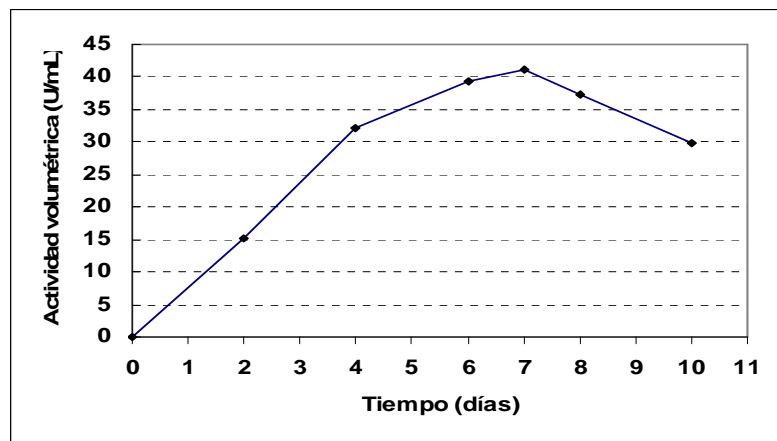
### 5.1 PRODUCCIÓN DE GLUCOAMILASA POR FERMENTACION SÓLIDA

#### 5.1.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA EL MEDIO SÓLIDO.

Las condiciones en las que se evaluó la cinética corresponden las presentadas en la metodología seguida en la fermentación es estado sólido.

Después de la siembra del preinoculo el periodo latente para el crecimiento del *Aspergillus niger* en medio sólido es muy corto (menor a dos días figura 1.), ya que en las primeras 48 horas se alcanza un 37% de la producción de la enzima.

**Figura 1.** Cinética de producción de la glucoamilasa por *A.niger* en medio sólido



Asimismo se observa que durante la elaboración de la solución de esporas el daño al hongo fue mínimo, por consiguiente el periodo de regeneración sobre el medio es transitorio.

A continuación del periodo de adaptación se observa un crecimiento exponencial logrando un máximo de producción pasados siete días de la fermentación, que en términos de actividad volumétrica representan 41.2 U/mL.

Después de 7 días de fermentación hay un periodo de declive en la producción de enzima, observándose una disminución de un 28% a los diez días de fermentación.

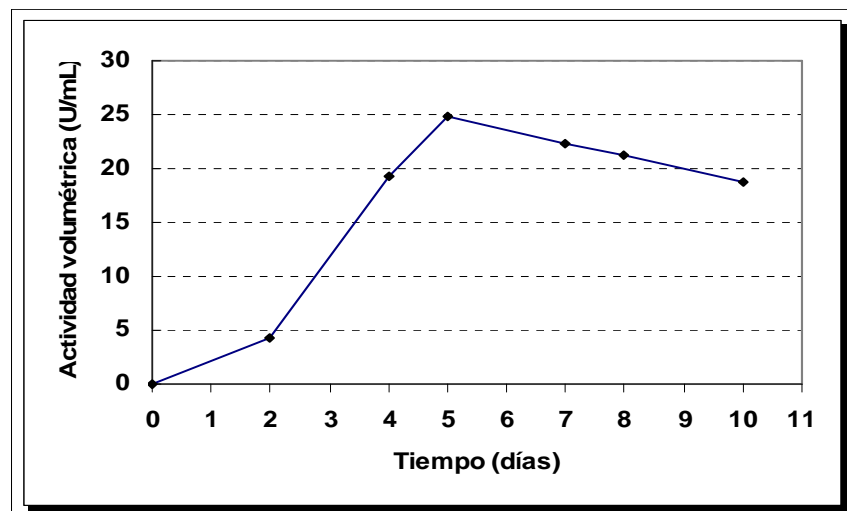
La cinética para el crecimiento en medio sólido del *A. niger* fue realizada por duplicado, al valorar los resultados obtenidos se decidió tomar 7 días como el periodo óptimo para el proceso de fermentación a seguir en el desarrollo de este proyecto.

### 5.1.2 PRODUCCIÓN DE GLUCOAMILASA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA

Las condiciones en las que se evaluó la cinética corresponden a las presentadas en la metodología seguida en la fermentación es estado líquido.

La fermentación en medio líquido experimenta una cinética diferente a la fermentación en medio sólido. El periodo de adaptación de las esporas al nuevo ambiente es más lento, logrando solo un 16% de la producción dos días de fermentación, lo que representa menos de la mitad en comparación a lo logrado en el medio sólido.

**Figura 2.** Cinética de producción de la amiloglucosidasa por *A.niger* en medio líquido.

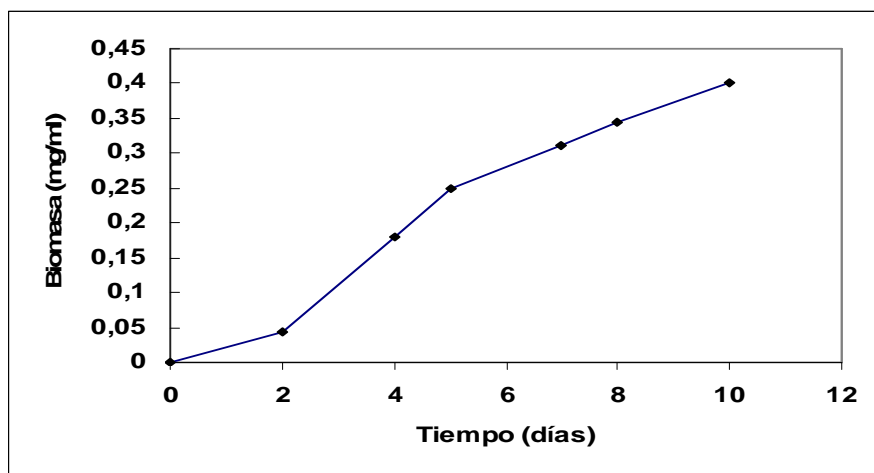


Después del periodo latente del crecimiento se alcanza un máximo de producción a los cinco días de fermentación, con 24.8 unidades volumétricas, como se observa en la figura 2.

Pasados cinco días, comienza un periodo de declive en la biosíntesis de la enzima. Esta disminución no es proporcional a la producción de la biomasa en el

fermentador como se ve en la figura 3, donde pasados cinco días aumenta la cantidad producida en el reactor.

**Figura 3.** Cinética para la producción de biomasa en medio líquido



Al igual que para el medio sólido, las pruebas fueron realizadas por duplicado y se decidió tomar 5 días como el periodo óptimo de fermentación.

## 5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### 5.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Las soluciones enzimáticas extraídas de los medios de fermentación sólidos suplementados con  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  en diferentes concentraciones, fueron utilizadas para evaluar la hidrólisis a la solución sustrato de almidón de papa al 1%. Se definió como medio blanco a aquel que no se le adicionó ningún ion.

La glucosa producida después de la biotransformación del almidón fue cuantificada utilizando el método del DNS pasados 2, 4, 6 y 10 minutos de reacción, efectuando los ensayos por duplicado. Los resultados obtenidos se

consignan en el anexo III y son evaluados en la curva de calibración para la glucosa (anexo I).

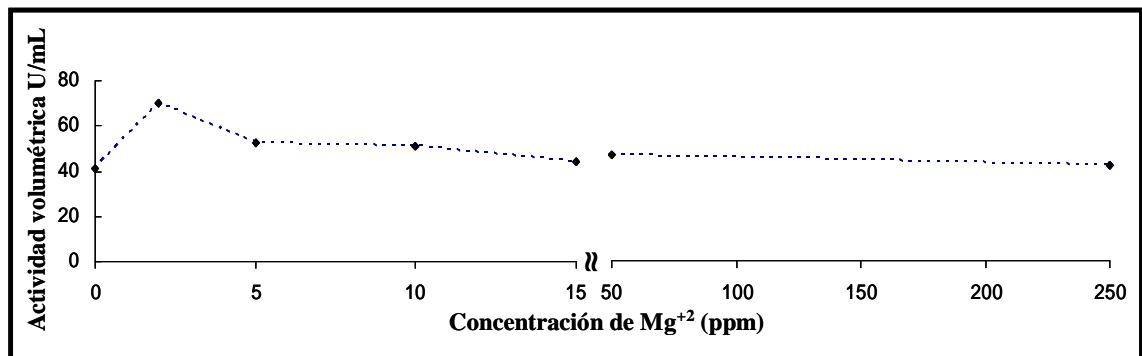
Cuando la fermentación tiene lugar en medio sólido el blanco presentó una actividad volumétrica de 41.2 U/ml y una actividad específica de 1435 U/mg de proteína total.

### 5.2.1.1 Medio sólido suplementado con $Mg^{+2}$

#### 5.2.1.1.1 Actividad volumétrica para el medio sólido suplementado con $Mg^{+2}$

La figura 4, muestra el comportamiento de la actividad volumétrica para el medio sólido cuando se de adicionan seis concentraciones diferentes de  $Mg^{+2}$ .

**Figura 4.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Mg^{+2}$  en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de *A.niger*



Todos los resultados son tomados pasados 7 días de fermentación.

La actividad volumétrica es incrementa en 28.9 U/mL después de la adición de  $Mg^{+2}$  en concentración de 2 ppm comparado con el medio blanco.

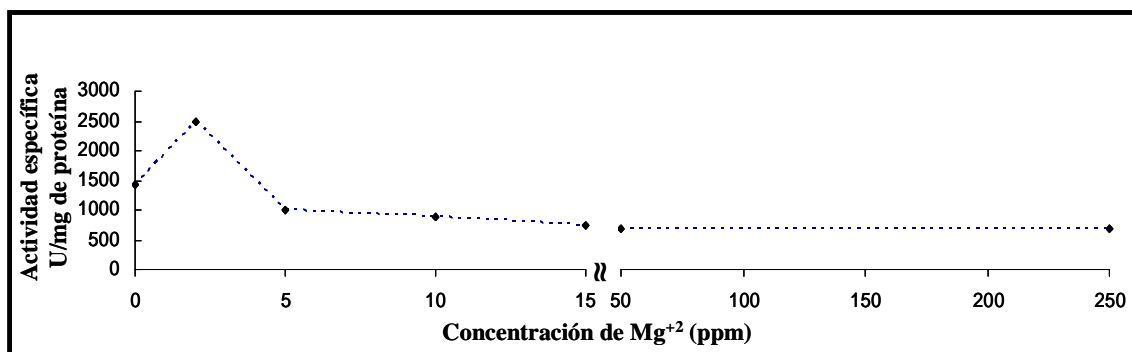
Es evidente que conforme se aumenta la concentración del  $Mg^{+2}$  en el medio hay una caída en la actividad volumétrica. De una actividad máxima de 70.1 U/mL a 2ppm, se pasa a 37.9 U/mL a 250 ppm de  $Mg^{+2}$  en el medio.

La adición de  $Mg^{+2}$  en concentración de 250 ppm al medio causa una disminución de 3.3 U/mL si se compara con el medio blanco. Además a partir de 5 ppm permanece prácticamente constante.

#### 5.2.1.1.2 Actividad específica para el medio sólido suplementado con $Mg^{+2}$

La figura 5, presenta una tendencia similar a la de la actividad volumétrica mostrando un máximo a 2499 U/mg de proteína por la adición de  $Mg^{+2}$  en concentración de 2 ppm y un mínimo a 250 ppm de  $Mg^{+2}$  con 633 U/mg de proteína.

**Figura 5.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Mg^{+2}$  en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de *A.niger*



Este fenómeno se puede atribuir a que el  $Mg^{+2}$  generalmente está libre en el medio facilitando su absorción por el *Aspergillus niger* y no es necesario la inclusión de grandes cantidades en el fermentador.

Se puede deducir también que la adición de concentraciones superiores a 5 ppm de  $Mg^{+2}$  al medio hace que se alcance estabilidad en la actividad específica en torno a 633 U/mg de proteína.

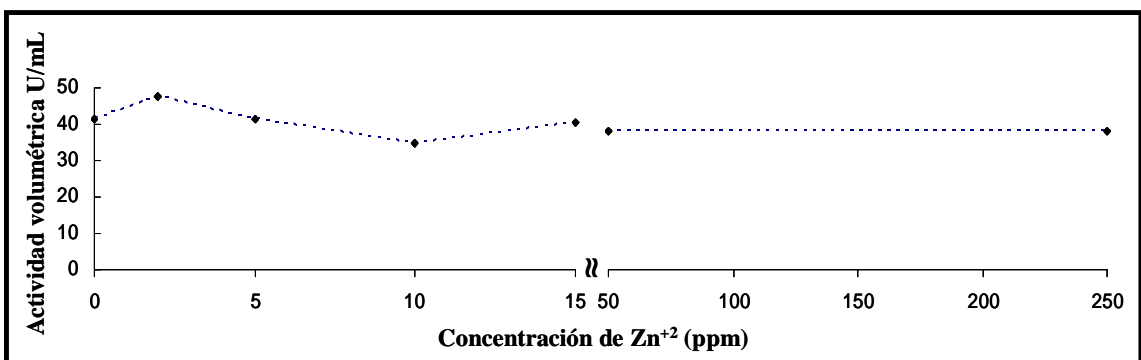
Todas las concentraciones superiores a 5 ppm de  $Mg^{+2}$  adicionadas al medio causan una disminución en la biosíntesis de amiloglucosidasa en comparación con el medio blanco.

### 5.2.1.2 Medio sólido suplementado con Zn<sup>+2</sup>

#### 5.2.1.2.1 Actividad volumétrica para el medio sólido suplementado con Zn<sup>+2</sup>

Al igual que para el medio sólido suplementado con Mg<sup>+2</sup> el medio suplementado con Zn<sup>+2</sup> presenta su máximo de actividad volumétrica si el Zn<sup>+2</sup> se adiciona en una concentración de 2 ppm con 47.6 U/mL. Para este caso el aumento en la actividad volumétrica es de 6.4 U/mL más que el medio blanco.

**Figura 6.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de Zn<sup>+2</sup> en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de *A.niger*



La adición de soluciones de Zn<sup>+2</sup> en concentraciones iguales y superiores a 5 ppm hacen que la actividad volumétrica se mantenga en torno a 35.9 U/mL, 5.3 unidades menos si se compara con el medio blanco.

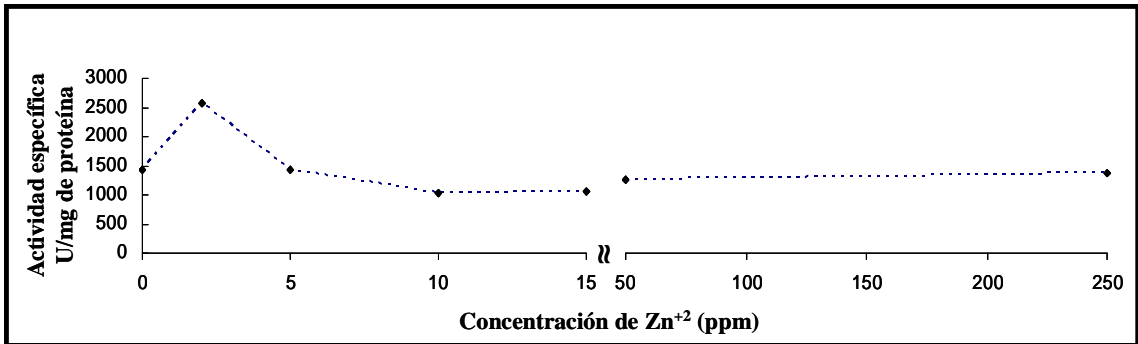
Si se compara la actividad enzimática al incorporar Zn<sup>+2</sup> al medio en concentración de 5 ppm es equivalente a tener un medio blanco.

#### 5.2.1.2.2 Actividad específica para el medio sólido suplementado con Zn<sup>+2</sup>

La adición de soluciones de Zn<sup>+2</sup> en concentraciones superiores a 5 ppm causa una disminución en la actividad específica de la amiloglucosidasa. La actividad

específica toma su valor máximo de 2567 U/mg de P con la adición de  $Zn^{+2}$  al medio en concentración de 2 ppm.

**Figura 7.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Zn^{+2}$  en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de *A.niger*



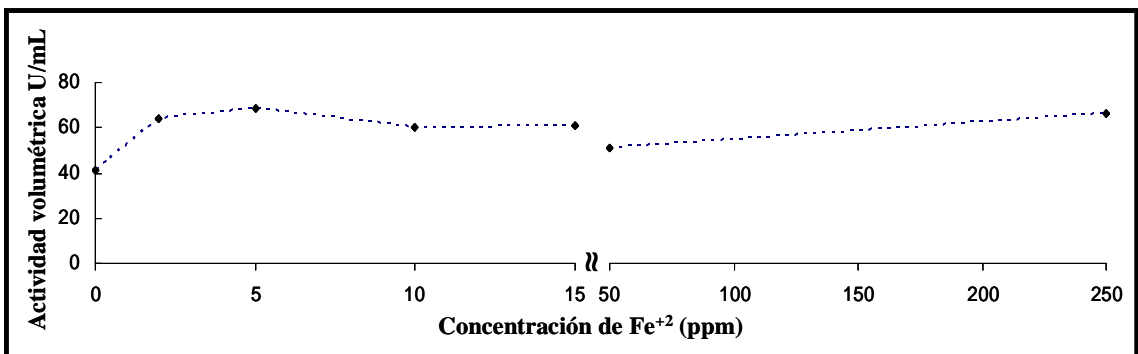
.El  $Zn^{+2}$  esta en el medio principalmente como ion haciendo más fácil la absorción por parte del hongo.

La adición de una solución de  $Zn^{+2}$  de 5 ppm al medio de fermentación hace que la amiloglicosidasa biosintetizada tenga la misma actividad que la que se produce en medio blanco.

### 5.2.1.3 Medio sólido suplementado con $Fe^{+2}$

#### 5.2.1.3.1 Actividad volumétrica para el medio sólido suplementado con $Fe^{+2}$

**Figura 8.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Fe^{+2}$  en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de *A.niger*



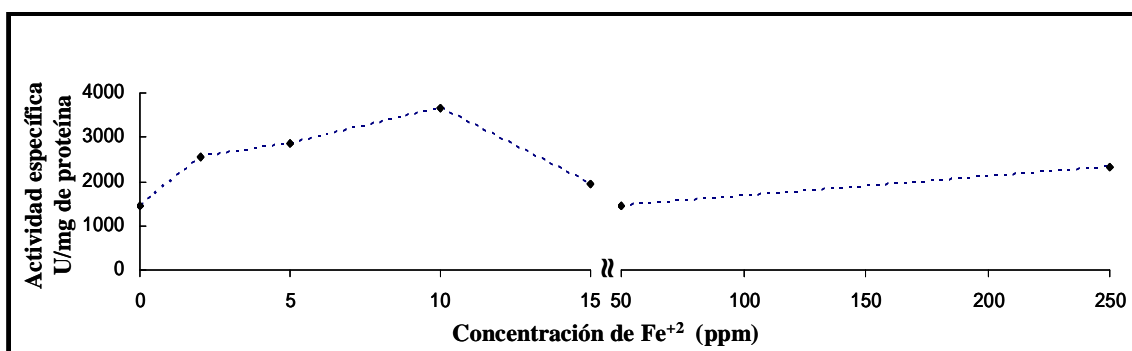
A diferencia de las curvas de tendencia para la actividad volumétrica en medio sólido suplementado con  $Zn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  el comportamiento de la actividad volumétrica cuando se adiciona  $Fe^{+2}$  al medio es menos predecible, ya que oscila en torno a  $56.9 \pm 7.21$  U/mL cuando se aumenta la concentración del ion de 10 a 250 ppm.

El de A. volumétrica se alcanza a 5ppm siendo este 68.9 U/mL, 27.7 U/mL más que lo registrado por el medio sólido blanco.

El medio sólido tiene su máximo de actividad a 5 ppm a diferencia del medio suplementado con  $Zn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  donde se encontraba a 2 ppm.

### 5.2.1.3.2 Actividad específica para el medio sólido suplementado con $Fe^{+2}$

**Figura 9.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Fe^{+2}$  en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de *A.niger*



El máximo de actividad específica se alcanza al adicionar al medio sólido una solución de  $Fe^{+2}$  de 10ppm. En comparación con el medio sólido blanco, la adición de  $Fe^{+2}$  en concentración de 10ppm causa un aumento de la A. específica en 2209 U/mg de proteína lo que representa un incremento del 39%.

El medio suplementado con  $Fe^{+2}$  muestra un comportamiento particular si se compara con los medios donde se adicionó  $Zn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  que presentan una tendencia definida.

Cuando se incorpora el  $Fe^{+2}$  al medio sólido se debe tener en cuenta que éste ion por estabilidad se encontrará en un equilibrio  $Fe^{+2} + L \rightleftharpoons FeL$  desplazado un

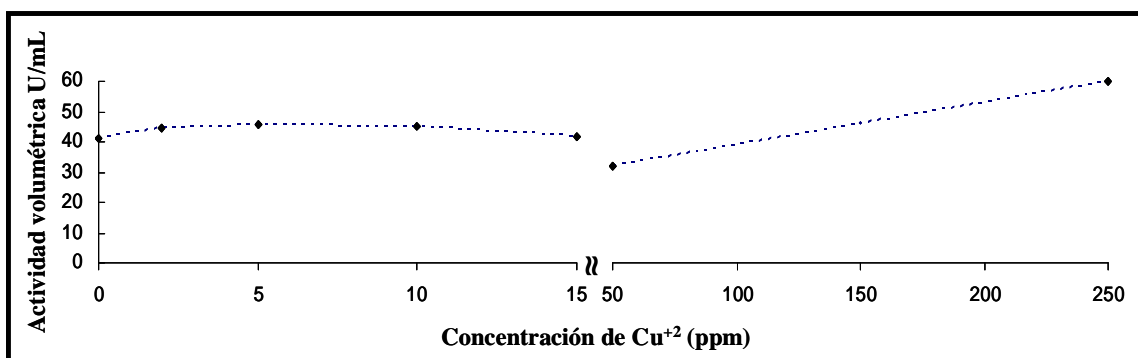
poco a la izquierda, de allí la necesidad de incorporar el ion en una concentración mayor a la utilizada para el  $Mg^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ . La adición de  $Fe^{+2}$  en concentración de 10 ppm provoca el aumento de la actividad específica alcanzándose 3644 U/mg de proteína.

#### 5.2.1.4 Medio sólido suplementado con $Cu^{+2}$

##### 5.2.1.4.1 Actividad volumétrica para el medio sólido suplementado con $Cu^{+2}$

Para el medio sólido suplementado con  $Cu^{+2}$  la curva de tendencia de la actividad describe un comportamiento particular (figura 10), la inclusión de la concentración más alta del ion es la que provoca un incremento en la actividad volumétrica a diferencia de los medios suplementados con  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ , y  $Mg^{+2}$  donde se conseguía a concentraciones bajas.

**Figura 10.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Cu^{+2}$  en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de *A.niger*

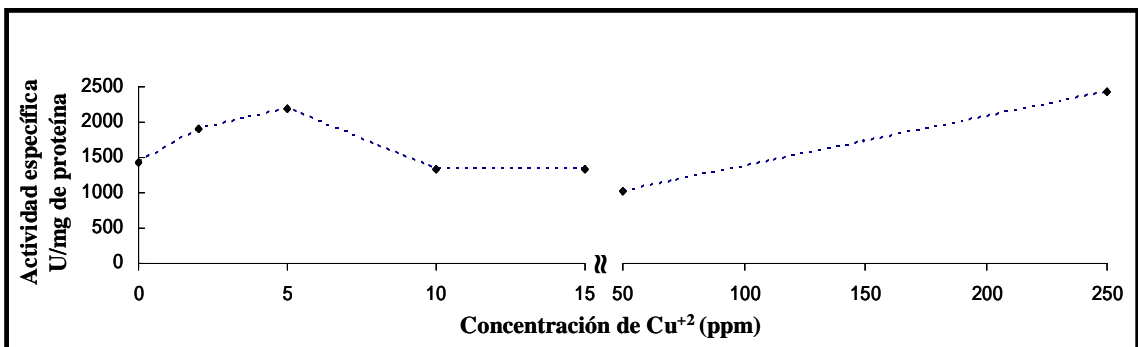


A 250 ppm el aumento en la actividad volumétrica es de 13.0 U/mL y a concentraciones bajas solo se alcanza un aumento de 2.95 U/mL en promedio. Un punto de gran interés en la curva, se consigue al adicionar  $Cu^{+2}$  en concentración de 50 ppm ya que constituye el punto de máximo decrecimiento en la actividad enzimática.

#### 5.2.1.4.2 Actividad específica para el medio sólido suplementado con $\text{Cu}^{+2}$

El máximo de la actividad específica se alcanza cuando al medio se adiciona  $\text{Cu}^{+2}$  en concentración de 250 ppm, con solo una diferencia de 7 U/mg con respecto a la actividad presentada si se adiciona el ion en concentración de 5 ppm donde se encuentra al segundo máximo.

**Figura 11.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $\text{Cu}^{+2}$  en el medio de cultivo sólido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de *A.niger*



La incorporación de  $\text{Cu}^{+2}$  en concentración de 50 ppm genera un efecto de inhibición sobre la amiloglucosidasa producida.

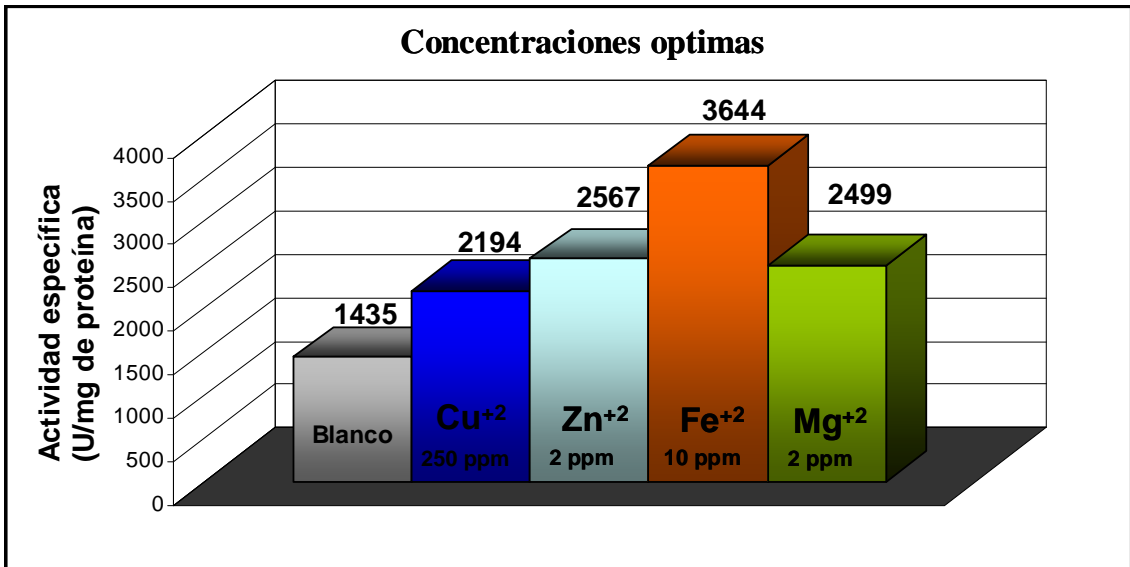
En el caso del  $\text{Cu}^{+2}$ , el equilibrio estará desplazado a la derecha,  $\text{Cu}^{+2} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$ . El  $\text{Cu}^{+2}$  se encuentra en su mayoría como complejo siendo necesaria la incorporación de una mayor cantidad al fermentador. 2194 U/mg de proteína se obtiene cuando se suministra  $\text{Cu}^{+2}$  al medio en concentración de 250 ppm.

El promedio de la actividad específica es de  $1641.6 \pm 526$  U/mg de proteína.

#### 5.2.2 IONES Y CONCENTRACIÓN ÓPTIMA PARA EL MEDIO SÓLIDO

La figura 12 muestra las concentraciones óptimas en las que se debe adicionar cada ion al fermentador sólido. En la figura podemos observar que el ion  $\text{Fe}^{+2}$  produce el máximo aumento en la actividad catalítica de la amiloglucosidasa en comparación con los demás iones.

**Figura 12.** Ion y concentración optima para el medio sólido



### 5.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SUMERGIDO

La actividad enzimática se calculó siguiendo el esquema empleado para determinar la actividad de la amiloglucosidasa biosintetizada en la fermentación en estado sólido. Los datos obtenidos tras los ensayos de hidrólisis del almidón con las soluciones extraídas de la fermentación en medio sumergido suplementada con los cuatro iones de trabajo se consignan en el anexo IV.

Cuando la fermentación tiene lugar en medio sólido el blanco presentó una actividad volumétrica de 24.8 U/ml y una actividad específica de 1150 U/mg de proteína total.

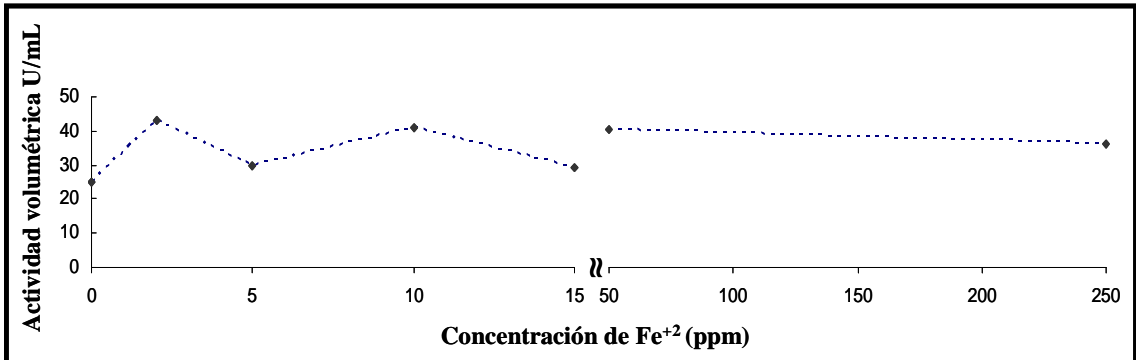
#### 5.2.3.1 Medio líquido suplementado con Fe<sup>+2</sup>

##### 5.2.3.1.1 Actividad volumétrica para el medio líquido suplementado con Fe<sup>+2</sup>

La adición de concentraciones crecientes de Fe<sup>+2</sup> al medio de fermentación líquido no ocasiona un aumento constante en la actividad volumétrica, por el contrario

hace que esta oscile en torno a  $35.3 \pm 5.8$  U/mL, actividad que es superior a la mostrada por el medio líquido blanco (figura 13).

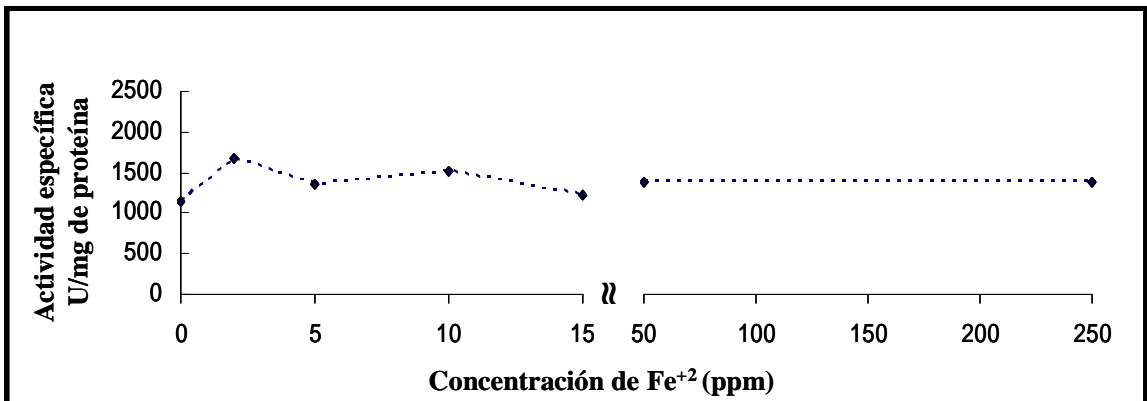
**Figura 13.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $\text{Fe}^{+2}$  en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de *A.niger*



La presencia del ion  $\text{Fe}^{+2}$  en el fermentador en concentración de 2 ppm provoca el máximo aumento de la actividad volumétrica correspondiente a un 43% con respecto al blanco.

#### 5.2.3.1.2 Actividad específica para el medio líquido suplementado con $\text{Fe}^{+2}$

**Figura 14.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $\text{Fe}^{+2}$  en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de *A.niger*



La actividad específica presenta el mismo comportamiento oscilante de la actividad volumétrica en torno a 1476.0 U/mg de proteína.

Si se incorpora  $\text{Fe}^{+2}$  en concentraciones de 50 ppm al medio de fermentación líquido se inhibe la actividad específica de la amilglucosidasa en un 59% con respecto al valor de la media en un intervalo de concentraciones de 2 a 250 ppm. Comparando la actividad volumétrica y la actividad específica se observa una relación directa en los máximos de actividad enzimática que se obtiene cuando el medio esta suplementado con  $\text{Fe}^{+2}$  en un concentración de 2 ppm.

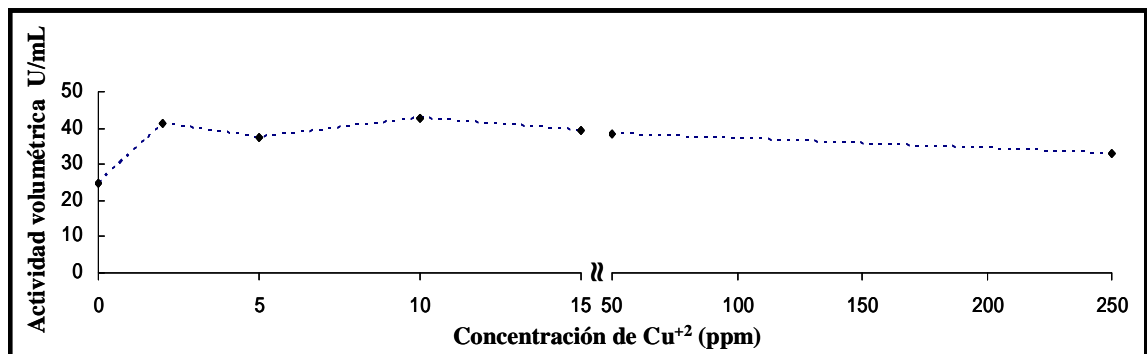
### 5.2.3.2 Medio líquido suplementado con $\text{Cu}^{+2}$

#### 5.2.3.2.1 Actividad volumétrica para el medio líquido suplementado con $\text{Cu}^{+2}$

La figura 15 muestra que la incorporación de  $\text{Cu}^{+2}$  en concentraciones de 10 ppm provoca el aumento de la actividad volumétrica en 17.7 U/mL.

La actividad volumétrica tras la adición de  $\text{Cu}^{+2}$  al medio de fermentación oscila en torno a  $37.5 \pm 4.7$  U/mL. Asimismo cuando se adiciona  $\text{Cu}^{+2}$  en concentraciones superiores a 10ppm se promueve la disminución de la actividad volumétrica para la amilglucosidasa biosintetizada.

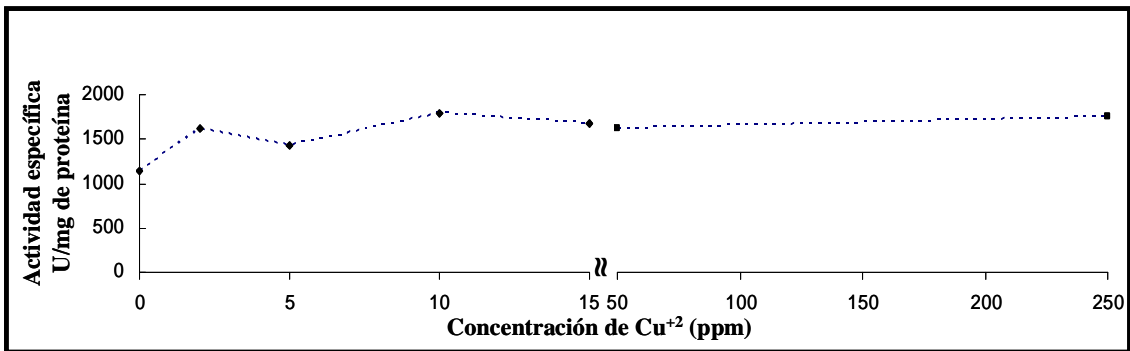
**Figura 15.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $\text{Cu}^{+2}$  en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de *A.niger*



La diferencia en la actividad de los dos máximos en la curva de tendencia es de solo 1 U/mL.

### 5.2.3.2.2 Actividad específica para el medio líquido suplementado con $\text{Cu}^{+2}$

**Figura 16.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $\text{Cu}^{+2}$  en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de *A.niger*



La actividad específica de la amiloglucosidasa biosintetizada cuando al medio líquido se incorpora  $\text{Cu}^{+2}$  oscila en torno a  $1592.6 \pm 134$  U/mg de proteína, valor que está 442 unidades por encima de la actividad registrada por el blanco.

Según la curva de tendencia para la actividad específica, el máximo se consigue al adicionar  $\text{Cu}^{+2}$  en concentración de 10ppm al medio.

La suma de  $\text{Cu}^{+2}$  en concentraciones iguales o superiores a 15 ppm hace que la actividad permanezca constante en un valor promedio de 1574 U/mg de proteína.

Según la secuencia de valores de la  $K_f$ , el ion que activará en menor forma la amiloglucosidasa biosintetizada será el  $\text{Cu}^{+2}$  que en su mayoría se encontrará presente en el medio como ion complejo, haciendo necesaria la incorporación de altas concentraciones.

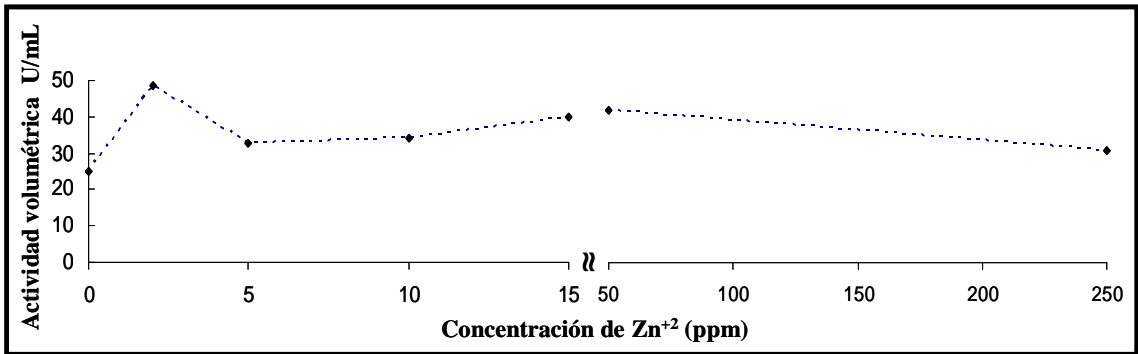
### 5.2.3.3 Medio líquido suplementado con $\text{Zn}^{+2}$

#### 5.2.3.3.1 Actividad volumétrica para el medio líquido suplementado con $\text{Zn}^{+2}$

Si es incorporado  $\text{Zn}^{+2}$  en concentración de 2 ppm al medio, se produce un aumento del 51% en la actividad volumétrica correspondiente a 23.7 U/mL.

A partir de 5 ppm y hasta 250 ppm las soluciones de  $Zn^{+2}$  provocan un aumento casi constante al valor promedio de  $29.5 \pm 12$  U/mL (figura 17).

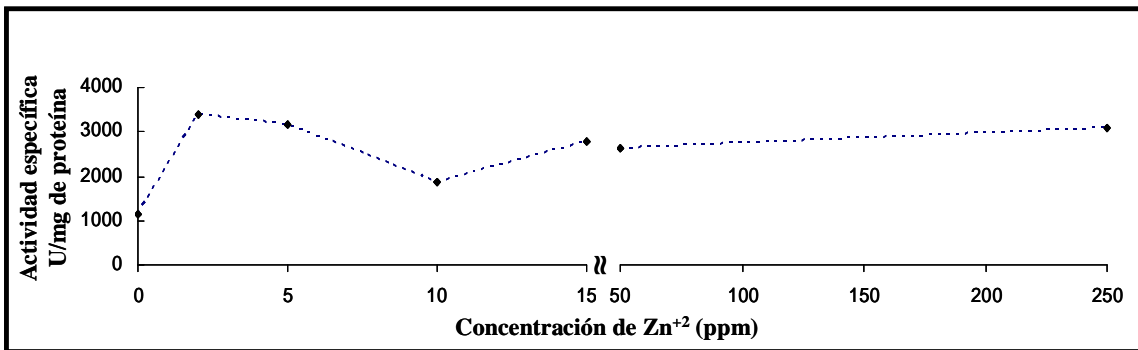
**Figura 17.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Zn^{+2}$  en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de *A.niger*



Las actividades presentadas con la adición de  $Zn^{+2}$  en concentración de 5 y 10 ppm solo difieren en 1.5 U/mL. A diferencia de la concentración de 2 y 5 ppm, también dos valores cercanos que difieren en 15.9 U/mL.

### 5.2.3.3.2 Actividad específica para el medio líquido suplementado con $Zn^{+2}$

**Figura 18.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Zn^{+2}$  en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de *A.niger*



A diferencia de la curva de tendencia para la actividad volumétrica, la actividad específica oscila en un rango mas amplio con una desviación estándar de 547 U/mg. Asimismo tiene su máximo en 3392 U/mg de proteína, 2242 unidades mayores que el blanco.

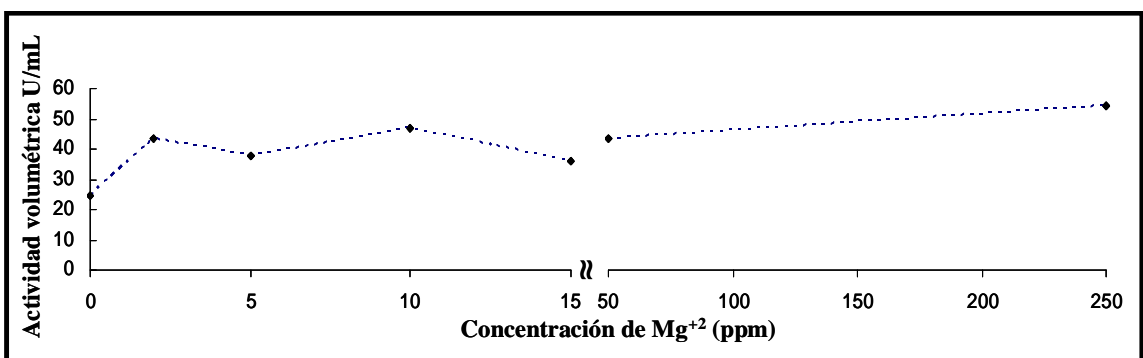
La adición de  $Zn^{+2}$  en concentración de 2 ppm tiene el mayor efecto sobre la actividad específica de la enzima. El equilibrio  $M + L \rightleftharpoons ML$  estará desplazado a la izquierda favoreciendo la presencia de  $Zn^{+2}$  y no la del complejo. Además la velocidad de desaparición del complejo  $ZnL$  es mayor que la velocidad de desaparición del complejo  $MgL$ .

#### 5.2.3.4 Medio líquido suplementado con $Mg^{+2}$

##### 5.2.3.4.1 Actividad volumétrica para el medio líquido suplementado con $Mg^{+2}$

Al agregar  $Mg^{+2}$  al medio de fermentación líquido se produce el comportamiento más estable de las curvas de tendencia para todos los iones de trabajo en el intervalo de 2 a 250 ppm. La actividad oscila en torno a  $42.1 \pm 5.3$  U/mL (figura 18).

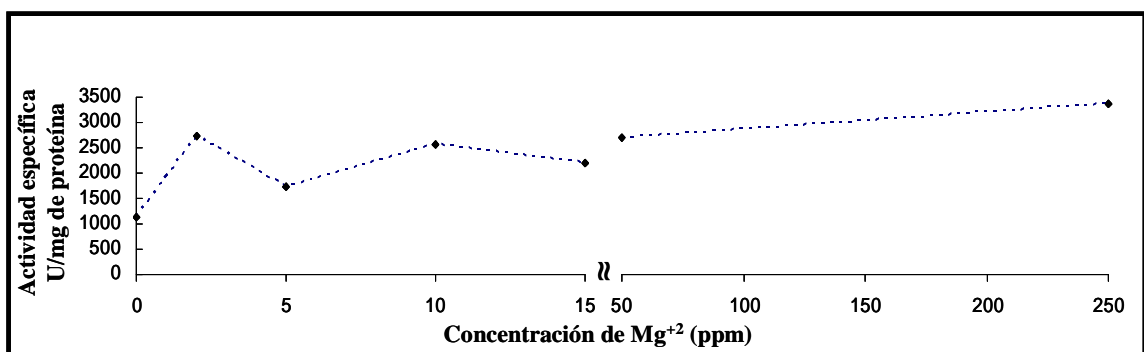
**Figura 19.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Mg^{+2}$  en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad volumétrica de la glucoamilasa de *A.niger*



La máxima actividad volumétrica se obtiene tras la incorporación de  $Mg^{+2}$  en concentración de 250 ppm, pero la diferencia con el segundo máximo es de solo 2.5 U/ml que se obtiene al incorporar  $Mg^{+2}$  al medio en concentración de 10 ppm.

#### 5.2.3.4.2 Actividad específica para el medio líquido suplementado con $Mg^{+2}$

**Figura 20.** Efecto de la adición de diferentes cantidades de  $Mg^{+2}$  en el medio de cultivo líquido, sobre la expresión de la actividad específica de la glucoamilasa de *A.niger*



Para obtener un aumento en la actividad específica de la proteína, el ion  $Mg^{+2}$  debe estar en una concentración de 250 ppm, caso contrario a lo que sucede con los demás iones donde los máximos se consiguen a concentraciones bajas (Figura 20). Ya que de esta manera se incrementa la cantidad de iones metálicos libres de agentes quelantes como aminoácidos, proteínas y materiales coloidales, que interfieren en la absorción del ion por el microorganismo.

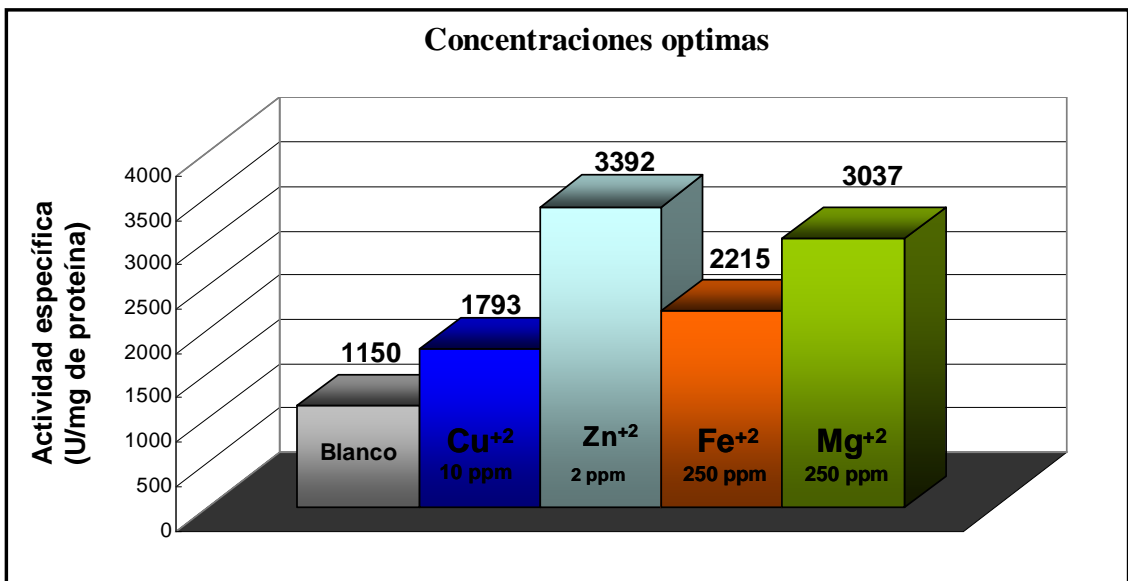
La actividad específica oscila en  $2452 \pm 451$  U/mg de proteína, con una diferencia entre los dos máximos de 308 U/mg.

Cuando se incorpora  $Mg^{+2}$  en concentración de 5 ppm se presenta una inhibición en la producción de la amilogucosidasa lo que se ve reflejado en una disminución de la actividad específica y la volumétrica.

### 5.2.4 IONES Y CONCENTRACIÓN ÓPTIMA PARA EL MEDIO LÍQUIDO

Los resultados de la actividad específica cuando la fermentación tiene lugar en medio líquido, están relacionados de manera directa con al secuencia de orden creciente para la constante de formación del complejo [ML] de cada ion.

**Figura 21.** Ion y concentración óptima para el medio líquido



A diferencia de la fermentación en medio sólido, en el líquido las interacciones de los agentes quelantes como aminoácidos, proteínas y materiales coloidales presentes en el medio con los iones metálicos son mayores. De allí que las concentraciones óptimas obtenidas para cada uno de los iones difieren de un medio al otro.

### 5.3 MEZCLA DE IONES EN EL FERMENTADOR

Después de realizar la evaluación del efecto en diferentes concentraciones de Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> y Fe<sup>+2</sup> por separado sobre la biosíntesis de la enzima hidrolasa en fermentación líquida y sólida, se continuó con la valoración de mezclas iónicas que contienen los cuatro iones de trabajo.

Las concentraciones de los iones que favorecen la producción de la enzima en medio sólido y líquido se muestran a continuación:

**Tabla 3.** Ion, concentración y actividad enzimática para la fermentación en medio sólido.

<b>Ion</b>	<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Actividad volumétrica (U/mL)</b>	<b>Actividad específica (U/mg de proteína)</b>
Mg <sup>+2</sup>	2	70.1	2499
Zn <sup>+2</sup>	2	47.6	2567
Fe <sup>+2</sup>	10	66.5	3644
Cu <sup>+2</sup>	250	54.2	2194

**Tabla 4.** Ion, concentración y actividad enzimática para la fermentación en medio líquido.

<b>Ion</b>	<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Actividad volumétrica (U/mL)</b>	<b>Actividad específica (U/mg de proteína)</b>
Mg <sup>+2</sup>	250	49.2	3037
Zn <sup>+2</sup>	2	48.5	3392
Fe <sup>+2</sup>	2	43.2	1682
Cu <sup>+2</sup>	10	42.5	1793

Las mezclas fueron elaboradas con base en los resultados obtenidos cuando se utilizaron los iones por separado.

Las combinaciones se muestran en la tabla 4. La concentración de cada ion que presento mayor actividad específica se mezcló en el frasco fermentador en relación 1:1 en volumen.

**Tabla 5.** Combinación de iones

<b>Fermentador</b>	<b>Par de iones</b>
1	Cu <sup>+2</sup> - Fe <sup>+2</sup>
2	Zn <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>
3	Cu <sup>+2</sup> - Zn <sup>+2</sup>
4	Fe <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>
5	Cu <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>
6	Fe <sup>+2</sup> - Zn <sup>+2</sup>

### 5.3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MEZCLA DE IONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

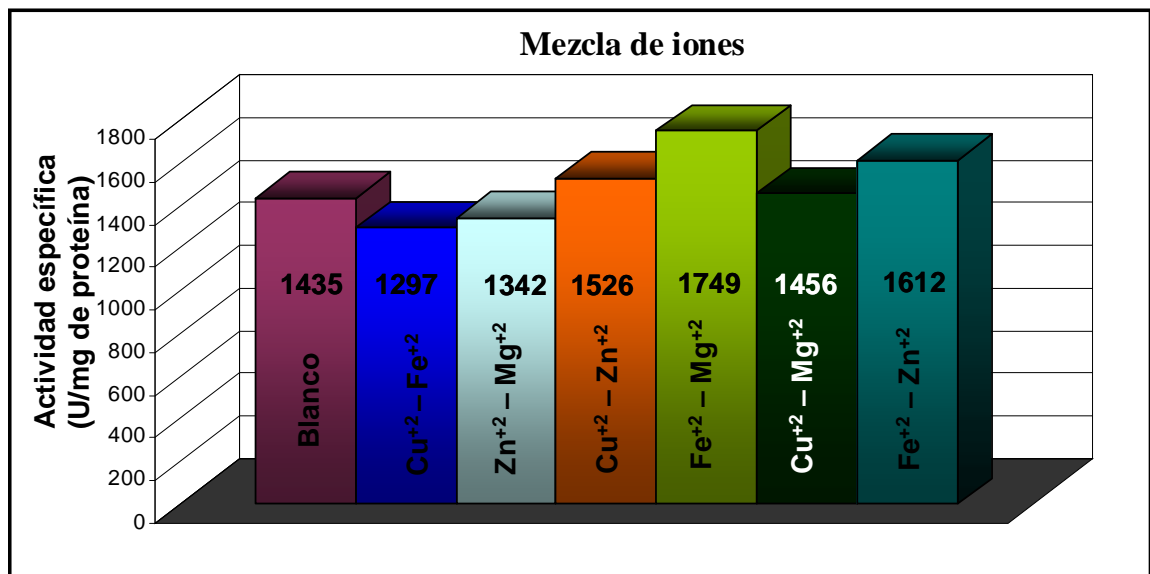
Las soluciones enzimáticas extraídas de los medios de fermentación que contenían las mezclas de iones fueron utilizadas para producir la hidrólisis del almidón. Los datos obtenidos se consignan en el anexo V.

### 5.3.2 ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA EL MEDIO SÓLIDO SUPLEMENTADO CON LA MEZCLA DE IONES

Como en el proceso de fermentación en estado sólido con los iones por separado, con las mezclas se tomaron siete días como el periodo óptimo para la producción de la enzima.

El mayor efecto sobre la actividad específica se consigue cuando al medio de fermentación se adiciona la mezcla de  $\text{Fe}^{+2}$ - $\text{Mg}^{+2}$  en concentraciones de 10 ppm y 2 ppm respectivamente, alcanzando 1749 U/mg de proteína, un 22% más que lo registrado por el medio blanco.

**Figura 22.** Actividad específica para el medio sólido suplementado con la mezcla de iones.

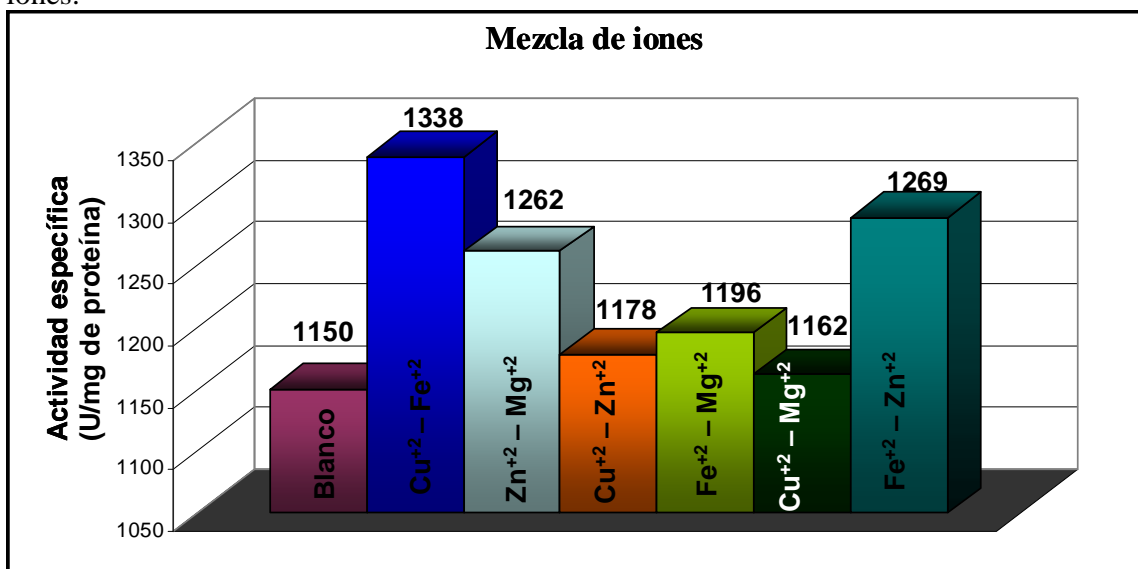


La actividad específica oscila en torno a 1497 U/mg de proteína. Las mezclas  $\text{Cu}^{+2}\text{-Fe}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}\text{-Mg}^{+2}$  disminuye la biosíntesis de la amiloglucosidasa, que se refleja en la disminución de la actividad específica en comparación con el medio blanco.

Si se comparan las actividades específicas de la amiloglucosidasa biosintetizada en medio sólido cuando se adicionan los iones por separado con la producida en el medio con la mezcla de iones, se observa que las mezclas de iones disminuyen la actividad específica de la enzima debido a un posible envenenamiento del hongo.

### 5.3.3 ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA EL MEDIO LÍQUIDO SUPLEMENTADO CON LA MEZCLA DE IONES

**Figura 23.** Actividad específica para el medio líquido suplementado con la mezcla de iones.



A diferencia del medio sólido, el par de iones que produce el aumento en la actividad específica es  $\text{Cu}^{+2}\text{-Fe}^{+2}$  en concentración de 10 y 250 ppm respectivamente. El máximo de actividad es de 1338 U/mg de proteína, 188 unidades mayores que lo mostrados por el blanco.

Para el medio líquido la actividad oscila en torno a  $1237 \pm 70$  U/mg de proteína, solo 7% por encima de la actividad alcanzada por el blanco.

Después de analizar los resultados obtenidos cuando se adicionan los iones por separado en los dos medios, la hipótesis inicial sugería que la combinación de iones en el medio de fermentación favorecería la actividad de la amiloglucosidasa biosintetizada por el *Aspergillus Níger*, si se asumía que la actividad enzimática podía ser aditiva.

Al incorporar las mezclas de los iones al sistema biocatalítico se observó un fenómeno de desactivación enzimática que es evidente al comparar los resultados de la actividad específica con la obtenida para los iones separados, efecto que posiblemente se podría atribuir a un “envenenamiento” del hongo. La presencia de dos tipos de iones en el fermentador provocaría un posible estrés químico en el microorganismo.

Por otro lado, el aumento de la carga iónica en el sistema podría desestabilizar la estructura tridimensional de la proteína, desnaturalizándose y perdiendo su actividad catalítica.

#### **5.4 IONES METÁLICOS COMO COFACTORES ENZIMÁTICOS**

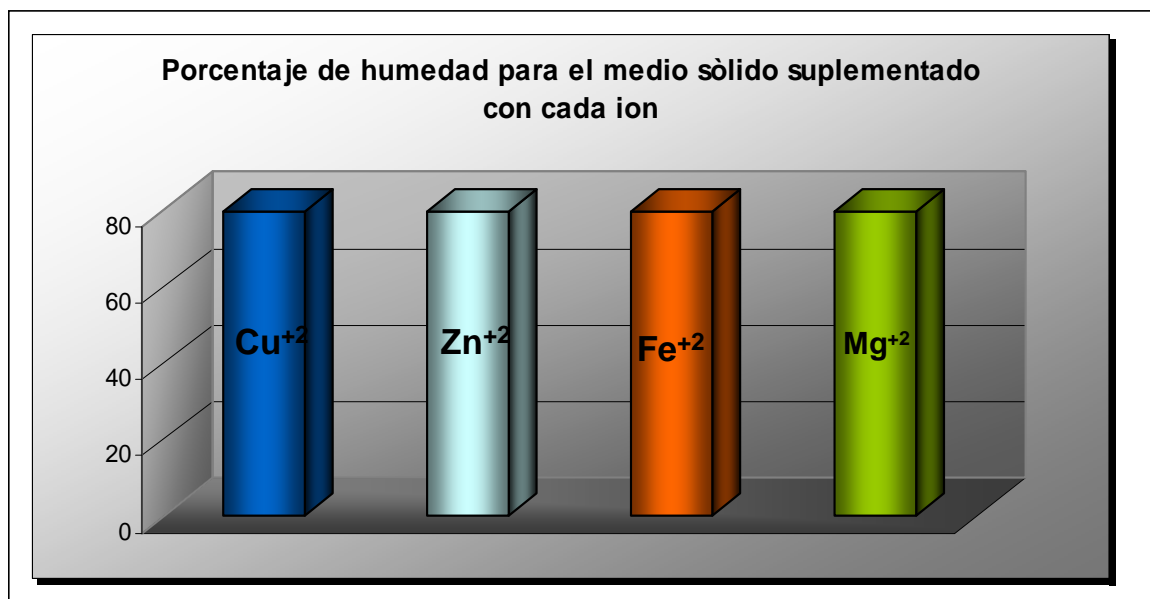
El aumento de la actividad enzimática al adicionar iones metálicos al fermentador puede deberse a que la actividad catalítica de la amiloglucosidasa no es totalmente de naturaleza proteica, los resultados sugieren que la presencia de una estructura no proteica en este caso  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Fe^{+2}$  por separado contribuyen en el aumento de su actividad catalítica debido a que funcionan como cofactores enzimáticos en el ciclo catalítico.

## 5.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HUMEDAD PARA EL MEDIO SÓLIDO

Con el objetivo de cuantificar una posible relación entre la humedad y la actividad específica de la enzima biosintetizada en cada medio sólido, se determinó el porcentaje de humedad.

A pesar que los medios suplementados con cada ion que presentó mayor actividad varían sus porcentajes de humedad, no lo hacen en un grado que pueda suponer una posible relación entre la actividad específica y el porcentaje de humedad. El porcentaje de humedad promedio para todos los medios sólidos es del 80%. Los resultados obtenidos se encuentran en el anexo VI.

**Figura 24.** Porcentaje de humedad para el medio sólido

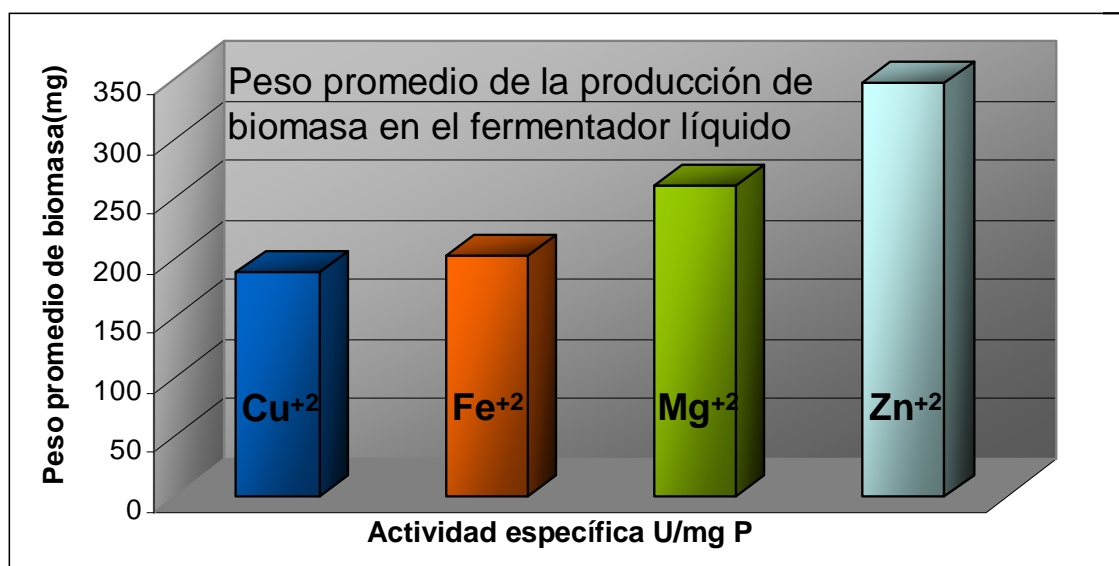


## 5.6 PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN EL FERMENTADOR LÍQUIDO

La cantidad de biomasa producida en el medio líquido suplementado con cada ion, en las 6 concentraciones de trabajo, fue cuantificada con el objetivo de establecer una posible relación con la actividad de la glucoamilasa generada. Los resultados se muestran en el anexo VII.

Si se hace un análisis por separado de lo que sucede con la producción de biomasa en el reactor líquido con cada ion, se observa que no hay una relación directa entre la producción de biomasa en los fermentadores y la actividad que presenta cada una de las soluciones enzimáticas extraídas de los mismos. Para esto se realizó la medición de la biomasa producida en el reactor líquido bajo la influencia del ion  $\text{Cu}^{+2}$  en las 6 concentraciones de trabajo por separado. Éste procedimiento se repitió para el  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ , y  $\text{Mg}^{+2}$ .

**Figura 25.** Promedio de la producción de biomasa en el fermentador líquido para cada ion.



Pero si comparamos los pesos promedio de la biomasa producida en cada reactor suplementado con los diferentes iones (figura 24) podemos ver que si existe una relación con el máximo de actividad logrado utilizando cada ion.

Según los datos obtenidos, además de influir en la actividad de la amiloglucosidasa biosintetizada en el medio, la adición de  $\text{Mg}^{+2}$  al fermentador colabora con el crecimiento del hongo.

En resumen del trabajo realizado, al hacer todos los ensayos de actividad enzimática a los extractos producidos en fermentación sólida y sumergida es evidente que la inclusión de iones metálicos al medio tiene un efecto sobre la

biosíntesis de la glucoamilasa si se utilizan por separado, efecto que no es directo con la concentración del ion incorporado para todos los casos [Yusuka y Morita, 1996].

## 6. CONCLUSIONES

- ☑ La inclusión de  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ , por separado, en concentraciones de 250, 10, 2 y 2 ppm respectivamente en el medio de fermentación sólido, causa el aumento en la actividad catalítica de la amiloglucosidasa producida por el *A.niger*.
- ☑ La adición de  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ , por separado, en concentraciones de 10, 2, 250 y 2 ppm respectivamente en el medio de fermentación líquido, provoca el aumento en la actividad catalítica de la amiloglucosidasa producida por el *A.niger*.
- ☑ Si se desea biosintetizar amiloglucosidasa con *A.niger* bajo las condiciones de éste proyecto, se debe adicionar  $\text{Fe}^{+2}$  en concentración de 10 ppm al medio sólido y  $\text{Zn}^{+2}$  en concentración de 2 ppm al líquido, para conseguir la solución enzimática con la mayor actividad específica.
- ☑ La incorporación de la mezclas de iones  $\text{Cu}^{+2}$ - $\text{Fe}^{+2}$  en relación 1:1 en volumen al medio de fermentación líquido, reduce 2.5 veces la actividad específica de la glucoamilasa en comparación con el máximo obtenido para el extracto enzimático del medio líquido.
- ☑ La incorporación de la mezclas de iones  $\text{Fe}^{+2}$ - $\text{Mg}^{+2}$  en relación 1:1 en volumen al medio de fermentación líquido, reduce 2 veces la actividad específica de la glucoamilasa en comparación con el máximo obtenido para el extracto enzimático del medio sólido.

- No existe relación aparente entre el porcentaje de humedad en el fermentador sólido pasados 7 días del proceso, con la actividad de la amiloglucosidasa biosintetizada en el medio.
- Según la cinética de crecimiento, 5 días para el medio líquido y 7 para el sólido son los valores óptimos de tiempo para obtener la máxima actividad catalítica de la amiloglucosidasa.

## 7. RECOMENDACIONES

- ☑ Realizar una cinética de crecimiento por separado para cada ion a las 6 concentraciones de trabajo, con el objetivo de optimizar cada vez más el proceso de fermentación.
- ☑ Cuantificar el efecto de la temperatura sobre la biosíntesis de la enzima, cuando son utilizadas las concentraciones óptimas de cada ion en el fermentador líquido y sólido.
- ☑ Purificar la enzima producida en medio sólido, cuantificar su actividad y compararla con la obtenida con el extracto enzimático.
- ☑ Comprobar el efecto de los iones metálicos sobre la biosíntesis de la glucoamilasa cuando se utilizan diferentes medios de fermentación sólida.
- ☑ Variar el pH en el medio de fermentación cuando se utiliza la concentración óptima de cada ion con el objetivo de cuantificar su influencia sobre la biosíntesis de la glucoamilasa.
- ☑ Utilizar el método del *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (pNPG) como método adicional para cuantificar la glucosa producida después de la hidrólisis enzimática del almidón.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AL MUSSALLAM A, (1980). "Revision of the black *Aspergillus* species". Tesis doctoral. Universidad de Utrech, Utrech.

ANTO H, TRIVEDI, U.B. PATEL, K.C. (2005). "Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate". *Bioresource Technology*, **53**: 1-6.

ASGHAR M, S. RAFIQ, UMBREEN A. ASAD M.J. (2001). "Kinetic of glucoamylase by *Arachniotus sp*". Departament of Chemistry, University of Agriculture. *International Journal of Agriculture, and Biology*. **10**: 29-31.

ASGHAR, M. YAGOOB, M.A. SHEIKH A. BARQUE R. (2000). "Optimization of cellulose production by *Arachaniotus sp.* using corn stover as substrate". **10**:37-9.

BUENDÍA, G. MENDOZA, G. GAMA, R. ORTEGA, M. HERNÁNDEZ, J. LARA, A. (2001). "Effects of glucoamylase from *Aspergillus niger* on *in vitro* digestibility, of maize and sorghum and on lamb performance". Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México.

BRADFORD, M. (1976). "Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding". *Analytical Biochem* .**72**: 248-254.

CASTILLO, J. ARIZA, J. (2000). "Extracción y purificación de las peroxidasas de las hojas de palma de aceite (*Elais guineensis*) y palma real (*Roystonea regia*)". Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. 28

CORNETT, C. FANG, T. FORD, C. (2003). "Starch-binding domain shuffling in *Aspergillus niger* glucoamylase". Protein Engineering. 7 pp. 521-529.

COUTINHO, P, REILLY P. (1997). "Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships". Proteins Struct Funct Genet 29:334-337.

DOELLE, H. MITCHELL, D. ROLZ, C. (1992). "Solid Substrate Cultivation". Elsevier Applied Science, London, N. York, Chapter 3, 35.

FEROZA, B. SINGH, S. HOSSAÍN, 1998. "Production of glucoamylase by *Aspergillus niger* in liquid culture and determination of its culture conditions". Indt. Microbiology sec. 33, 309-11

FRIONI, L. (1999). "*Procesos microbianos*", Argentina, Editorial de la fundación Universidad Nacional de Rio Cuarto. Cap 2, pag 1-13.

GREGG, W. SWIFT, R. ATTERBUR, Y. TRAPPE, S. RINAS, U. WIEBE, M. TRINCI, A. (2001). "The effect of pH on glucoamylase production, glycosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*". Biochimica et Biophysica Acta 1527 p 112-122.

[HTTP://www.aspergillus.org.uk/](http://www.aspergillus.org.uk/) fecha de acceso (21/11/2005).

JONH, R (2002). "Handbook of Food Enzymology" New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated. 727-736.

JUGE, N. FURNISS P. KRAMH B, VIC J, MORRIS G. (2002). "The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis". 11, 239-245.

KOZAKIEWICZ, Z. (1989). "Aspergillus species on stored products". CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey. 62, 48-55.

KRAMER, G. GUNNING, A. BELSHAW, V. WILLIAMSON, G. (1993). "Scanning tunneling microscopy of *Aspergillus niger* glucoamylase". J Chem Soc Faraday Trans 89, 2595-2602.

MARÍN, L. SALAZAR, A. (2003). "Evaluación de la producción de pectinasas a partir de *Aspergillus niger*". Trabajo de Grado. Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT. Medellin.

MERCHUK, J. (1994). "Microbiología industrial".capitulo 4. 31-42.

MILLER, G. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". Anal Chem; 31,426-428.

MIYUKI, M. VAHAN, B. (1998). "Separation and purification of glucoamylase in aqueous two-phase systems by a two-step extraction". Journal of Chromatography B, 711 p 309–312.

MCCARTER, J. WHITERS, S. (1994). "Mechanism of enzymatic glycoside hydrolysis", Curr. Opin. Struct. Biol. 4, 885-892.

NOROUZIAN D, AKBARZADEH (1991), SCHARER J, YOUNG M. (2005). "Fungal Glucoamylases". Biotechnology Advances. 34, 1-8.

NOROUZIAN, D. AZIM, SCHARER, J. YOUNG, M. (2005) "Fungal Glucoamylases". Biotechnology advances. 65, 1-8.

- O'BREIM, P. HERSCHALG, D.(1999). "Catalytic promiscuity and evolution of new enzymatic activities". Chem and biol. 4, 91-105.
- PANDEY, A. NIGEM, S. MOHAN, R. (2000). "Advances in microbial amylases". Biotechnol.Appl.biochem.31, 135-52.
- PANDEY, A. (1995) "Glucoamylase research: an overview. Starch", (47); 439-45.
- PAPAGIANNI, M. (1999). "Fungal Morphology". In: *Citric Acid Biotechnology*, B. Kristiansen, M. Matthey, J. Linden (Eds.), Taylor and Francis, London . pp. 69–84.
- PAPAGIANNI M. ET AL. (2001). "Phytase Fermentation by *Aspergillus niger*", *Food Technol. Biotechnol.* 39 (4) 319–326 (2001)
- PENDERSEN H, BEBER M, NIELSEN J. (2000). "Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivations by an industrial strain of *Aspergillus niger*". Appl Microbiol Biotechnol 53. 272-277.
- PHILLIPS LL, CALDWELL, M. (1951). "A study of the purification and properties of a glucose-forming amylase from *Rhizopus delemar*,glucoamylase". J. Am. Chem. Soc (73): 3559-3563.
- POLAKOVIĆ, M. BRYJAK, J. (2004). "Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase". Biochemical Engineering Journal.18, 57–63.
- SAUER, J. BENT, S. ULLA, C. TORBEN, F. EKATERINA, M. MATT, H. ROEPSTOR PETER, BIRTE, S. (2000). "Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering". Biochimica et Biophysica Acta 1543 p 275-293.

SELVAKUMAR, P. ASHAKUMARY, L. PANDEY, A. "Copro waste, a novel substrate for solid-state fermentation" (1996). *Biores. Technol* 51, 217–220.

SUTTHIRAK, P. SAOVANEE, D. SITTIWAT, L. (2005). "Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*". *Process Biochemistry* .40, 2821–2826.

SWIFT, R, KARANDIKAR, A. GRIFFEN, A. PUNT, P. ROBSON G. TRINCI, A. WIEBE, M.G. (2000). "The effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture". *fungus genetics and biology* .31, 125-133.

TRINCI, A.P.J. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.*57: 11-24.

TRINCI, A. P. J. (1971). Influence of the width of peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *J. Gen. Microbiol.* 67, 325-344.

VINIEGRA, G. (1997). "Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring". In Roussos, S.; Lonsane B. K.; Raimbault M. and Viniegra-González, G. *Eds. Advances in Solid State Fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2: pp. 5-22.

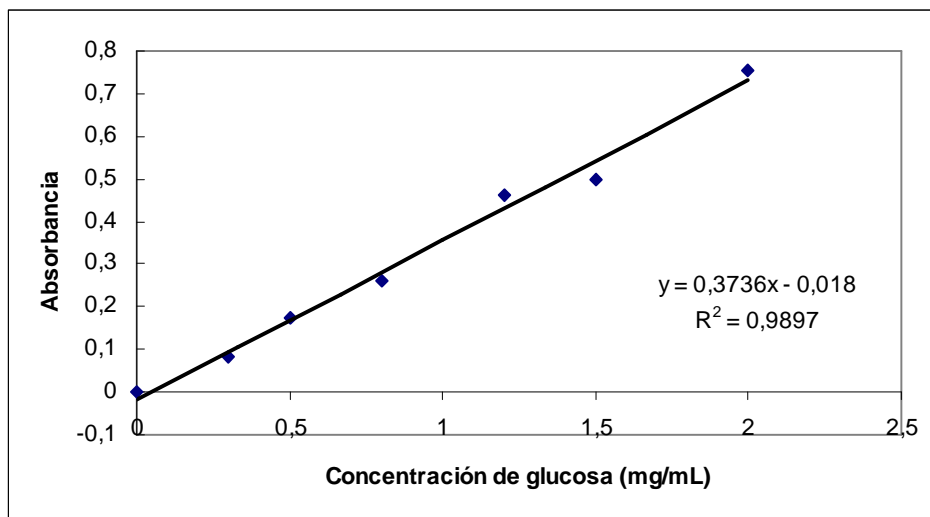
YUSUKA, F. MORITA, H. (1996). "Improved glucoamylase production by *Rhizopus* sp. A-11 Using metal- ion Supplemented liquid medium". *Journal of fermentation and Bioengineering.*82, 554-557.

WHITTAKER, R, (1978). "five kingdom".<http://home.manhattan.edu/~frances.cardillo/plants/intro/plntlist.html> fecha de acceso (14/09/2005)

## ANEXOS

### Anexo I

**Figura 26.** Curva de calibración para la determinación de glucosa utilizando el método del DNS.



Para conocer la concentración de glucosa se realizó el siguiente cómputo:

$$\text{Abs} = m \cdot [\text{C}] + b$$

Abs: Absorbancia de la solución de glucosa.

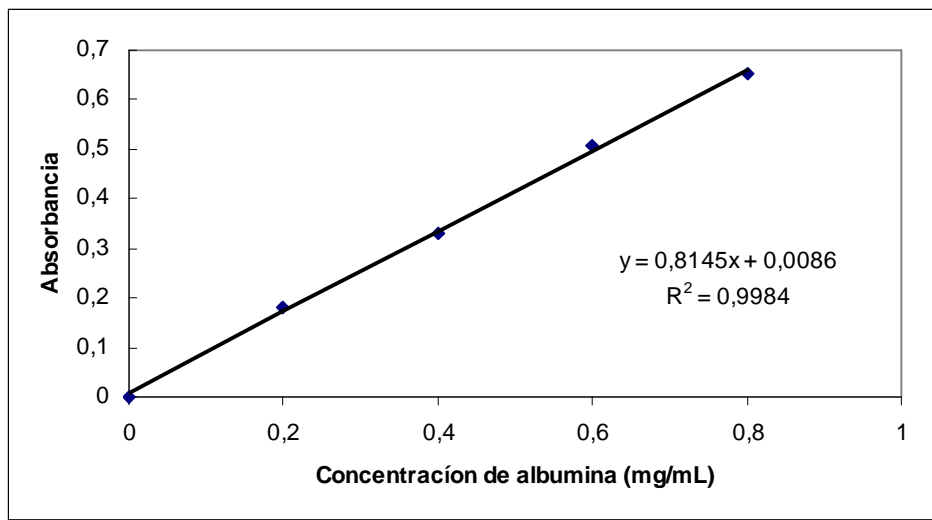
[C]: Concentración de glucosa en (mg/L).

b: Corte con el eje y

$$[\text{C}] = (\text{Abs} - b) / m$$

## Anexo II

**Figura 27.** Curva de calibración para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford.



Para conocer la concentración proteica se realizó el siguiente cómputo:

$$\text{Abs} = m \cdot [\text{C}] + b$$

Abs: Absorbancia de la solución proteica.

[C]: Concentración del extracto enzimático en (mg/L).

b: Corte con el eje y

$$[\text{C}] = (\text{Abs} - b) / m$$

### Anexo III

La glucosa producida por la hidrólisis del almidón utilizando glucoamilasa, se cuantificó con el método del DNS, los datos de absorbancia obtenidos para los medios sólidos en presencia de los iones  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  se muestra en las siguientes tablas:

**Tabla 6.** Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con  $Mg^{+2}$ .

Fermentador. ppm $Mg^{+2}$	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. 2	0.000	0.122	0.222	0.317	0.459
2. 5	0.000	0.181	0.204	0.300	0.373
3. 10	0.000	0.221	0.247	0.318	0.377
4. 15	0.000	0.230	0.283	0.319	0.330
5. 50	0.000	0.232	0.249	0.313	0.319
6. 250	0.000	0.227	0.210	0.282	0.297

**Tabla 7.** Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con  $Zn^{+2}$ .

Fermentador. ppm $Zn^{+2}$	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. 2	0.000	0.174	0.211	0.264	0.344
2. 5	0.000	0.234	0.255	0.299	0.323
3. 10	0.000	0.223	0.238	0.245	0.276
4. 15	0.000	0.191	0.258	0.267	0.300
5. 50	0.000	0.211	0.253	0.258	0.267
6. 250	0.000	0.213	0.268	0.259	0.263

**Tabla 8.** Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con  $\text{Fe}^{+2}$ .

Fermentador. ppm $\text{Fe}^{+2}$	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. 2	0.000	0.094	0.206	0.297	0.419
2. 5	0.000	0.200	0.210	0.351	0.490
3. 10	0.000	0.192	0.267	0.378	0.421
4. 15	0.000	0.169	0.277	0.342	0.428
5. 50	0.000	0.179	0.216	0.265	0.335
6. 250	0.000	0.147	0.209	0.271	0.422

**Tabla 9.** Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con  $\text{Cu}^{+2}$ .

Fermentador. ppm $\text{Cu}^{+2}$	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. 2	0.000	0.132	0.182	0.244	0.308
2. 5	0.000	0.045	0.136	0.143	0.302
3. 10	0.000	0.103	0.174	0.190	0.312
4. 15	0.000	0.065	0.116	0.140	0.281
5. 50	0.000	0.142	0.154	0.186	0.210
6. 250	0.000	0.046	0.109	0.173	0.357

#### Anexo IV

La glucosa producida por la hidrólisis del almidón utilizando glucoamilasa, se cuantificó con el método del DNS, los datos de absorbancia obtenidos para los medios líquidos en presencia de los iones  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  se muestra en las siguientes tablas:

**Tabla 10.** Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con  $Fe^{+2}$ .

Fermentador. ppm $Fe^{+2}$	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. 2	0.000	0.102	0.160	0.182	0.223
2. 5	0.000	0.099	0.130	0.172	0.199
3. 10	0.000	0.071	0.144	0.189	0.271
4. 15	0.000	0.070	0.134	0.147	0.190
5. 50	0.000	0.055	0.144	0.149	0.238
6. 250	0.000	0.065	0.157	0.187	0.283

**Tabla 11.** Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con  $Cu^{+2}$ .

Fermentador. ppm $Cu^{+2}$	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. 2	0.000	0.137	0.197	0.228	0.290
2. 5	0.000	0.080	0.104	0.149	0.255
3. 10	0.000	0.060	0.096	0.155	0.281
4. 15	0.000	0.061	0.109	0.142	0.260
5. 50	0.000	0.071	0.086	0.095	0.242
6. 250	0.000	0.074	0.076	0.127	0.198

**Tabla 12.** Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con  $Zn^{+2}$ .

Fermentador. ppm $Zn^{+2}$	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. 2	0.000	0.121	0.203	0.277	0.324
2. 5	0.000	0.128	0.175	0.201	0.228
3. 10	0.000	0.100	0.197	0.198	0.230
4. 15	0.000	0.102	0.165	0.205	0.268
5. 50	0.000	0.074	0.157	0.172	0.249
6. 250	0.000	0.063	0.123	0.134	0.180

**Tabla 13.** Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con  $Mg^{+2}$ .

Fermentador. ppm $Mg^{+2}$	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. 2	0.000	0.142	0.150	0.263	0.295
2. 5	0.000	0.210	0.215	0.238	0.293
3. 10	0.000	0.130	0.172	0.268	0.315
4. 15	0.000	0.125	0.162	0.235	0.241
5. 50	0.000	0.099	0.153	0.186	0.270
6. 250	0.000	0.144	0.209	0.299	0.333

## Anexo V

La glucosa producida por la hidrólisis del almidón utilizando glucoamilasa, se cuantificó con el método del DNS, los datos de absorbancia obtenidos para los medios sólidos y líquidos en presencia de la mezcla de iones se muestran en las siguientes tablas:

**Tabla 14.** Absorbancias promedio para la extracción del medio sólido suplementado con la mezcla de iones.

Fermentador. Mezcla	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. Cu <sup>+2</sup> - Fe <sup>+2</sup>	0.000	0.123	0.147	0.200	0.294
2. Zn <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>	0.000	0.053	0.179	0.175	0.243
3. Cu <sup>+2</sup> - Zn <sup>+2</sup>	0.000	0.055	0.230	0.255	0.373
4. Fe <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>	0.000	0.078	0.172	0.253	0.302
5. Cu <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>	0.000	0.053	0.148	0.221	0.243
6. Fe <sup>+2</sup> - Zn <sup>+2</sup>	0.000	0.072	0.167	0.236	0.322

**Tabla 15.** Absorbancias promedio para la extracción del medio líquido suplementado con la mezcla de iones.

Fermentador. Mezcla	Tiempo (minutos)				
	0	2	4	6	10
	Absorbancia Promedio				
1. Cu <sup>+2</sup> - Fe <sup>+2</sup>	0.000	0.098	0.195	0.212	0.342
2. Zn <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>	0.000	0.069	0.098	0.106	0.190
3. Cu <sup>+2</sup> - Zn <sup>+2</sup>	0.000	0.086	0.130	0.124	0.265
4. Fe <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>	0.000	0.076	0.087	0.167	0.315
5. Cu <sup>+2</sup> - Mg <sup>+2</sup>	0.000	0.074	0.097	0.193	0.290
6. Fe <sup>+2</sup> - Zn <sup>+2</sup>	0.000	0.082	0.104	0.182	0.310

## Anexo VI

**Tabla 16.** Porcentaje de humedad para el medio sólido suplementado con  $Mg^{+2}$ .

Fermentador ppm $Mg^{+2}$	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	% de humedad
1. 2	2.00	0.405	80
2. 5	2.00	0.408	79
3. 10	2.00	0.403	80
4. 15	2.00	0.400	80
5. 50	2.00	0.402	80
6. 250	2.00	0.398	80

**Tabla 17.** Porcentaje de humedad para el medio sólido suplementado con  $Zn^{+2}$ .

Fermentador ppm $Zn^{+2}$	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	% de humedad
1. 2	2.00	0.392	80
2. 5	2.00	0.401	80
3. 10	2.00	0.389	80
4. 15	2.00	0.409	79
5. 50	2.00	0.394	80
6. 250	2.00	0.403	80

**Tabla 18.** Porcentaje de humedad para el medio sólido suplementado con Fe<sup>+2</sup>.

Fermentador ppm Fe <sup>+2</sup>	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	% de humedad
1. 2	2.00	0.418	79
2. 5	2.00	0.413	79
3. 10	2.00	0.400	80
4. 15	2.00	0.392	80
5. 50	2.00	0.399	80
6. 250	2.00	0.401	80

**Tabla 19.** Porcentaje de humedad para el medio sólido suplementado con Cu<sup>+2</sup>.

Fermentador ppm Cu <sup>+2</sup>	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	% de humedad
1. 2	2.00	0.393	80
2. 5	2.00	0.392	80
3. 10	2.00	0.390	80
4. 15	2.00	0.402	80
5. 50	2.00	0.400	80
6. 250	2.00	0.393	80

## Anexo VII

Cantidad de biomasa seca producida en los fermentadores suplementados con cada ion.

**Tabla 20.** Cantidad de biomasa seca producida en el cultivo líquido suplementado con  $Mg^{+2}$ .

Fermentador. ppm		Peso de la biomasa seca (g)
1.	2	0.360
2.	5	0.338
3.	10	0.363
4.	15	0.348
5.	50	0.317
6.	250	0.357

**Tabla 21.** Cantidad de biomasa seca producida en el cultivo líquido suplementado con  $Zn^{+2}$ .

Fermentador. ppm		Peso de la biomasa seca (g)
1.	2	0.264
2.	5	0.257
3.	10	0.262
4.	15	0.286
5.	50	0.277
6.	250	0.218

**Tabla 22.** Cantidad de biomasa seca producida en el cultivo líquido suplementado con  $\text{Cu}^{+2}$ .

	<b>Fermentador.</b> <b>ppm</b>	<b>Peso de la biomasa seca</b> <b>(g)</b>
1.	2	0.242
2.	5	0.194
3.	10	0.219
4.	15	0.167
5.	50	0.197
6.	250	0.195

**Tabla 23.** Cantidad de biomasa seca producida en el cultivo líquido suplementado con  $\text{Fe}^{+2}$ .

	<b>Fermentador.</b> <b>ppm</b>	<b>Peso de la biomasa seca</b> <b>(g)</b>
1.	2	0.129
2.	5	0.189
3.	10	0.218
4.	15	0.185
5.	50	0.217
6.	250	0.181